Archive of SID

دانشور
پزشکی

بررسی ایمنوسیتوشیمی اثر القایی دپرنیل بر روند تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک

نویسندگان: دکتر محمدتقی قربانیان[1*]، دکتر تقی طریحی[2]، دکتر سید علیرضا مصباح‌نمین[3] و دکتر یعقوب فتح‌الهی[2]

۱. استاد گروه زیست شناسی دانشگاه علوم پایه دامغان
۲. استاد دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

* نویسنده مسئول: Email: mtghorbania@yahoo.com

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال پانزدهم – شماره ۷۳
اسفند ۱۳۸۶

وصول: ۸۵/۳/۲۰
ارسال اصلاحات: ۸۵/۸/۷
دریافت اصلاحات: ۸۵/۸/۱۰
پذیرش: ۸۵/۱۲/۷

چکیده

مقدمه: سلول‌های استرومایی مغز استخوان (bone marrow stromal cells :BMSCs) برای درمان سلولی از اهمیت بسیار برخوردار است. این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) به سرعت گسترش یافته، توانایی خود تکثیری دارند. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که BMSC در شرایط مناسب آزمایشگاهی، قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی، نظیر نورون‌ها وگلیا را در شرایط آزمایشگاه و محیط زنده دارد. در این تحقیق توسط روش ایمنوسیتوشیمی، اثر دپرنیل بر تمایز BMSC که از مغز استخوان رت بالغ به‌دست آمده بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: سلول‌های استرومایی از مغز استخوان رت بالغ استخراج و تا پنج پاساژ کشت داده شد. سپس با روش سیتوشیمی و ایمنوفلورسانس برای نشانگر آلکالین فسفاتاز و گلیکوپروتئین فیبرونکتین مورد بررسی قرار گرفت. BMSCs پاساژ پنجم توسط دپرنیل با دوز 10^{-8} مولار القا گردیدند و پس از آن با سلول‌های القا نشده، از نظر بیان BDNF (brain derived neurotrophic factor) و آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز با روش ایمنوسیتو شیمی ارزیابی شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: سلول‌های استرومایی پس از القا با دپرنیل به سلول‌های عصبی تمایز یافتند و آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز و فاکتور رشد عصبی BDNF را بیان کردند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که با اثر القایی دپرنیل با دوز 10^{-8} مولار بر BMSCs، بیان فاکتور رشد عصبی BDNF تحریک شده و طی روند تمایز، سلول‌های استرومایی به سمت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک پیش می‌روند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، دپرنیل، تیروزین هیدروکسیلاز، فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مدت‌های طولانی مغز به عنوان عضوی که قادر به ترمیم نیست مطرح بود، اما کشف جمعیت سلول‌های بنیادی در مغز، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است[۱و۲]. عدم دسترسی آسان به سلول‌های بنیادی عصبی، کاربرد کلینیکی آن را با محدودیت مواجه کرده است. استفاده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) شرایط را برای غلبه بر ریسک‌های تهیه سلول‌های بنیادی از مغز فراهم کرده است[۱]. این سلول‌ها را می‌توان به‌سادگی و به طور مستقیم از فرد دهنده، آسپیره کرد. به علاوه، آن‌ها را می‌توان در شرایط محیط کشت به سرعت گسترش داد[۳]. مطالعات قبلی نشان داد که این سلول‌های پیش‌ساز چند ظرفیتی هستند. آن‌ها تمایز به سلول‌های استخوانی، غضروف، عضله مخطط، آندوتلیوم، سلول‌های عضله قلبی، هپاتوسیت‌ها و سلول‌های عصبی را هم در شرایط آزمایشگاهی و محیط زنده از خود نشان دادند. اخیراً جمعیت سلولی از مغز استخوان، عضله و مغز جدا شده که توانایی تمایز به سه لایه زاینده را نشان داده است[۲و۴]. این سلول‌ها را اصطلاحاً سلول‌های پیش‌ساز بالغ چند ظرفیتی (MAPCs) می‌نامند که نه تنها ظرفیت قابل توجه تمایز به سلول‌های مزانشیمی را دارد، بلکه به سلول‌هایی با ویژگی‌های مزودرم احشایی، نورواکتودرم و آندودرم نیز تمایز می‌یابد [۱،۲،۴،۵،۶،۷،۸،۹و۱۰]. این سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی تحت شرایط آزمایشگاهی خاص، ظرفیت تمایز به سلول‌های رده عصبی، نظیر نورون‌ها و نوروگلیا را در شرایط آزمایشگاهی و محیط زنده دارا هستند [۴و۸]. نکته مهم تحقیقات اخیر در زمینه تمایز BMSCs، روش‌ها و تکنیک‌های اعمال شده است. به عبارتی، تمایز این سلول‌ها مخصوصاً سلول‌های عصبی، بستگی به شرایط محیط کشت و انتخاب نوع تحریک‌کننده و عوامل رشد و یا آثار تنظیمی و القایی انواع فاکتورهای خارجی در شرایط آزمایشگاهی دارد[۱۱و۱۲].

پارکینسون یک بیماری نورولوژیکال است که در اثر کاهش پیشرونده نورون‌های دوپامینرژیک در ماده سیاه مغز و به دنبال آن، کاهش میزان دوپامین در استریاتوم رخ می‌دهد. در مسیر ساخت دوپامین، ابتدا تیروزین هیدروکسیله شده، توسط آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز به دوپا (L-dopa) تبدیل می‌شود. داروی دپرنیل در ابتدا به عنوان داروی ضد افسردگی معرفی شد، ولی بعدها مشخص شد که در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون اثر دارد و امروزه نیز به عنوان داروی ضد پیری استفاده می‌شود. دپرنیل بیان بعضی از mRNAها یا پروتیین‌ها را در سلول‌های عصبی و گلیالی تغییر می‌دهد و بیان ژن و سنتز پروتیین با کاهش در فراگمنته شدن DNA که مشخصه آپوپتوز است همراه است [۱۳،۱۴و۱۵]. نتایج حاصل از یک تحقیق، تأثیر BDNF و دپرنیل بر محیط کشت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک را نشان می‌دهد که سبب افزایش رشد طولی زواید سلولی می‌گردد و اثر دپرنیل به صورت افزایش رشد طولی زواید سلولی است[۹،۱۱و۱۳].

هدف ما در این تحقیق، بررسی اثر دپرنیل بر سلول‌های استرومایی مغز استخوان و تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه عصبی است. فرض ما این است که با اثر دپرنیل، فاکتور رشد عصبی BDNF توسط این سلول‌ها بیان می‌گردد. ضمناً قادر به تمایز به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک بوده، آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز را بیان می‌کند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلولی

سلول‌های استرومایی مغز استخوان از استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی بالغ نژاد اسپراگو داولی (Spragu Dawley) که قبلاً گزارش شده، استخراج گردید[۲و۱۶]. پس از جدا کردن عضلات، دو انتهای استخوان قطع شد و با محیط کشت α MEM کامل شده با سرم FCS (۱۰ درصد)، پنی‌سیلین ۱۰۰IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰mg/ml توسط سوزن ۲۱gauge عمل تخلیه (Flash out) مغز استخوان صورت گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

استرومایی به کف فلاسک چسبیده باقی می‌مانند و سلول‌های خونی حذف گردیدند. هنگامی که سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند، پاساژ داده می‌شد و کشت بعدی با تراکم کم‌تر انجام شد. پاساژ سلول‌ها توسط تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد و EDTA ۰/۰۴ درصد انجام شد و این عمل تا پنج پاساژ ادامه یافت. در این شرایط، سلول‌ها از مورفولوژی یکسان برخوردار می‌شدند. برای ارزیابی میزان حیات (Viability) سلول‌ها به نسبت مساوی با تریپان بلو رنگ شدند. سلول‌های زنده بی‌رنگ و سلول‌های مرده به رنگ آبی مشاهده شدند که پس از شمارش، در مجموع بیش از ۹۵ درصد از سلول‌ها زنده بودند.

القا توسط دپرنیل

در مرحله مقدماتی برای مشاهده اثر القایی دپرنیل با غلظت 10^{-8} مولار بر روند تمایز BMSC به سلول‌های عصبی از رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله استفاده گردید. ابتدا پلیت‌های ۲۴ خانه لامل‌گذاری شد و سپس توسط ژلاتین ۰/۱ درصد آغشته گردید و پلیت مدت یک شب در انکوباتور قرار گرفت. سلول‌های پاساژ پنج پس از تریپسینه‌کردن به تعداد 5×10^{3} در هر یک از خانه‌ها ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها به لامل (Cover slip) آغشته به ژلاتین چسبیده و در شرایطی که سلول‌ها حدود ۶۰ یا ۷۰ درصد لامل را پر کرده بودند، به دو گروه تقسیم شدند. به سلول‌های گروه آزمایش، محیط کشت بدون سرم حاوی دپرنیل غلظت 10^{-8} مولار و به گروه کنترل تنها محیط کشت اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت از اضافه کردن دپرنیل، نمونه‌ها بر داشت و برای انجام عمل ایمنوسیتوشیمی آماده گردیدند.

ایمنوسیتوشیمی

BMSC القاشده توسط دپرنیل در زمان‌های تعیین شده برداشت شد و عمل ثبوت در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس سلول‌ها در معرض HCL (یک نرمال) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفتند و پس از این مرحله توسط بافر بورات (0.1M با PH=8.5) دو بار به مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه با PBS سه بار و هر بار ۵ دقیقه شستشو شدند. نمونه‌ها در معرض Triton X-100 ۰/۳ درصد و سرم بز ۱۰درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز تهیه شده در خرگوش (Chemicon 1:200) بر روی نمونه‌ها ریخته شد. نمونه با یک قطعه پارافیلم به منظور جلوگیری از خشک شدن پوشانده شد و در شرایط مرطوب به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۴°C انکوبه گشت. سپس با PBS سه بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد و مدت یک ساعت در آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوش (۱:۱۰۰) کونژوگه به پراکسیداز قرار داده شد. در ادامه با PBS به مدت ۱۵ دقیقه سه بار شستشو گردید و مدت ۲۰ دقیقه در معرض دی‌آمینوبنزیدین (Sigma: DAB) قرار گرفت. پس از این مرحله با آب مقطر شستشو یافت و آب‌گیری و شفاف‌سازی صورت گرفت.

برای آنتی‌بادی فیبرونکتین وBDNF نمونه‌های سلولی برای ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در محلول فرمالدیید ۴ درصد قرار داده شد. سپس در معرض محلول Triton -۰/۳X درصد حاوی سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و در ادامه با آنتی‌بادی اولیه آنتی BDNF تهیه شده در خرگوش (abcam ;1:200) به مدت یک شب در دمای ۴°C انکوبه شد. پس از شستشو با PBS به مدت ۱۵ دقیقه از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC ضد خرگوش (۱:۱۰۰) برای BDNF و ضدگوسفند (۱:۵۰) برای فیبرونکتین به مدت یک ساعت در دمای اتاق استفاده گردید. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس ZEISS مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

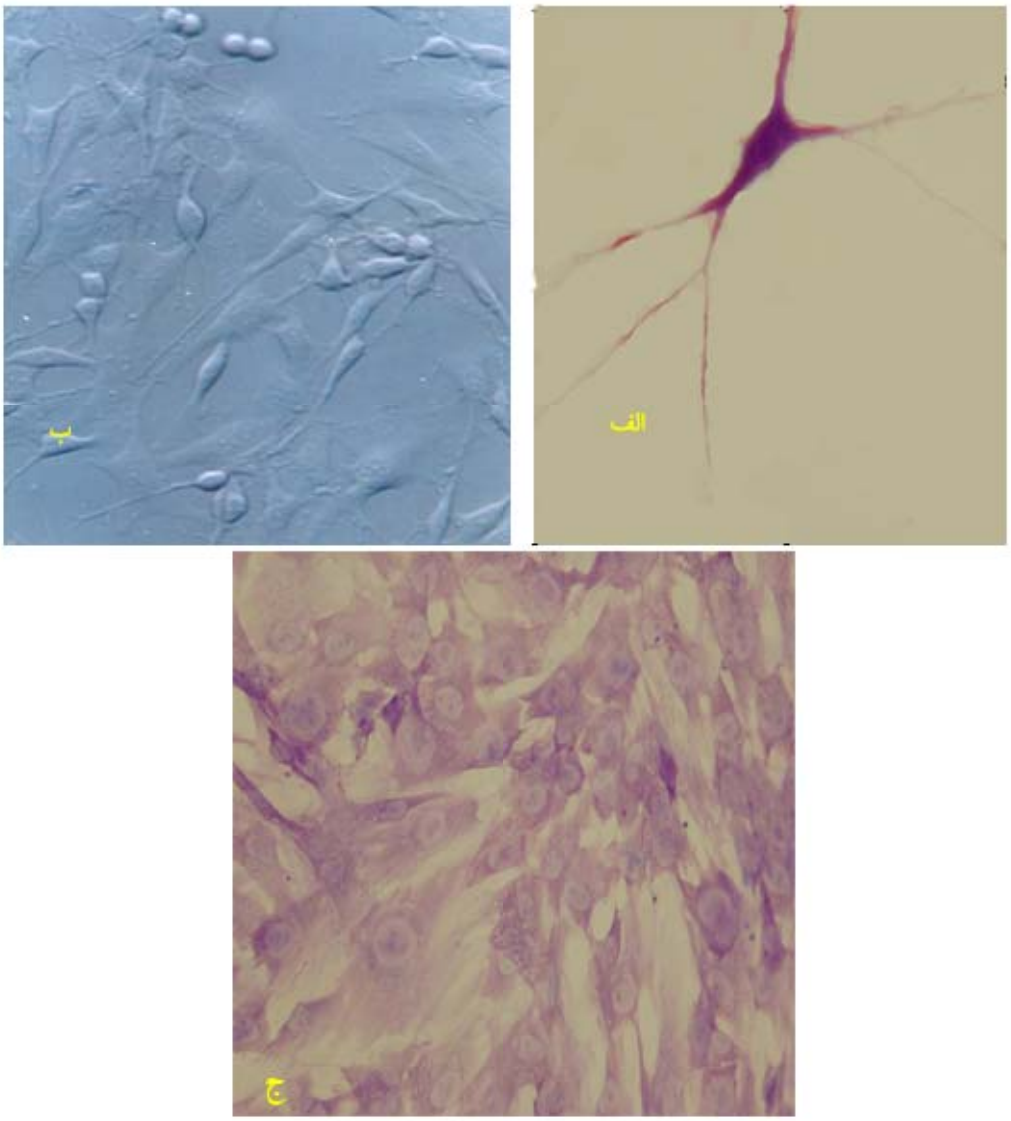
سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌هایی هستند که به ظروف کشت چسبیده، به‌سرعت تکثیر می‌شوند و معمولاً پس از گذشت حدود چهار روز از استخراج، کف ظرف کشت را پر می‌کنند. بعد از اولین پاساژ، سرعت تکثیر و رشد سلول‌ها به گونه‌ای است که به فاصله یک

www.SID.ir

Archive of SID

روز، نیاز به پاساژ دارند. از پاساژ دوم، سلول‌ها از نظر مورفولوژی، ظاهری نسبتاً یکدست و یکنواخت دارند. سلول‌ها معمولاً 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 اکثر 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 (تصویر ۱- ب).

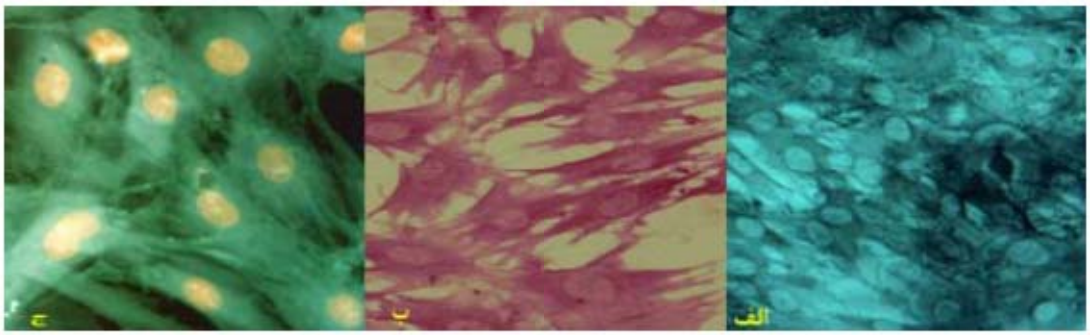
با ارزیابی میزان حیات (viability test) درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۵ درصد بود. همچنین با ارزیابی سیتوشیمی مشخص گردید که درصد قابل توجهی از BMSCهای پاساژ پنجم به آنزیم آلکالین فسفاتاز واکنش می‌دهند. در این تحقیق، سلول‌ها به دو روش یک مرحله‌ای و دو



تصویر ۱ الف) (۱۰۰۰×) رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله که در این روش، سلول‌های عصبی به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند. زوایید سلولی و انشعابات آن، ویژگی سلول عصبی را نمایش می‌دهد؛ ب) (۴۰۰×) توسط میکروسکوپ اینورت سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سه شکل گرد و کوچک، دوکی و کشیده، پهن و بزرگ مشاهده می‌شوند؛ ج) (۴۰۰×) سلول‌های استرومایی القانشده (کنترل).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۲ با بزرگنمایی (۴۰۰×) الف) رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز دو مرحله‌ای که گرانول‌های تیره سیتوپلاسم سلول‌ها، واکنش آنزیم را با رنگ نشان می‌دهد؛ ب) رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز یک مرحله‌ای که سیتوپلاسم سلول‌ها به رنگ صورتی دیده می‌شوند؛ ج) 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 (برای شمارش) مشاهده می‌شوند.

مرحله‌ای برای بررسی واکنش با این آنزیم آزمایش گردیدند. تصویر ۲-ب مربوط به روش یک مرحله‌ای و تصویر ۲-الف مربوط به روش دو مرحله‌ای است که حدوداً ۹۷ درصد سلول‌ها به این آنزیم پاسخ مثبت دادند. علاوه بر این برای اثبات استرومایی بودن سلول‌ها و منشأ مزانشیمی آن‌ها از آنتی‌بادی فیبرونکتین استفاده گردید. تصویر ۲-ج مربوط به این آنتی‌بادی، سلول‌ها را با سیتوپلاسم حاوی رشته‌های سبز رنگ فیبرونکتین نشان می‌دهد که برای شمارش سلول‌های مثبت، توسط اتیدیوم بروماید، هسته سلول‌ها به رنگ قرمز روشن رنگ شده است. ۹۷ درصد سلول‌ها به این آنتی‌بادی واکنش نشان دادند.

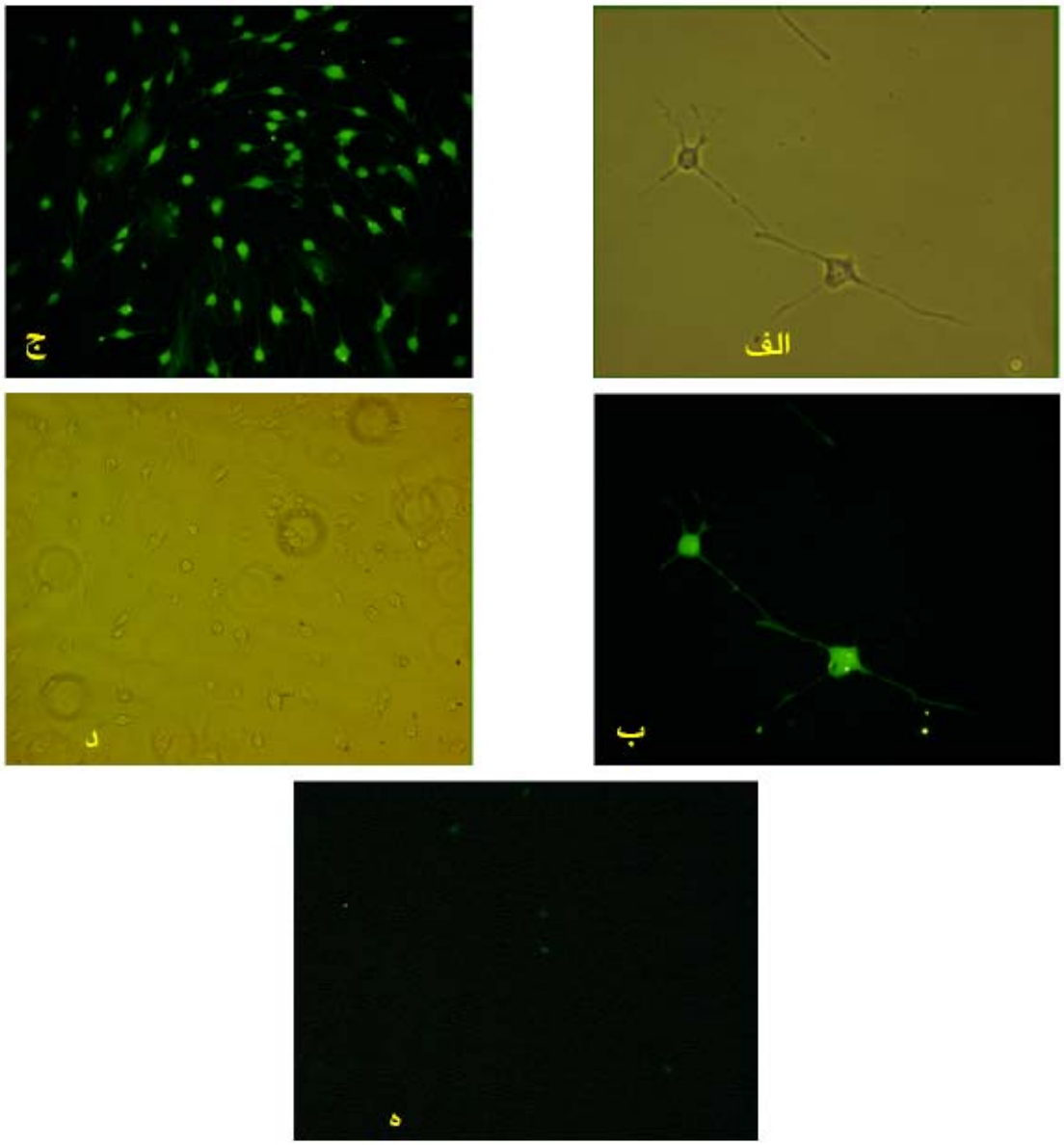
از آن‌جا که رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله به عنوان رنگ‌آمیزی اختصاصی برای سلول‌های عصبی شناخته می‌شود BMSC ۲۴ ساعت پس از اثر القایی دپرنیل رنگ‌آمیزی شده که سلول‌های عصبی پس از واکنش به رنگ بنفش تیره دیده می‌شدند. تصویر ۱-الف، سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته را نشان می‌دهد که جسم سلولی چند وجهی با تعدادی استطاله کوتاه منشعب مشابه دندریت و یک زایده بلند شبه آکسون دارند. در انتهای زواید، برجستگی‌هایی دیده می‌شود که نظیر آن را در سلواهای عصبی تحت عنوان فیلوپودیا می‌شناسیم.

به منظور تأیید نتایج به‌دست‌آمده از رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله لازم است سلول‌های تمایز یافته با روش ایمنوسیتوشیمی نیز مورد ارزیابی قرار گیرند. یکی از انواع آنزیم‌هایی که در سلول‌های عصبی دیده می‌شود تیروزین هیدروکسیلاز است که توسط سلول‌های عصبی دوپامینرژیک ساخته می‌شود. به روش ایمنوسیتوشیمی، علیه این آنزیم آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز به‌کار برده شد و درصد قابل توجهی از سلول‌های تمایز یافته به این آنتی‌بادی واکنش مثبت دادند. گرانول‌های قهوه‌ای تیره در سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته عصبی، گواه این گفته است. از طرفی مورفولوژی سلول ها، جسم سلولی و زواید و استطاله‌های آن‌ها، نشان‌دهنده ویژگی‌های یک سلول عصبی است که در تصویر ۴ کاملاً نمایان است. در گروه کنترل، واکنش نسبت به آنتی‌بادی مشاهده نشد.

آزمون دیگر، سنجش واکنش سلول‌های القاشده توسط دپرنیل به آنتی BDNF (فاکتور رشد عصبی) است. از سلول‌ها در یک میدان دید، هم با نور معمولی و هم با نور فلورسانس که واکنش سلول‌ها به این آنتی‌بادی را نشان می‌دهد تصویر تهیه شد (تصاویر ۳-الف، ب، ج، د). سلول‌هایی که در معرض القاکننده نبودند (گروه کنترل) واکنشی به آنتی‌بادی نشان ندادند.

www.SID.ir

Archive of SID



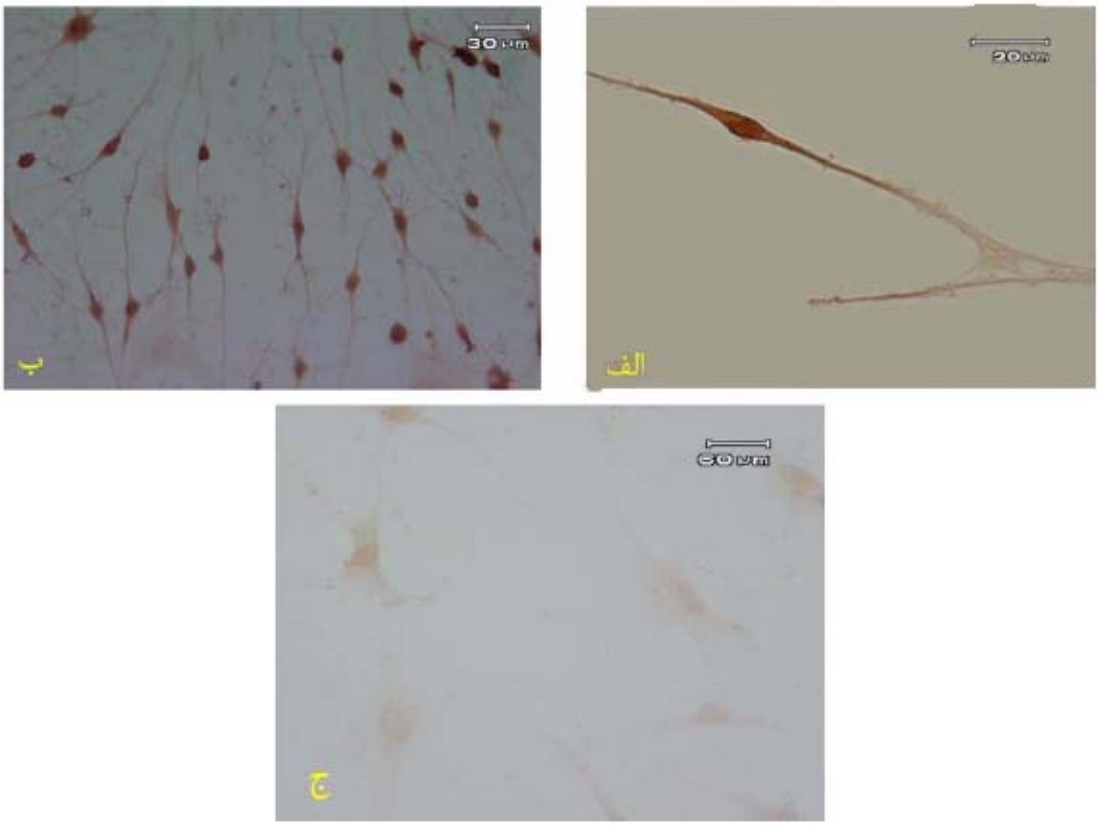
تصویر ۳ تصاویر ایمنو فلورسانس، الف و ب (۴۰۰×)، ج و د (۲۰۰×) به ترتیب با نور معمولی و نور فلورسانس سلول‌های شبه عصبی واکنش داده با آنتی BDNF را نشان می‌دهد. مورفولوژی سلول‌ها مخصوصاً در تصاویر الف و ب جسم سلولی چند قطبی زوایـد بلنـد و انشعابات مشخص است. ه) کنترل منفی.

بحث

همان‌طور که قبلاً گزارش شده BMSCs قادرند به ظـروف کـشت پلاسـتیکی چـسبیده و تکثیـر شـوند [۳،۱۶و۱۷]. سلول‌های استرومایی مغـز اسـتخوان بـه ظـروف کـشت چسبیده و بدین‌ترتیب از سلول‌های خونی که قادر به این کار نیستند جدا و نیز به سرعت تکثیر می‌شوند. سلول‌های بنیادی با دو ویژگی معرفی می‌شوند؛ یکی خودتکثیری و دیگری چند ظرفیتی بودن. سرعت تکثیر بـالای BMSC و قدرت خود تکثیری آن‌ها کـه جـزء اولـین ویژگـی‌هـای سلول‌های بنیـادی اسـت در ایـن تحقیـق مـشاهده شـد. سـلول‌هـا از نظـر مورفولـوژی از پاسـاژ دوم، ظـاهری یک‌دست و یکنواخت دارند. مـشاهدات ایـن تحقیـق بـا گزارش‌هایی که در خصوص مشخـصات و ویژگـی‌هـای

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ٤ تصاویر الف) (۱۰۰۰×) و ب) (۲۰۰×)، رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی HRP علیه آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز که سلول‌های شبه عصبی حاوی این آنزیم به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند. تصویر الف، جایگاه اتصال (سیناپس) زایده آکسون مانند یک سلول را به سلول بعدی نشان می‌دهد. ج) (۴۰۰×) کنترل (سلول‌های القانشده).

مورفولوژیک این سلول‌ها موجود است مطابقت دارد [۳و۱۷].

برای ارزیابی و تعیین استرومایی بودن این سلول‌ها از دو روش استفاده شد. رنگ‌آمیزی سیتوشیمی آلکالین فسفاتاز یکی از معیارهایی است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که این کار قبلاً نیز گزارش شده است [۷]. علاوه بر این با روش ایمنوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی فیبرونکتین حدود ۹۷ درصد سلول‌های استرومایی مغز استخوان به این آنتی‌بادی واکنش مثبت نشان دادند. بیان پروتیین رشته‌ای فیبرونکتین در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، مثل سلول‌های استرومایی قبلاً گزارش شده که پاسخ این سلول‌ها به آنتی‌بادی فیبرونکتین و درصد آن‌ها، حاکی از یک‌دست بودن و یکنواختی سلول‌ها است[۱۸].

علاوه بر توانایی خودتکثیری که در BMSCها دیده می‌شود، گزارش های متعدد گواه این است که این سلول‌ها دارای ظرفیت تمایزی وسیع بوده، قابلیت تمایز به چندین نوع سلول مختلف از جمله سلول‌های عصبی را دارند. گزارش‌هایی مبنی بر این‌که سلول‌هایی از مغز استخوان، ظرفیت تبدیل و تکوین به رده‌های عصبی نظیر نورون‌ها و آستروسیت‌ها را در شرایط آزمایشگاهی و محیط زنده دارا هستند، ارائه شده است [۱،۲،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰]. به هر حال به دلیل محدویت‌های استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی جنینی و رویانی و همچنین محدود بودن منابع سلول بنیادی عصبی بالغ، سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به عنوان منبعی با ارزش برای درمان بیماری‌های عصبی شناخته شده‌اند [۲و۱۹]. یکی از نکات مهم در تحقیقات اخیر در

www.SID.ir

Archive of SID

خصوص تمایز BMSC به سلول‌های عصبی و نوروگلیالی، نوع روش‌ها و تکنیک‌های اعمال شده است. به عبارتی، تمایز این سلول‌ها مخصوصاً تمایز به سلول‌های عصبی، بستگی به شرایط محیط کشت دارد [۱۱و۱۲]. در این تحقیق از داروی دپرنیل با غلظت 10^{-8} استفاده گردید و اثر آن بر تمایز BMSC مورد آزمایش قرار گرفت. نشان داده شده که دپرنیل، بیان بعضی از mRNAها یا پروتیین‌ها را در سلول‌های عصبی و گلیال تغییر می‌دهد و از طرفی، اثر دپرنیل بر محیط کشت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک، مشابه اثر فاکتور رشد عصبی BDNF موجب افزایش رشد طولی زواید سلولی می‌گردد [۱۳،۱۴و۱۵]. هدف ما در این تحقیق نشان دادن این نکته است که با اثر دپرنیل بر BMSC، بیان فاکتور رشد عصبی BDNF تحریک گردیده و به دنبال بیان و یا افزایش بیان این فاکتور، سلول‌های استرومایی به سمت سلول‌های دوپامینرژیک سوق داده می‌شوند. نتیجه آزمایش‌ها نشان می‌دهد که سلول‌ها پس از القا به لحاظ شکل ظاهری در محیط کشت فنوتیپ یک سلول عصبی را نشان می‌دهند که با گزارش‌های مربوط قابل مقایسه است[۱و۲]. از طرف دیگر، ارزیابی آن‌ها با روش ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌بادی BDNF و پاسخ مثبت آن‌ها به این آنتی‌بادی، حاکی از بیان BDNF توسط این سلول‌ها است. به دنبال بیان BDNF، واکنش سلول‌ها به آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز نشان‌دهنده این است که سلول‌ها در مسیر تمایز به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک تمایز یافته‌اند. ویژگی‌های ظاهری سلول‌ها در نمای میکروسکوپی و اندازه و طول رشته‌ها و زواید سلولی و نیز مورفولوژی سلول‌ها، مؤید این موضوع است.

ایده شرکت سلول‌های مغز استخوان در پارانشیم مغز، یک ایده قدیمی است. چینی‌های باستان معتقد بودند، مغز استخوان منبع بافت مغز است [۹].

در تحقیقی، تیمار BMSCهای رت بالغ توسط بتامرکاپتواتانول بررسی گردید و گزارش شد که سلول‌ها، ساختمان‌هایی را ازخود نشان می‌دهند که یادآور زواید عصبی است که به مخروط رشد و فیلوپودیا ختم می‌شود [۲]. آنچه ما در تصاویر مربوط به نمای ظاهری یک سلول که به آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز واکنش داده مشاهده می‌کنیم، همان مخروط‌های رشد و فیلوپودیای یک سلول عصبی است، مخصوصاً در تصویر ۴ الف که جایگاه اتصال انتهای آکسون را به دندریت سلول دیگر نشان می‌دهد.

در تحقیق دیگر BMSC پس از شش پاساژ توسط RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که فاکتورهای رشد عصبی NGF و GDNF توسط این سلول‌ها بیان می‌شود. این محقق عنوان کرد که فاکتورهای نوروتروفیک بقای عصبی را سبب شده، رشد اکسونی را تحریک می‌کنند [۲۰]. از طرفی خانواده نوروتروفین‌ها برای تکوین نورون‌ها ضروری است. BDNF در زمان رشد و بلوغ سیستم عصبی به طور گسترده توزیع شده، نقش معناداری در تکوین، بقا و ترمیم سلول عصبی ایفا می‌کند[۱۸]. همچنین بیان این فاکتور رشد در سلول‌های عصبی عامل مهمی جهت تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های دوپامینرژیک است.

اسماعیلی (۲۰۰۴) دپرنیل را با دوز 10^{-8} مولار بر سلول‌های بنیادی جنینی اثر داد و این سلول‌ها تحت اثر القایی به سلول‌های عصبی تمایز یافتند و ژن‌های BDNF,NGF و NT3 را بیان کردند [۲۱]. از جنبه کلینیکی، توانایی تمایزBMSC به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک، تحت اثر القایی دپرنیل قابل توجه است و برای درمان پارکینسون و درمان سلولی روش جدیدی محسوب می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر و مقایسه آن با کارهای انجام شده می‌توان بیان کرد که با اثر القایی دپرنیل بر BMSC بیان فاکتور رشد عصبی BDNF تحریک شده و در مسیر تمایز عصبی سلول‌های استرومایی به سمت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک قرار می‌گیرند که در مقایسه با کارهای صورت گرفته، نو و جدید محسوب می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

سلول‌های استرومایی مغز استخوان تحت اثر القایی دپرنیل به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک تمایز یافته است. این تحقیق و سایر تحقیقات مشابه، امکان کاربرد BMSC را برای درمان پارکینسون و سایر ضایعات عصبی نشان می‌دهد و این سلول‌ها را جایگزینی مناسب برای سلول‌های از دست رفته در بافت آسیب دیده معرفی می‌کند.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه تربیت مدرس به واسطه پرداخت هزینه مواد و وسایل و امکانات آزمایشگاهی که در اختیار گذاشته‌اند و همچنین دانشگاه علوم‌پایه دامغان تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Hidenori S., Toshihiko T., Hiroshi T., Hideo K., Zhenglin L., Keiichi M., Toshikazu G., Shinya K.: "Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes", Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004: 322; 918–922.

2. Woodbury D., Schwarz E.J., Ira B. B.: "Adult Rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons", Journal of Neuroscience Research, 2002: 61; 364-370.

3. Colter D.C., Sekiya I. and Prockop D.J.: "Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells", PNAS, 2001: 98; 7841–7845.

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

5. Jiang, Y., Jahagirdar B.N.: "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow", Nature, 2002: 418; 41-49.

6. Jiang Y., Henderson D.: "Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult projenitor cells", Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 2003: 100; 11854- 11860.

7. Modderman W.E., Lammers T.V., Lowik C. W.G.M.: "Removal of hepatopoietic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells", International Society for Experimental Hematology, 1994: 22; 194-201.

8. Sanchez Romos J. Song S.: "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro", Experimental Neurology, 2000: 164; 247-256.

9. Song S., Sanchez R.J.: "Brain as the sea marrow", Academic, 2003: 184; 54-60.

10. Tohill M., Mantovani C.: "Rat bone marrow mesenchymal stem clls express glial markers and stimulate nerve regeneration", Neuroscience Letters, 2004: 362; 200-203.

11. Gritti A., Vescovi A.L.: "Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential, Journal of physiology", 2002: 96; 81-90.

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

13. Kontkanen O., Castren E. "Trophic effects of selegiline on cultured dopaminergic neurons", Brain Research, 1999: 829; 190–192.

14. Lu P., Jones L.L., Tuszynski M.H.: "BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury", Experimental Neurology, Article In Press, 2004.

15. Shimazu Seiichiro, Katsuki Hiroshi, Akaike Akinori,: "Deprenyl rescues dopaminergic neurons in organotypic slice cultures of neonatal rat mesencephalon from N-methyl-D-aspartate toxicity", European Journal of Pharmacology, 1999: 377; 29–34.

16. Azizi S. A., Stokes D., Augelli B. J.,Digirolamo C., Prockop D. J. :"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.

17. Bianchi G., Banfi A.: "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. Experimental Cell Research", 2003: 287; 98-105.

18. 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.

19. Safford K.M., Hicok K.C.: "Neurogenic differentiation of murin and human adipose-derived", BBRC, 2002: 294 (2) ; 371-379.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Rocio G., Jore A.: "Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurothrophic factors", BBRC, 2004: 316 (3); 753-754.

۲۱. اسماعیلی، فریبا: ارزیابی القاء بیان ژن فاکتورهای نوروتروفیک توسط دپرنیل در سلول‌های بنیادی رویانی پس از تمایز این سلول‌ها به اپیتلیوم عصبی، پایان‌نامه دکتری، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، ۱۳۸۳.

www.SID.ir