مقاله اصیل

اثر القایی دپرنیل بر تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی در شرایط محیط کشت

محمد تقی قربانیان .M.Sc[1]، تقی طریحی .Ph.D[1*]، سید علیرضا مصباح نمین .Ph.D[2]، یعقوب فتح الهی .Ph.D[3]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
۳. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی
* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
پست الکترونیک: Email: ttiraihi@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۴/۱۱، پذیرش مقاله: ۸۶/۱/۲۵

هدف: بررسی اثر القایی دپرنیل بر تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی در شرایط محیط کشت

مواد و روش‌ها: در این تحقیق (Bone Marrow Stromal Cells: BMSCs) از استخوان فمور وتیبیای موش صحرایی بالغ تهیه شد. سلول‌ها پس از پنج پاساژ تحت اثر القایی دپرنیل با دوز 10^{-8} مولار قرار گرفتند و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه عصبی با روش ایمنوسیتوشیمی ارزیابی شد.

یافته‌ها: سلول‌های القا شده توسط دپرنیل (گروه آزمایش) و القا نشده (گروه کنترل) با آنتی بادی‌های Oligo, GFAP, NF200, NF68 ارزیابی شدند. سلول‌های تمایز یافته القا شده توسط دپرنیل نسبت با نشانگرهای عصبی واکنش مثبت دادند. برای تعیین درصد، سلول‌های شبه عصبی و همچنین شبه گلیالی شمارش سلولی صورت گرفت. نتایج بدست آمده موید آن است که ۸۲/۷۱ درصد به سلول‌های شبه عصبی و ۲۵/۹۹ درصد به سلول‌های شبه آستروسیتی پاسخ مثبت دادند.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که BMSCs تحت اثر القایی دپرنیل با دوز 10^{-8} مولار قابلیت تمایز به سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی را در شرایط *in vitro* دارا است.

کلیدواژگان: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، دپرنیل، سلول‌های شبه عصبی، شبه گلیالی

فصلنامه پژوهشی یاخته، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۲۲-۱۵

مقدمه

سلول‌های بنیادی (Stem cells) سلول‌های تخصص نیافته‌ای هستند که قادر به خود تکثیری (Self-renewal) هستند و در شرایط مناسب می‌توانند در یک محدوده وسیع به انواع سلول‌های بالغ تمایز یابند (۱، ۲). دو نوع سلول بنیادی رویانی (Embryonic) و بالغ (Somatic) بر اساس منشا و ظرفیت تمایزی آنها تشخیص داده می‌شود (۲). سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) جز سلول‌های بنیادی بالغ هستند که از مغز استخوان گرفته می‌شوند و قادرند به رده‌های مزانشیمی و غیرمزانشیمی تمایز یابند (۳). مغز استخوان شامل دو گروه سلول چند ظرفیتی است که عبارتند از: سلول‌های خون‌ساز (هماتوپویتیک) و سلول‌های غیرخون‌ساز. سلول‌های غیرخون‌ساز چند ظرفیتی و معمولا به عنوان سلول‌های استرومایی مزانشیمی معرفی می‌شوند (۴). سلول‌های BMSCs با محیطی که فراهم می‌کند نقش مهمی در شکل‌گیری و تمایز سلول‌های خونی بالغ از سلول‌های خون‌ساز فراهم می‌کند (۷-۵). همچنین آنها را به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا واحدهای تشکیل دهنده کلونی فیبروبلاستی (Fibroblastic Colony Forming Unit: CFU) می‌شناسند که سلول‌های شبه بنیادی هستند (۸). این سلول‌ها به ظروف کشت می‌چسبند و قادرند از یک سلول منفرد کلونی‌های زیادی تشکیل دهند. BMSCs به سهولت از مغز استخوان بدست آمده و به سرعت در محیط کشت گسترش می‌یابند (۷، ۸). این سلول‌های بنیادی تحت شرایط آزمایشگاهی خاص دارای قدرت تمایز به چندین نوع سلول مختلف، مانند استئوبلاست‌ها، ادیپوسیت‌ها و کندروسیت‌ها هستند (۱، ۲، ۸). اخیرا ظرفیت تکوین BMSCs به رده‌های عصبی نظیر سلول‌های عصبی و گلیالی در *in vitro* گزارش شده است (۱، ۴، ۶، ۹). علاوه بر آن، در صورت پیوند به بافت عصبی قادرند در شرایط *in vivo* نیز به سلول‌های رده عصبی تمایز یابند (۱۳-۱۰). سلول‌های استرومایی مغز استخوان منبع سلولی با ارزشی به عنوان پیوند اتوگرافت برای استفاده بالینی در زمینه ترمیم سیستم عصبی مرکزی است (۷). یکی از نکات مهم در تحقیقات اخیر در زمینه تمایز BMSCs، نوع روش‌ها و تکنیک‌های اعمال شده است. به عبارتی تمایز سلول‌ها استرومایی، مخصوصا به سلول‌های عصبی بستگی به شرایط محیط کشت و انتخاب نوع تحریک کننده، عوامل رشد و یا اثرات تنظیمی و القایی، فاکتورهای خارجی در *in vitro* دارد (۱۳، ۱۴). در ضمن داروی دپرنیل دارای اثرات القایی تمایزی است که قادر است با ایجاد شرایط خاص در

محیط کشت، BMSCs را به سمت سلول‌های شبه عصبی وشبه گلیالی سوق دهد. داروی دپرنیل سابقا به عنوان داروی ضد افسردگی معرفی شد ولی بعدها مشخص شد در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون اثر دارد و امروزه نیز به عنوان داروی ضدپیری استفاده می‌شود. از طرفی این دارو بیماری پیش‌رونده آلزایمر را به تاخیر می‌اندازد. دپرنیل بیان بعضی از mRNA ها یا پروتیین‌ها را در سلول‌های عصبی وگلیالی تغییر می‌دهد و بیان ژن و سنتز پروتیین، با کاهش در فراگمنته شدن DNA که مشخصه آپوپتوز محسوب می‌شود همراه است (۱۷-۱۵) (جدول ۱).

جدول ۱: تحقیقات انجام شده بر روی تمایز BMSCs به سلول‌های شبه عصبی (نوع القا کننده و مارکرهای مورد استفاده)

سلول	القا کننده	مارکر عصبی	محقق
Human BMSCs	RA-BDNF-NGF	Nestin, β-tubulin III-NeuN-GFAP	Sanchez-Ramos et al, 1998, 2000
Rat BMSCs	β-mercaptoetanol DMSO-BHA	Nestin-NSE-NF, M-trkA (no GFAP)	Woobury et al, 2000, Black & Woodbury 2001
Mouse BMSCs	Aza-C+NGF+BDNF+NT3	Tuj, 1-NeuN-Hu-GFAP-Gal, C-trkA-trkB- trkC-NCAM- GAP, 43	Kohyma et al, 2001
Human BMSCs	BFGF- 3weeks	β-tubulin III-NSE-GFAP-Gal, C-glutamate-MAP	Peyse & Vertailhe, 2001
Human BMSCs	IBMX, db-cAMP	NSE-vimentin	Deng et al, 2001
Rat BMSCs	BMX+forskolin+DMSO+valporic acid+Insulin	Tau-NSE-NeuN-TUC4	Black et al, 2003

مواد و روش‌ها

جدا سازی و کشت سلولی

در این پژوهش از موش صحرایی بالغ ۶ تا ۸ هفته نژاد Sprague Dawley استفاده شده است. برای هر گروه از ۵ سرحیوان استفاده شد که این حیوانات در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد و آب و غذای کافی نگهداری شدند. به منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتکل هلسینکی سال ۱۹۷۵ و دستورالعمل انجمن علوم و اعصاب آمریکا انجام شد.

سلول‌های استرومایی مغز استخوان از استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی که قبلا توسط عزیزی و وودبوری و همکارانش توضیح داده شده است، استخراج گردید (۲۰-۱۸). بدین ترتیب که پس از جدا کردن عضلات اتصالی، دو انتهای استخوان قطع و با محیط کشت α MEM (Gibco) کامل شد و با سرم (FBS) ۱۰درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین (Gibco) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط سوزن ۲۱ gauge عمل تخلیه Flash out مغز استخوان صورت گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومایی به کف فلاسک (Falcon) چسبیده باقی می‌مانند و سلول‌های خونی حذف می‌شوند. هنگامی که سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد فلاسک را پر کردند، پاساژ داده شدند و یک سوم یا یک چهارم درصد سلول‌ها نگه داشته شد. پاساژ سلول‌ها توسط Trypsin ۰/۲۵درصد و EDTA ۰/۰۴درصد (Merck) انجام شد و این عمل تا پنج پاساژ ادامه یافت. در این شرایط سلول‌ها از مورفولوژی یکسانی برخوردار شدند. برای انجام آزمایش ارزیابی میزان حیات، سلول‌ها به نسبت مساوی با تریپان بلو رنگ شدند. سلول‌های مرده آبی شده و به همراه سلول‌های زنده شمارش شدند که در مجموع بیش از ۹۵ درصد سلول‌های زنده را تشکیل دادند. رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز برای شناسایی سلول‌های استرومایی به دو روش یک مرحله‌ای (Sigma شماره ۸۶) و دو مرحله‌ای انجام شد (۲۱).

القا توسط دپرنیل

BMSCs در دو گروه کنترل (سلول‌ها در محیط کشت بدون القاکننده) و گروه آزمایش (سلول‌ها مدت ۲۴ ساعت در معرض دپرنیل با غلظت 10^{-8} مولار) قرار گرفت و برای هر گروه، ۵ نوبت (تکرار) کشت انجام شد. در مرحله مقدماتی برای مشاهده اثر القایی دپرنیل بر روند تمایز BMSCs به سلول‌های عصبی از رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله استفاده شد. ابتدا پلیت‌های ۲۴ خانه (Nunc) لامل‌گذاری و سپس توسط ژلاتین ۰/۱درصد آغشته شد و پلیت به مدت یک شب در انکوباتور قرار گرفت. پس از تریپسینه کردن سلول‌های پاساژ پنج، تعداد ۵۰۰۰ سلول به طور مساوی در هر یک از خانه‌ها ریخته شد. با گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها به (لامل) Cover slip آغشته به ژلاتین چسبید و در شرایطی که سلول‌ها حدود ۶۰ یا ۷۰ درصد کف را پر کرده بودند، القاکننده به محیط کشت بدون سرم سلول‌ها اضافه شد. ۲۴ ساعت پس از اضافه کردن دپرنیل نمونه‌ها برای انجام رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله و ایمنوسیتوشیمی آماده شد.

رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله

ابتدا با استفاده از دپرنیل غلظت 10^{-8} مولار، القای فنوتیپ عصبی BMSCs انجام شد. سپس ثبوت نمونه با استفاده از محلول پارافرمالدیید چهار درصد به مدت ۳۰ دقیقه در درجه اتاق انجام شد. در ادامه شستشو با PBS و آبدهی در الکل با غلظت‌های کاهنده صورت گرفت. سپس نمونه‌ها در محلول کرزیل ویوله قرار داده شده و در خاتمه دو دقیقه در گزیلل و چسباندن انجام شد.

ایمونوسیتوشیمی

برای تعیین فنوتیپ سلولی، نمونه‌ها به روش ایمنوسیتوشیمی برای آنتی‌بادی فیبرونکتین

[Chemicon, Biozol, Bzloo279]
[Chemicon, AB 5804] ← GFAP
[Sigma, 07014] ← Oligo
[Sigma, N5139] (NF68) نوروفیلامنت 68
[Sigma, N 5389] (NF 200) نوروفیلامنت 200

آماده شدند. نمونه‌های سلولی برای ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض فرمالدیید ۴درصد قرار گرفت. سپس سرم ۱۰درصد بز و Triton X-100 ۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در ادامه سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مربوطه، بر ضد مارکرهای سلول‌های استرومایی و عصبی و گلیالی قرار گرفتند. آنتی‌بادی‌های اولیه فیبرونکتین ,NF68 NF200, Oligo, GFAP به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مدت ۱۵دقیقه شستشو با PBS و در ادامه در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC (Chemicon,AP184F) برای فیبرونکتین و GFAP (ضدخرگوش) و ,Oligo, NF68 NF200 (ضد موش) به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس ZEISS مورد بررسی قرار گرفت.

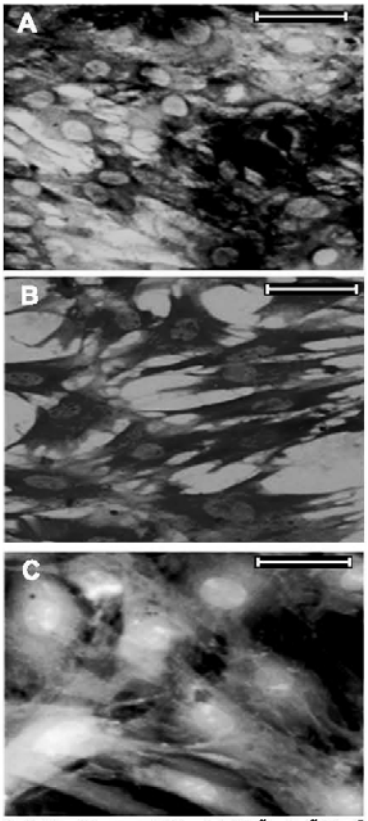
یافته‌ها

سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌هایی هستند که به ظروف کشت می‌چسبند و به سرعت تکثیر می‌شوند. معمولا پس از گذشت حدود چهار روز از استخراج، کف ظرف کشت را پر می‌کنند. بعد از اولین پاساژ، سرعت تکثیر و رشد سلول‌ها به گونه‌ای است که به فاصله یک روز نیاز به پاساژ دارند و در شرایط مطلوب ممکن است هر روز پاساژ سلول‌ها لازم باشد. این سلول‌ها در شرایط مطلوب تا ۲۰ پاساژ تکثیر داده شدند و ویژگی‌های مورفولوژیکی آنها تغییر نداشته است.

سلول‌ها از نظر مورفولوژی از پاساژ دوم، ظاهری نسبتا یک‌دست و یکنواخت دارند. سول‌ها معمولا بیشتر به سه شکل در محیط نمایان هستند، تعدادی از سلول‌ها که در حال تکثیر هستند ظاهری گرد و کروی و کوچک دارند و برخی دیگر که بیشتر سلول‌ها را به خود اختصاص می‌دهند به شکل دوکی و شبه فیبروبلاستی مشخص می‌شوند. برخی از سلول‌ها به صورت پهن و چسبنده‌تر و از نظر اندازه بزرگتر از سایر سلول‌ها، در محیط کشت دیده می‌شوند (شکل ۱).

بر اساس آزمایش ارزیابی میزان حیات درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۵درصد تعیین شده است. همچنین با ارزیابی سیتوشیمی مشخص شد که درصد قابل توجهی از BMSCs به آنزیم آلکالین فسفاتاز واکنش می‌دهند. در این تحقیق به دو روش یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای برای این آنزیم آزمایش شد. شکل ۱A، مربوط به روش دو مرحله‌ای و شکل ۱B، مربوط به روش یک مرحله‌ای است، که اکثر سلول‌ها به این آنزیم پاسخ مثبت دادند. به علاوه برای اثبات استرومایی بودن سلول‌ها از آنتی‌بادی فیبرونکتین استفاده شد. شکل ۱C، مربوط به این آنتی‌بادی، سلول‌ها را با سیتوپلاسم حاوی رشته‌های سبز رنگ فیبرونکتین نشان می‌دهد که برای شمارش سلول‌های مثبت، توسط اتیدیوم بروماید (Sigma, E7637) هسته سلول‌ها به رنگ قرمز روشن رنگ شده است و حدود ۹۷ درصد سلول‌ها با آنتی فیبرونکتین واکنش دادند.

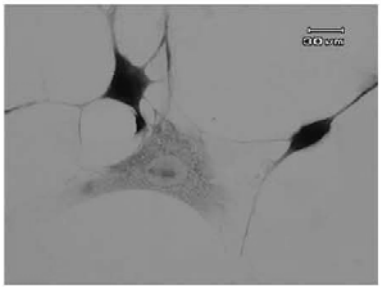
از آنجایی که رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله به عنوان رنگ آمیزی اختصاصی برای سلول‌های عصبی شناخته می‌شود، سلول‌ها پس از اثر القایی دپرنیل، رنگ‌آمیزی می‌شود که سیتوپلاسم سلول‌های عصبی پس از واکنش به رنگ بنفش دیده می‌شوند. اما در گروه کنترل واکنشی مشاهده نشد. شکل ۲ سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته را نشان می‌دهد که جسم سلولی چند وجهی با تعدادی استطاله کوتاه منشعب مشابه دندریت ویک زایده بلند شبه آکسون دارند. در انتهای زواید برجستگی‌هایی دیده می‌شود که نظیر آن را در سلول‌های عصبی تحت عنوان فیلوپودیا می‌شناسیم.



شکل ۱: A: رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز دو مرحله‌ای که گرانول‌های تیره سیتوپلاسم سلول‌ها واکنش آنزیم را با رنگ نشان می‌دهد. B: رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز یک مرحله‌ای که سیتوپلاسم سلول‌ها به رنگ صورتی دیده می‌شوند. C: رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس که سیتوپلاسم سلول‌های استرومایی به آنتی‌بادی فیبرونکتین واکنش داده به رنگ سبز و هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز متمایل به زرد مشاهده می‌شوند (۷۰ میکرومتر).

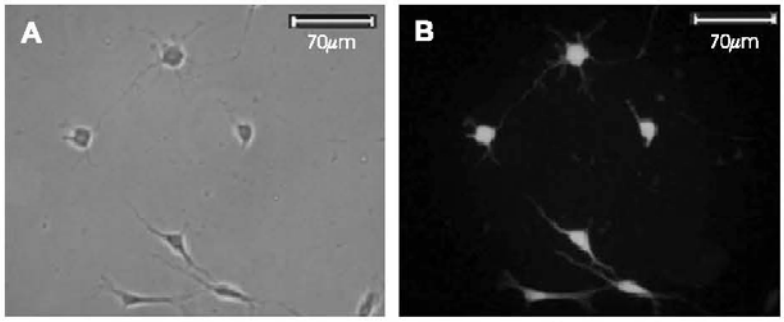
به منظور تایید نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی کرزیل فاست ویوله و برای تعیین فنوتیپ سلولی، سلول‌های تمایز یافته با استفاده از

آنتی‌بادی‌های تخصصی مربوط به سلول‌های عصبی و نوروگلیالی به روش ایمنوسیتوشیمی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در زمان تعیین شده پس از القای عصبی، سلول‌ها با آنتی‌بادیهای مربوط بر علیه مارکرهای سلول‌های عصبی و گلیالی که به ترتیب زیر هستند قرار گرفتند.

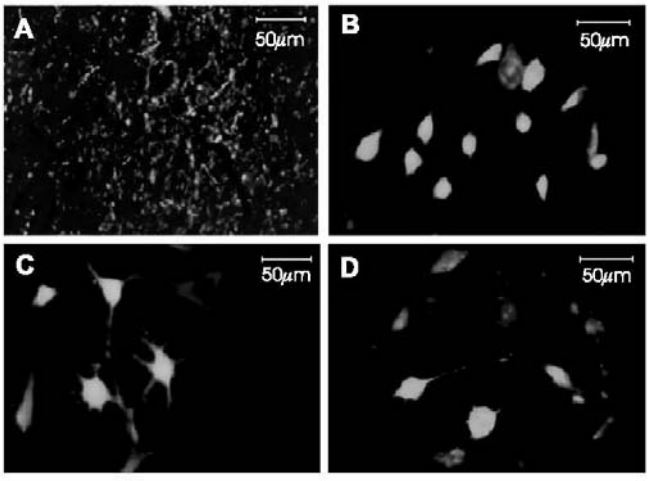


شکل ۲: سلول‌های شبه عصبی و زواید آن با رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله مشخص هستند.

نتایج ایمنوسیتوشیمی، بر علیه NF68,Oligo, GFAP و NF200 (آنتی بادی‌های) به کار برده شده نشان دهنده واکنش مثبت سلول‌های القا شده به این آنتی‌بادی‌ها است. فنوتیپ و مورفولوژی سلول‌ها، جسم سلولی و زواید و استطاله‌های آنها، ویژگی یک سلول عصبی را بروز می‌دهد که در شکل ۳ و ۴ کاملا نمایان است. توسط میکروسکوپ فلورسانس سلول‌ها در دو نوبت با نور معمولی و نور فلورسانس شمارش شدند. نسبت سلول‌های مثبت (با نور فلورسانس) به کل سلول‌ها (با نور معمولی) محاسبه شد. این کار برای ۲۰ فیلد (میدان) و در ۵ نمونه (Cover slip) انجام شد (۲۲). در مجموع پس از ۴۶ ساعت ۸۲/۷۱ درصد سلول‌های القا شده توسط دپرنیل به آنتی بادی NF200 واکنش مثبت دادند.



شکل ۳: A: مشاهده سلول‌های تمایز یافته با نور معمولی پس از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی NF68. B: در همان میدان دید سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته با نور فلورسانس به رنگ سبز و با مورفولوژی عصبی دیده می‌شوند (۷۰ میکرومتر).



شکل ۴: A: مشاهده سلول‌های تمایز یافته (سلول‌های شبه عصبی) با رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی NF200 که شدت نور فلورسانس در سلول‌ها متفاوت است. B: کنترل مثبت ، رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی NF200 مربوط به برش پارافینی بافت مغز. C: مشاهده سلول‌های تمایز یافته (سلول‌های شبه آستروسیتی) پس از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی GFAP. D: مشاهده سلول‌های تمایز یافته (سلول‌های شبه الیگودندروسیتی) پس از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی Oligo (۵۰ میکرومتر)

در مقابل سلول‌های BMSCs القا نشده به این آنتی‌بادی واکنش ندادند. نتیجه شمارش سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با آنتی GFAP نشان می‌دهد که ۲۵/۹۹ درصد سلول‌های القا شده به این آنتی‌بادی پاسخ مثبت دادند ولی گروه کنترل واکنشی ندادند. به عنوان کنترل مثبت، برش پارافینی بافت مغز با آنتی NF200 رنگ‌آمیزی شد که واکنش بافت عصبی به این آنتی‌بادی در شکل ۴B کاملا مشخص است. درکنترل منفی NF200 است که آنتی‌بادی اولیه طی رنگ‌آمیزی حذف شده است.

بحث

استفاده بالینی از BMSCs برای پیوند درمانی دارای مزایای متعددی است. مغز استخوان قابل دسترس تر از سلول بنیادی عصبی و سلول بنیادی رویانی است و چون می‌توان از BMSCs بیمار برای خودش استفاده کرد مشکلات اخلاقی و ایمنی ندارد (۲۳). در ضمن داروی دپرنیل دارای اثرات القایی تمایزی است که قادر است در محیط با ایجاد شرایط خاص بر روی سلول‌هایBMSC اثر تمایزی بگذارد و آنها را به سمت سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی پیش برد. همان گونه که اشاره شد BMSCs پس از استخراج و کشت در شرایط محیط آزمایشگاهی پس از چند پاساژ، مورفولوژی یکسانی پیدا می کند و سرعت تکثیر بالایی دارد (شکل ۱A و ۲)، بسیاری از محققان توانسته‌اند با استفاده از خاصیت چسبندگی BMSCs به پلاستیک و پاساژهای متعدد جمعیت این سلول‌ها را خالص کنند، هر چند که حضور یا عدم حضور مارکرهای سطح سلولی می‌تواند برای تشخیص خلوص BMSCs استفاده شود. سشی و همکاران نشان داده‌اند که ۹۵درصد سلول‌های غیرخون‌ساز (استرومایی) آلکالین فسفاتاز مثبت هستند (۲۴).

در این تحقیق نیز برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی، ابتدا سلول‌های BMSCs با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز (به دو روش یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای) رنگ‌آمیزی شد که تقریبا بیشتر سلول‌ها واکنش دادند (شکل A ۱ و B ۱). با توجه به اینکه BMSCs گلیکوپروتیین فیبرونکتین را بیان می کنند (۲۵)، سلول‌های BMSCs با نشانگر فیبرونکتین به روش ایمنوسیتوشیمی رنگ شد، که ۹۷ درصد سلول‌ها رنگ گرفتند (شکل 1C). این روش توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (۲، ۶، ۲۰). یکی از تفاوت‌های کارهای انجام شده بر روی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عصبی، نوع سرم استفاده شده است که احتمالا وجود عناصر نامشخص در سرم، مشابه یک کامل کننده، اثر تمایز عصبی داشته باشد. عامل دوم گزارش‌های متفاوت در تمایز BMSCs به سلول‌های شبه عصبی، تفاوت در گونه یا نژاد است. تاکنون تمایز BMSCs به سلول‌های شبه عصبی در چندین گونه مثل موش صحرایی، موش کوچک و انسان نشان داده شده است. سومین عامل تفاوت در بین گزارش‌ها، اختلاف در استفاده ازعوامل تمایزی است. بعضی از این عوامل شامل ترکیبی از رتینوییک اسید و فاکتورهای رشد، بتامرکاپتواتانول به اضافه بوتیل هیدروکسی آنیزول، ایزوبوتیل متیل گزانتین به اضافه dibutyryl cAMP، noggin یا Aza-C-5 به اضافه فاکتورهای رشد است. سر انجام، نوع مارکرهای ایمنوهیستوشیمی استفاده شده برای تشخیص آنتی‌ژن‌های عصبی موجب این تغییرات شده است (۱۰). نشان داده شده که عوامل متفاوت، سیتوکین‌های ویژه، فاکتورهای رشد، نوروتروفین‌ها و رتینوییک اسید، القای عصبی و تمایز را در *In vitro* و *In vivo* پیش می‌برند که در القای BMSCs به سلول‌های عصبی استفاده شده است (۵).

در یک مطالعه، برای تمایز سلول‌های بنیادی رویانی از غلظت‌های مختلف دپرنیل استفاده شد که دوز 10^{-8} مولار طی مدت ۲۴ ساعت اثرات تمایز عصبی بیشتری نشان داد (۲۶). همچنین اثرات تروفیک (نوروپروتکتیو) دپرنیل روی نورون‌های دوپامینرژیک کشت شده مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد، دپرنیل اثراتی مشابه BDNF بر روی این سلول‌ها دارد (۲۷). همچنین دپرنیل موجب تحریک سنتز NGF,GDNF و BDNF در آستروسیت‌های موش در شرایط *In vitro* شده است (۲۸). دپرنیل با غلظت 10^{-9} مولار نورون‌های هیپوکامپ را در محیط کشت در مقابل آپوپتوز محافظت می کند (۲۸). همان‌گونه که ذکر شد یکی از عوامل مهم در تمایز سلولی نوع ماده القاکننده محسوب می‌شود، با توجه به نتایج تحقیقات قبلی، در این تحقیق از داروی دپرنیل با دوز 10^{-8} برای القای BMSCs استفاده شد. در این پژوهش از چهار نوع مارکر برای شناسایی سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی استفاده شد (NF68-NF200-GFAP-Oligo) که در گذشته نیز مورد استفاده بوده است. نوروفیلامان‌ها دارای سه عضو (نوروفیلامان NF-H، NF-M، NF-L) بوده و از خانواده فیلامان‌های بینابینی هستند که با تراکم زیاد در طول آکسون نورون‌های مهره‌داران قرار دارند. (Glial fibrillary acidic protein: GFAP) فیلامان بینابینی با قطر ۱۰ نانومتر است که به طور اختصاصی در سلول‌های آستروسیتی وجود دارد. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال O1 و O4 با آنتی‌ژن‌های متفاوتی که در زمان‌های مختلف روی سطح پروژنیتورهای اولیگودندروسیتی بیان می‌شود واکنش می‌دهد (۲۹). تحقیق حاضر در محیط آزمایشگاهی، پس از اثر القایی دپرنیل تمایز سلول‌های BMSCs را مورد بررسی قرار داده است. در ابتدا با رنگ آمیزی اختصاصی کرزیل فاست ویوله که خاص سلول‌های عصبی است، مشخص شد که با اثر القایی دپرنیل این سلول‌ها به سلول‌های شبه عصبی تمایز یافتند. ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول‌ها در شکل ۲ب نشان دهنده یک سلول شبه عصبی با زوایه آکسون و دندریتی است. ۳۶ ساعت پس از القا، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های NF68 و NF200 واکنش دادند که مورفولوژی سلول‌ها و شدت واکنش با نور فلورسانس گویای تمایز عصبی این سلول‌ها است (شکل ۳ و ۴). پس از شمارش سلول‌هایی که با آنتی‌بادی NF200 واکنش دادند، مشخص شد ۸۲/۷۱ درصد سلول‌های القا شده تمایز عصبی پیدا می کنند که این یافته در نوع خود جدید است. درتحقیق دیگر با استفاده از القاکننده متفاوت، درصد کمتری (۷۰ درصد) سلول عصبی گزارش شد (۳۰). اخیرا گزارش شده است که آستروسیت‌های بالغ می‌توانند فرآیند تکوین نورون

(نـوروژنزیس) را تـنظیم کـنند و سـلول‌های بـنیادی را در مـحیط آزمایشگاهی به سمت سرنوشت عصبی هدایت کنند (۱۱). به دلیل نقش مهم آستروسیت‌ها در تکوین دستگاه عصبی و همچنین بلوغ سلول‌های عصبی، در پژوهش حاضر، تمایز BMSCs به آستروسیت نیز مورد آزمایش قرار گرفت. بررسی ایمنوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی آنتی GFAP نشان داد، که دپرنیل می‌تواند با اثر القایی خود، سلول‌های استرومایی را به آستروسیت تمایز دهد که در شکل ۴ مشاهده می‌شود. شـمارش سـلول‌های شبه آسـتروسیتی نـیز نـشان داد کـه ۲۵/۹۹ درصـد سلول‌ها تمایز یافته‌اند. علاوه بر تمایز به سلول‌های شبه آستروسیتی این سلول‌ها به سلول‌های شبه اولیگودندروسیتی نیز تمایز یـافتند که نتیجه آزمـایش نشان دهـنده واکـنش مـثبت سـلول‌های القـا شـده بـه آنـتی‌بادی اختصاصی است و در شکل ۴ مورفولوژی این سلول‌ها با زوایـد کوتاه و منشعب دیده می‌شود. نتایج به دست آمده در خصوص اثر القایی دپرنیل بـر سـلول بـنیادی بـالغ BMSCs بـه سـلول‌های شـبه عـصبی و شـبه آسـتروسیتی و شـبه اولیـگودندروسیتی جـدید است. چـندین تـحقیق بـا استفاده از القـاکننده‌های متفاوت به صورت *in vitro* انجام شده و به روش‌هـای مـختلف نـشان داده که BMSCs تـوانـایی بـیان مـارکرهای نـورونی را دارد. رامـوس و هـمکاران در حـضور رتـینوییک اسـید وBDNF، سـلول‌های BMSCs انـسان و مـوش را تـیمار کـردند. ایـن درمان اجازه داد که BMSCs مارکرهای نورون‌های نابالغ را بیان کنند (۶، ۳۱). وودبـاری و هـمکاران بـتامرکاپتواتـانول را بـه مـحیط کـشت BMSCs رت بالغ اضافه کردند و این سلول‌ها به سرعت به سلول‌های شبه نورونی تمایز یافتند ولی به سلول‌های آستروسیتی تمایز نیافتند (۱۸، ۳۲). دنج و همکاران گزارش داد ند که ترکیبات افزایش دهنده سطح cAMP داخل سلولی نظیر (Isobutylmethylxanthine (IBMX و dibutyryl cAMP (db-cAMP) مـی‌توانـد BMSCs انـسانی کشت شده را تحریک کند و مورفولوژی سلول عصبی ظاهر شود (۱۱). پـادووان نـشان داد که BMSCs انسان وقـتی کـه بـا نـوروتوفین‌ها نـظیر نـوروتروفین (NT3) یـا فـاکتور نـوروتروفیک مـشتق از مـغز (BDNF) تـحریک مـی‌شود مـارکر سـلول عـصبی نـابالغ (βIII-tubulin) را بیان می‌کند (۵).

ژانگ و همکاران نشان دادند که ترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه (bFGF) بـا گـانگلوزید مـمکن است بـه طـور فـزاینده‌ای تـبدیل BMSCs رت بالغ را به سلول شبه عصبی و شبه آستروسیت پیش برد (۱۹). هـمچنین جین‌چو و هـمکاران بـا اثـر اسیدرتینوییک بـر سـلول‌های اسـترومایی مـشاهده کـردند کـه بـا ایـمنواسـتینینگ ۱۰±۸۰ درصـد سـلول‌ها بـرای نـوروفیلامنت مـثبت است کـه بـرای GFAP مـنفی بودند (۳۳).

یاماگوشی و هـمکاران بـا اثـر DMSO، رتـینوییک اسـید و فـاکتور رشـد فـیبروبلاستی پـایه نـشان دادنـد کـه BMSCs چـندین نـوع مـارکر سـلول‌های عـصبی را بـا درصـدهای مـتفاوت (۵۶درصـد بـرای نـستین و ۱۸درصد برای Tuj-1) بیان می‌کنند (۳۴). بررسی کارهای انجام شده نشان می‌دهد که نقش مـاده القـاکننده بـر تـمایز تـعیین کـننده است. از طرفی درصد سلول‌های عصبی به دست آمده نشان دهنده میزان اثر ماده القاکننده و کمیت تمایز است. تحقیقات صورت گرفته بر روی دپرنیل حـاکی از تـوانـایی ایـن دارو بـرای القـای سـلول‌های بـنیادی بـه سـمت سرنوشت عصبی است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق در خصوص اثر دپرنیل به عنوان یک القاکننده عصبی به میزان ذکر شده (۸۲/۷۱ درصد) تا کنون گزارش نشده است. به عـلاوه نـشان داده شـد کـه دپـرنیل بـه عـنوان یک داروی نـوروپروتکتیو مـی‌تواند در شـرایط مـحیط آزمـایشگاهی بـر سـلول‌های اسـترومایی مـغز استخوان اثر القایی داشته باشد و آنها را به سمت سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی تمایز دهد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه تربیت مدرس به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گـذاشـتن امـکانات آزمـایشگاهی و هـمچنین دانـشگاه عـلوم پـایه دامغان که شـرایط را بـرای تـحصیل اینجانب فـراهـم آورده‌اند تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Wislet-Gendebien S, Franz W, Leprince P, Bernard R. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. Brain Rese. Bulletin, 2005; Article in Press

2. Zhao L, Duan W. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol 2002; 174: 11-20

3. Garcia R, Aguiar J, Alberti E, Cuetara K, Pavon N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurothrophic factors. BBRC, 2004; 316 (3): 753-754

4. Padovan CS, Jahn K, Birnbaum T, Reich P, Sostak P, Strupp M, Straube A. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. Cell Transplant. 2003; 12: 839-848

5. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact? Journal of. Neurosc. Rese, 2004; 77: 174-191

6. Sanchez-Romos J, Song S. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp. Neurol, 2000; 164: 247-256

7. Suzuki H, Taguchi T, Tanaka H, Kataoka H, Li Z, Muramatsu K, Gondo T, Kawai S. Neurospheres

induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. Bioche and Biophy. Rese Commun, 2004; 322: 918-922

8. Javazon EH, Colter DC. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. Stem Cells, 2001; 19: 219-225

9. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi S G, Polli E. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. Exp Neurol, 2005; 193: 312-325

10. Brazelton TR, Rossi FMV. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science, 2000; 290, 1775-1779

11. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. Biochem. Biophys. Res. Commun 2001; 282: 148-152

12. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromatal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal brains. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 10711-10716

13. Gritti A, Vescovi AL. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential, J. physio. 2002; 96: 81-90

14. Stewart R, Przyborski S. Non- neural adult stem cells : tools for brain repair? BioEssays, 2002; 24: 708-713

15. Kontkanen O, Castren E. Trophic effects of selegiline on cultured dopaminergic neurons. Brain Rese 1999; 829: 190-192

16. Shimazu S, Katsuki H, Akaike A. Deprenyl rescues dopaminergic neurons in organotypic slice cultures of neonatal rat mesencephalon from N-methyl-D-aspartate toxicity. Euro J Pharma 1999; 377: 29-34

17. Kalman M, Szende B. Deprenyl, a Selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties, NeuroToxicology, 2004; 25; 233-242

18. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 2000; 61: 364-370

19. Zhang H, Wang JZ, Sun HY, Zhang JN, Yang SY. The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation. Chin J Traumatol, 2004; 7: 3-6

20. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. Proc. Natl. Acad. Sci USA ,1998; 95: 3908-3913

21. Carleton HM. Carletons histological technique. Oxford University Press, 1980, 5th edition

22. Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, Kohmura E. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice, Brain Res 2004; 1029: 114-119

23. Lee JB, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Kobayashi H, Hida K, Iwasaki Y. A pre-clinical assessment model of rat autogenic bone marrow stromal cell transplantation into the central nervous system . Brain Rese Proto 2004; 14: 37-44

24. Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human Bone Marrow Stromal Cell: Coexpression of Markers Specific for Multiple Mesenchymal Cell Lineages. Blood Cells, Molecules, and Diseases ,2000; 26: 234-246

25. Ankenya DP, McTigueb DM, Jakemana LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp. Neurol 2004; 190: 17-31

26. Esmaeili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. Rejuvenation Res 2006; 9: 475-84

27. Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra, Nature, 1991; 350: 230-232

28. Salminen A, Suuronen T, Kolehmainen P. Protective effect of Deprenyl against apoptosis induced by okadaic acid in cultured neuronal cells, Biochemical Pharmacology, 2000; 59: 1589-1595

29. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth edition, Catland science, 2001; 926-1125

30. Munos-Elias G, Woodbury D, Black Ira B. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation:

stem cell and precursor function, Stem Cells, 2003; 21: 437-448
31. Sanchez Ramos J. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J. Neurosci. Res 2002; 69: 880-893
32. Woodbury D, Schwarz EJ, Ira BB. Adult Rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. J Neurosc Rese 2002; 61: 364-370
33. Kyung JC, Trzaska KA, Jung JS. Neurons Derived From Human Mesenchymal Stem Cells Show Synaptic Transmission and Can Be Induced to Produce the Neurotransmitter Substance P by Interleukin-1α: Stem Cells 2005; 23: 383-391
34. Yamaguchi S, Kuroda S, Kobayashi H, Shichinohe H, Iwasaki Y. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)-a preliminary study using microarray analysis. 2006, Article In Press.