

## ***Effect of Different Doses of Staurosporine for Neuronal Differentiation of PC-12 Cell Line***

***Sadri S., M.Sc., Davari zanjani M., M.Sc., Azadbakht M., Ph.D.\*, Amini A., Ph.D., Amiri E., Ph.D.***

*\* P.O.BOX: 67149-67346, Biology Department, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran*

### **Abstract**

**Purpose:** The present study was designed to investigate the effect of different doses of Staurosporine on differentiation of PC-12 cell line into differentiated neuronal cells.

**Materials and Methods:** PC-12 cell line as a useful model system for neurobiological studies was maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Staurosporine were added to culture medium in different concentrations (110, 214, 316 and 1000 nM), then morphology and apoptotic index were assessed by total neurite length estimation and TUNEL staining.

**Results:** Data showed that total neurite length of PC-12 cells that were treated with 110, 214, 316 and 1000 nM was  $44\pm 9.3$ ,  $153\pm 15.0$ ,  $104\pm 10.4$  and  $31\pm 9.6\mu\text{m}$  respectively. Therefore PC-12 cells that were treated with 214 nM Staurosporine had the greatest neurite length in comparison with the other concentrations ( $P<0.05$ ). In addition apoptotic index in these concentrations was  $3\pm 0.7$ ,  $4\pm 0.8$ ,  $8\pm 1.0$  and  $10\pm 1.1$  respectively, Therefore PC-12 cells that were treated with 110 and 214 nM Staurosporine had minimal apoptotic index ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Finally it can be concluded that 214 nM concentration of Staurosporine is an optimum concentration for differentiation of neuronal cell lines to differentiated neuronal cells.

**Key words:** Neuronal Differentiation, Staurosporine, Apoptosis, PC-12

## اثر غلظت‌های مختلف استئورسپورین در تمایز عصبی سلول‌های رده PC-12

سهیل صدری <sup>M.Sc.\*</sup>، مریم داوری زنجانی <sup>M.Sc.\*</sup>، مه‌ری آزادبخت <sup>Ph.D.\*</sup>علی امینی <sup>Ph.D.\*</sup>، ایرج امیری <sup>Ph.D.\*\*</sup>

\* گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

\*\* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

تاریخ وصول: تیرماه ۸۶، تاریخ پذیرش: شهریورماه ۸۶

## چکیده

**هدف:** به دست آوردن غلظت مناسب استئورسپورین برای القای تمایز عصبی در سلول‌های رده PC-12  
**مواد و روشها:** در این بررسی رده سلولی PC-12 رشد یافته در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) همراه با ۱۰ درصد سرم، تحت تیمار با غلظت‌های ۱۱۰، ۲۱۴، ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار استئورسپورین قرار گرفت. سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف استئورسپورین از نظر مورفولوژی، با اندازه‌گیری میزان طول نوریت‌های هر سلول تمایز یافته و همچنین از نظر القای آپوپتوز با روش رنگ آمیزی TUNEL (Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) و مقایسه شاخص آپوپتوز ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** طول نوریت‌ها در سلول‌های تیمار یافته با غلظت‌های ۱۱۰، ۲۱۴، ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار به ترتیب  $4.10 \pm 0.4$  و  $9.31 \pm 0.6$  میکرو متر بود که در این بین سلول‌های تیمار یافته با غلظت ۲۱۴ نانومولار در مقایسه با سایر غلظت‌ها به طرز معنی داری دارای بلندترین نوریت‌ها بودند ( $p < 0.05$ ) همچنین شاخص آپوپتوز در این سلول‌ها به ترتیب  $0.73 \pm 0.4$ ،  $0.84 \pm 0.8$  و  $1.08 \pm 1.0$  بود که در بین آنها میزان القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۱۰ و ۲۱۴ نانومولار به طرز معنی داری در مقایسه با غلظت‌های ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار کمتر بود ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** غلظت ۲۱۴ نانومولار استئورسپورین می‌تواند با ایجاد بلندترین نوریت‌ها و القای کمترین میزان آپوپتوز در سلول‌های رده PC-12، این سلول‌ها را به سمت نورون‌های بالغ متمایز کند؛ بنابراین می‌تواند به عنوان غلظت تمایزدهنده مناسب این ماده استفاده شود.

**کلیدواژه‌ها:** تمایز عصبی، استئورسپورین، آپوپتوز، PC-12

## مقدمه

سلول‌های عصبی در محیط آزمایشگاه علاوه بر افزایش درک ما از مکانیسم‌های تکوین، ابزار سودمندی را در شناخت روند بیماری‌های نورودژنراتیو فراهم می‌سازد.

امروزه رده‌های سلولی به طور گسترده‌ای در مطالعات پاتوفیزیولوژی بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های دستگاه عصبی استفاده می‌شوند اما استفاده از آنها به علت تقسیم پذیری و نداشتن خصوصیات یک سلول عصبی بالغ با مشکلاتی همراه است [۱]. در این بین رده سلولی PC-12 به

طی تکوین سیستم عصبی در پستانداران انواع مختلف سلول عصبی ایجاد می‌شود که مسیرهای تکوین طبیعی اغلب این گروه‌های سلولی هنوز کاملاً مشخص نیست. مطالعه تکوین

آدرس مکاتبه: کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی ۶۷۳۴۶-۶۷۱۴۹

E-mail: azadbakht@razi.ac.ir

که تشکیل کمپلکس سیلکین-CDK راساماندهی می کنند، همانند سازی DNA را مهار کرده و چرخه سلول را از فاز تقسیم خارج و سبب تمایز سلولها می شود [۶]. استورسپورین برای ایجاد زواید نوریتی بر خلاف NGF که در سطح رونویسی بیان ژن tau را افزایش می داد، روی خود پروتئین tau اثر گذشته واز طریق مهار MAP2 کیناز که باعث فسفریله کردن پروتئین tau و در نهایت مختل کردن فعالیت آن در پایداری میکروتوبولها و زواید نورونی می شود، فسفریلاسیون این پروتئین را به میزان قابل توجهی کم کرده و به این ترتیب شرایط را برای اتصال مناسب پروتئین tau به میکروتوبولها و در نهایت ایجاد و پایداری زواید نوریتی فراهم می کند [۱۸ و ۱۹]. همین خاصیت استورسپورین در دفسفریلاسیون پروتئین tau سبب شده که دانشمندان تلاش خود را در استفاده از این ماده به عنوان دارویی در درمان بیماری آلزایمر که در آن فسفریلاسیون بیش از حد پروتئین tau رخ می دهد متمرکز کنند [۲۰ و ۲۱].

با توجه به ویژگیهای رده سلولی PC-12، این سلولها ابزاری سودمندی برای درک بهتر مکانیسمهای مولکولی در فرایند نورن زایی و تشکیل سیستم عصبی در طی روند تکوینی پستانداران به شمار می آیند. در این مطالعه از غلظتهای متفاوت استورسپورین به عنوان عامل القاگر تمایز سلولهای عصبی استفاده شد تا نقش نورون زایی آن بدون القای آپوپتوز در محیط آزمایشگاه بررسی شود.

## مواد و روشها

### کشت سلولهای رده PC-12

در این مطالعه رده سلولی در حال رشد PC-12 (شکل ۱- ) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI)<sup>۴</sup>

دلیل داشتن پتانسیل تمایزی به نورون بالغ بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [۲]. این رده سلولی در پاسخ به اثر طولانی مدت NGF از تقسیم می ایستد و با ایجاد زواید نوریتی بلند به سمت تشکیل یک نورون بالغ تمایز می یابد [۳ و ۴]. NGF بامتوقف کردن چرخه سلولی در فاز G1 از طریق افزایش غلظت داخل سلولی پروتئینهایی مانند p53 و p21/WAF1 [۵ و ۶] و سپس ایجاد زواید نوریتی و پایدار کردن میکروتوبولها در امتداد این زواید [۷-۹] توسط افزایش بیان ژنهای tau [۸] و MAP ۲، سبب تمایز سلولهای عصبی می شود [۱۰ و ۱۱].

علاوه بر NGF ماده شیمیایی دیگری به نام استورسپورین<sup>۳</sup> برای تمایز سلولهای عصبی استفاده شده است [۱۲ و ۱۳]. استورسپورین یک محصول طبیعی از الکلوییدهای خانواده k252a است که در سال ۱۹۷۷ از باکتری Streptomyces staurosporeus تخلیص شد [۱۴]. این ماده اخیراً به علت اثرمهار کنندگی غیراختصاصی پروتئین کینازها و تمایز ردههای عصبی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است [۱۵ و ۱۶].

استورسپورین بسته به غلظت به کار برده شده آن دارای عملکردی چندگانه است به عبارت دیگر رفتاری وابسته به غلظت دارد، به طوری که در غلظت ۵ نانو مولار اثر تمایزی NGF را مهار کرده [۱۶]، غلظتهای ۵۰ تا ۳۵۰ نانو مولار آن سبب تمایز ردههای سلولی در حال تقسیم به نورونهای بالغ می شود [۱۷] و در غلظت ۱۰۰۰ نانو مولار سبب القای آپوپتوز در نورونها می شود [۱۶]. در مقایسه با NGF، استورسپورین بسیار سریعتر سبب تمایز سلولهای عصبی و ایجاد نوریتهای بلند در آنها می شود [۱۷]. استورسپورین برخلاف NGF اثری بر غلظت پروتئین p53 و فرودستهای آن ندارد بلکه با مهار مستقیم p33cdk2 و p34cdc2

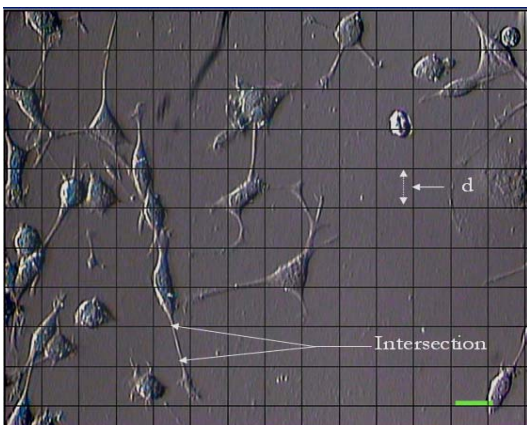
1. Nerve Growth Factor

2 - Microtubule Associated Protein

3 - Staurosporine (SSP)

4 - National Cell Bank of Iran (NCBI)

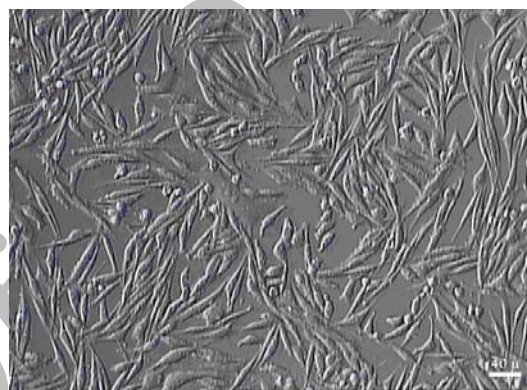
ردهٔ PC-12 با تراکم ۱۰۴ سلول در هر خانهٔ ظرف کشت ۲۴ خانه، کشت شدند و پس از تمایز مورد ارزیابی مورفولوژیکی قرار گرفتند.



شکل ۲. ارزیابی مورفومتریک سلولهای تمایز یافته PC-12 از طریق قرار دادن تصویر سلول در پس زمینه ی دارای خطوط با فاصله های مشخص و شمارش intersection ها. بار: ۲۰ میکرومتر

یکی از بهترین شاخصها برای ارزیابی مورفولوژی نورونها اندازه گیری طول کل نوریتهای آن تحت عنوان (TNL)<sup>۳</sup> است. برای این کار روش شمردن Intersectionها مناسب ترین روش است [۲۲]. در این روش که توسط رن (Ronn) معرفی شد از سلولهای عضبی تمایز یافته (نورونها) به صورت نقاط تصادفی در ظرف کشت (هر غلظت ۴ خانه و هر خانه ۱۰۰ سلول) با میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus IX-71, Japan) مجهز به دوربین عکس گرفته و در یک پس زمینه تعریف شده با خطوطی با فاصله‌های مشخص (d) قرار داده شد. تعداد نقاطی که نوریتها خطوط افقی را قطع می‌کنند تحت عنوان Intersection شمردن (شکل ۲) و پس از قرار دادن در فرمول زیر، مقدار حاصل به عنوان طول کل نوریتهای یک نورون (TNL) محاسبه شد.

استفاده شد. برای رشد و تکثیر این سلولها از محیط کشت RPMI 1640 (Gibco,UK) همراه با افزودنیهای شامل ده درصد L-Glutamine (Sigma,USA)، دو میلی مولار FBS(Gibco,UK) و یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری<sup>۱</sup> (Sigma, USA) استفاده شد. سلولها در فلاسکهای کشت ۴۰ میلی لیتری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با CO2 به میزان ۵ درصد نگهداری شدند.



شکل ۱. سلولهای در حال تقسیم و تمایز نیافته رده سلولی PC-12. بار: ۴۰ میکرومتر

### تمایز سلولهای رده PC-12

بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، برای القای تمایز در سلولهای رده PC-12، این سلولها به مدت ۵ ساعت تحت تیمار غلظتهای مختلف استئورسپورین (Alexis,USA) شامل غلظتهای ۱۱۰، ۲۱۴، ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار قرار گرفتند و پس از این مدت سلولها برای بررسی خصوصیات مورفولوژیک و همچنین میزان القای آپتوز در اثر تیمار استئورسپورین ارزیابی شدند و در هر ارزیابی، آزمایشها ۴ بار تکرار شد.

### ارزیابی مورفولوژیک سلولهای تمایز یافته

برای فراهم نمودن امکان مشاهده مجزا و دقیق تر، سلولهای

3 - Total Neurite Lentgh

1 - Fetal Bovine Serum  
2 - Non- Essential Amino Acid

کشت همراه با اتانل ۵ درصد، به عنوان القاگر قوی آپوپتوز، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در این آزمایش از هر خانه ظرف کشت، ۴۰ زمینه میکروسکوپی (بزرگنمایی  $100 \times$ ) به طور تصادفی بررسی شد.

### بررسیهای آماری

داده‌های مربوط به طول نوریتها و شاخص آپوپتوز به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین بیان شد و از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) با روش Post Hoc Test (Tukey HSD) برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین غلظتهای مختلف استئورسپورین استفاده شد و تفاوتها با  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

به منظور انتخاب مناسب ترین غلظت تمایز دهنده استئورسپورین با توجه به نقش وابسته به غلظت آن در القای تمایز و ایجاد زواید نورونی در سلولهای عصبی، نتایج حاصل از ارزیابیهای مورفولوژیکی و بررسی شاخص آپوپتوز به طور همزمان مورد توجه قرار گرفت.

نتایج به دست آمده حاصل از بررسی مورفولوژیکی سلولهای تمایز یافته PC-12 نشان داد که میانگین طول نوریتها در سلولهای تیمار یافته با غلظتهای ۱۱۰، ۲۱۴، ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار به ترتیب  $44 \pm 9/3$ ،  $153 \pm 15$ ،  $104 \pm 10/4$  و  $31 \pm 9/6$  میکرو متر بود. در این میان تیمار با غلظت ۲۱۴ نانومولار استئورسپورین با اختلافی معنی دار ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با سایر غلظتها، سبب القای تمایز و ایجاد بلندترین نوریتها در سلولهای رده PC-12 شده بود. پس از غلظت ۲۱۴ نانومولار، تیمار با غلظت ۳۱۶ نانومولار بلندترین نوریتها را ایجاد کرده بود، در حالی که غلظت ۱۱۰ نانومولار استئورسپورین نتوانسته بود بسیاری از سلولها را از لحاظ مورفولوژیکی کاملاً

$$TNL = \frac{\pi \cdot d}{2} \times I$$

TNL = طول تمام نوریتهای یک نورون

d = فاصله بین دو خط افقی (۲۰ میکرومتر)

I = تعداد intersectionها

$$\pi = 3.14$$

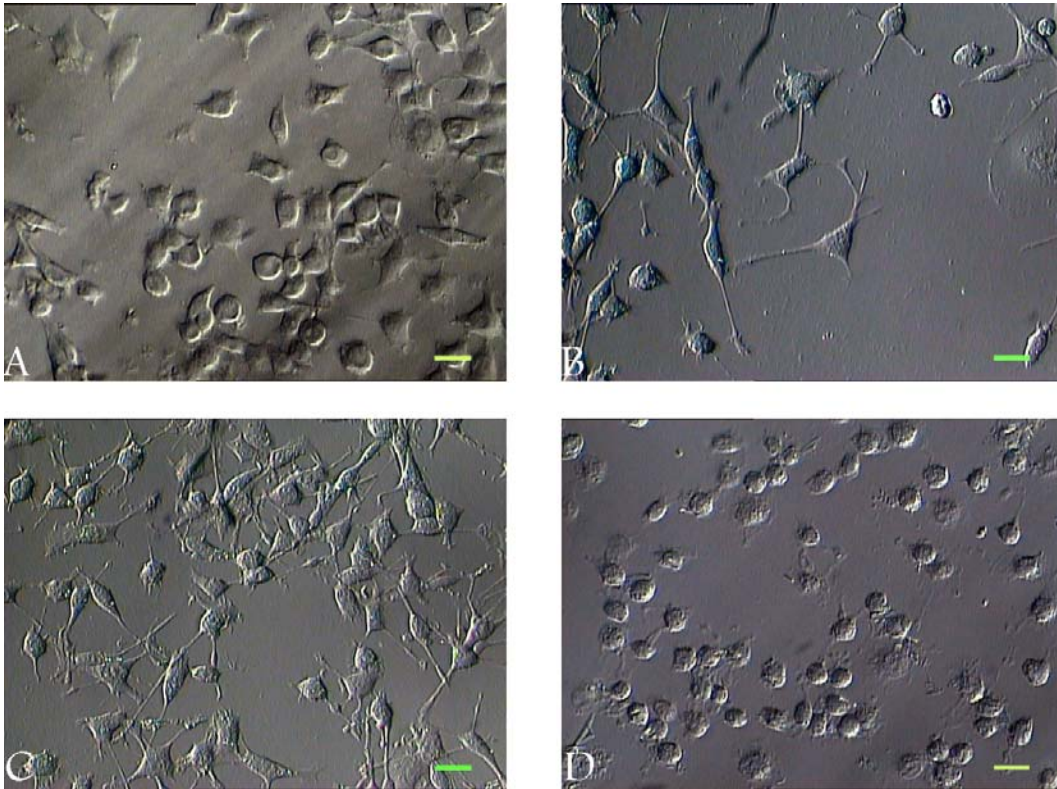
### بررسی وقوع آپوپتوز در سلولهای تمایز یافته

برای بررسی میزان آپوپتوتیک بودن غلظتهای مختلف استئورسپورین از رنگ آمیزی TUNEL استفاده شد. این نوع رنگ آمیزی روشی برای مشخص کردن قطعه قطعه شدن منظم DNA در جریان مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است [۲۳]. برای انجام این آزمایش، سلولها با تراکم  $10^3$  سلول در هر خانه ظرف کشت ۹۶ خانه کشت و پس از تمایز با استئورسپورین توسط پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شدند. نفوذ پذیری غشای سلولها با استفاده از محلول ۰/۲ درصد Triton X-100 (Sigma, USA) به مدت دو دقیقه روی یخ انجام شد. سپس سلولها به مدت ۱ ساعت دردمای ۳۷ درجه و شرایط تاریکی با محلول ترکیبی TUNEL (Roche, Denmark) انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS<sup>۱</sup> برای بهتر دیدن هسته، رنگ آمیزی پروپیدیوم یدید<sup>۲</sup> (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) انجام شد و سلولها پس از سه بار شستشو با PBS با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus AX-70, Japan) مطالعه شدند. سلولهای با هسته دارای رنگ زرد براق به عنوان سلولهای آپوپتوتیک شمارش شده و در نهایت شاخص آپوپتوز از تقسیم تعداد سلولهای آپوپتوتیک بر تعداد کل سلولها ضر بدر عدد ۱۰۰، برای هر یک از غلظتهای استئورسپورین محاسبه شد. سلولهای PC-12 که در محیط

1. Phosphate Buffer Saline
2. Propidium Iodide

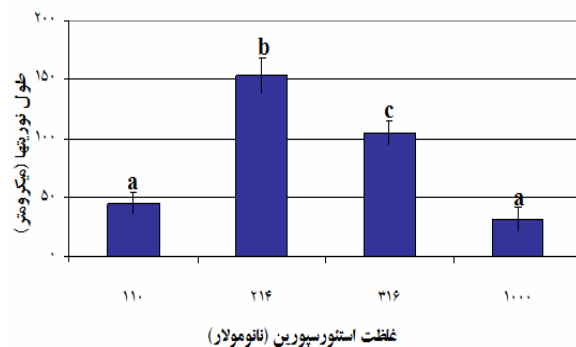
داشتن کمترین طول نوریت در مقایسه با سایر غلظت‌ها، دارای ظاهر بسیار آسیب دیده نیز بودند (شکل ۳، نمودار ۱).

تمایز کند و طول نوریت در آنها بسیار پایین بود. از سوی دیگر سلول‌های تیمار یافته با غلظت ۱۰۰۰ نانومولار علاوه بر



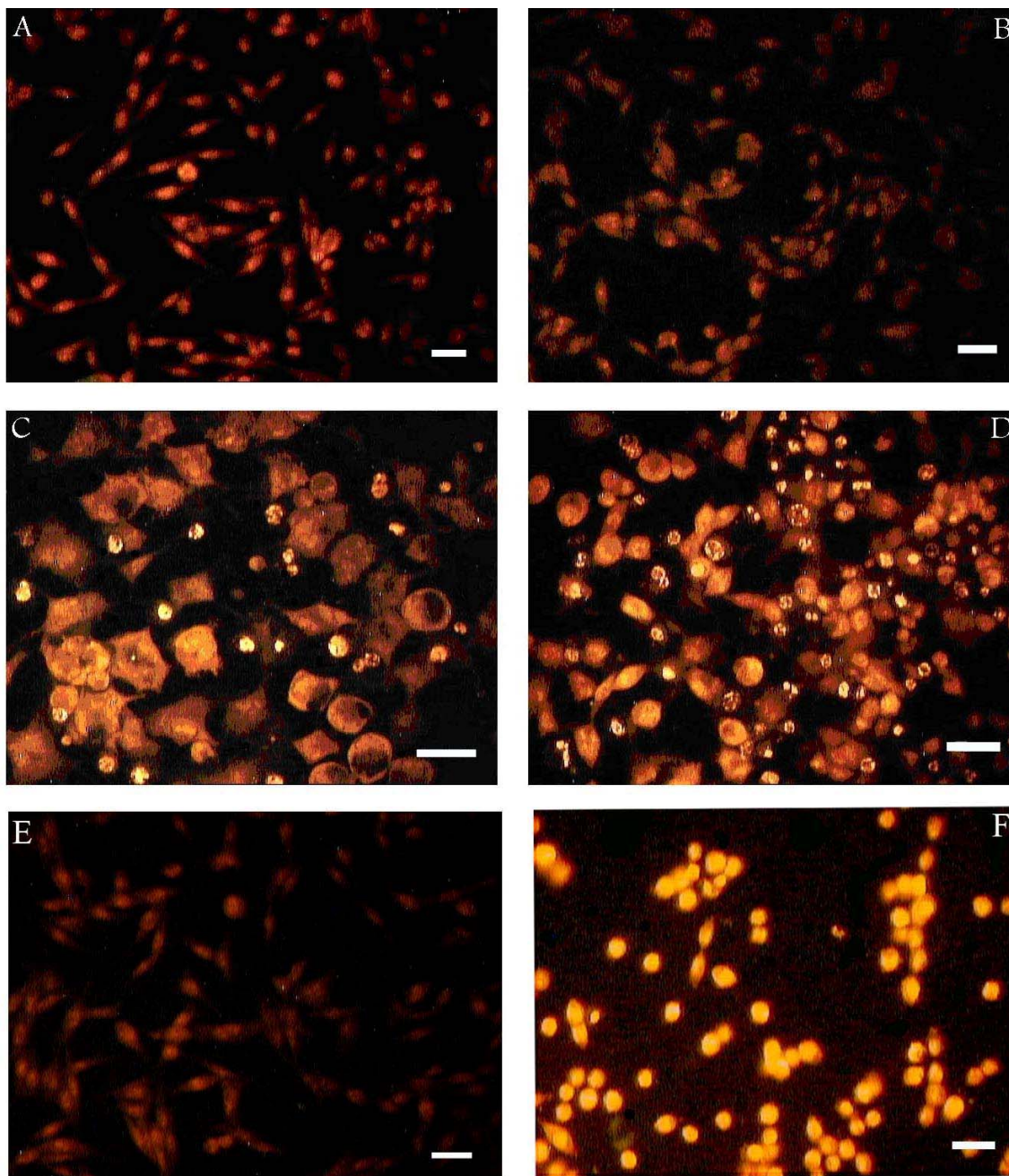
شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف استورسپورین بر ایجاد زواید نورونی (نوریت) در سلول‌های رده سلولی PC-12. A: غلظت ۱۱۰ نانومولار، B: غلظت ۲۱۴ نانومولار، C: غلظت ۳۱۶ نانومولار، D: غلظت ۱۰۰۰ نانومولار. بار: ۲۰ میکرومتر

بررسی‌های شاخص آپوپتوز در غلظت‌های مورد آزمایش نشان داد که این شاخص در غلظت‌های ۱۱۰، ۲۱۴، ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار به ترتیب  $3 \pm 0.7$ ،  $4 \pm 0.8$ ،  $8 \pm 1$  و  $10 \pm 1.1$  بود که در این بین سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۱۰ و ۲۱۴ نانومولار کمترین و سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ نانومولار بیشترین میزان شاخص آپوپتوزی را دارا بودند. از طرفی غلظت ۳۱۶ نانومولار با وجود اینکه سلول‌ها را از لحاظ مورفولوژیکی به خوبی متمایز کرده بود اما شاخص آپوپتوزی در سلول‌های تیمار شده با این غلظت در مقایسه با غلظت ۲۱۴ نانومولار به طرز معنی داری بالاتر بود ( $p < 0.05$ ) (شکل ۴، نمودار ۲).



نمودار ۱. مقایسه طول نوریت‌ها در سلول‌های تیمار یافته PC-12 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف استورسپورین.

a/b/c: ستون‌های با حروف مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۴. اثر غلظتهای مختلف استورسپورین بر القای آپوپتوز در سلولهای تمایز یافته PC-12.

A: غلظت ۱۱۰ نانو مولار، B: غلظت ۲۱۴ نانو مولار، C: غلظت ۳۱۶ نانو مولار، D: غلظت ۱۰۰۰ نانو مولار،

E: سلولهای گروه کنترل منفی، F: سلولهای گروه کنترل مثبت.

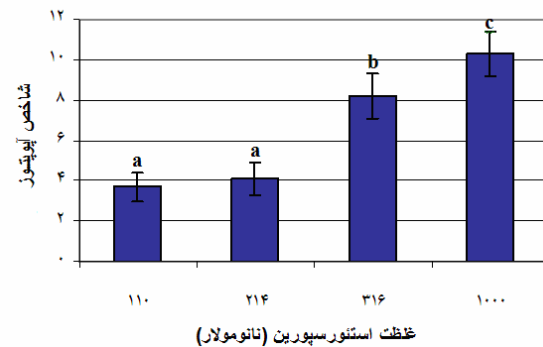
- سلولهای به رنگ زرد درخشان دچار آپوپتوز شده اند. بار: ۲۰ میکرومتر ( $p < 0.05$ )

محیط کشت و در حضور این ماده با درصد بقای بالا زنده بماندکه از ویژگیهای دیگر این ماده است [۲۴].

عملکرد استئورسپورین علاوه بر غلظت مورد استفاده از آن به نوع سلولهای تیمار یافته با این ماده نیز بستگی دارد به طوری که غلظت ۱۰ نانو مولار این ماده طی مدت سه روز سبب تمایز ۸۰ درصد از سلولهای رده Tsu-Pr1 که مدلی آزمایشگاهی از سلولهای توموری سرطان پروستات هستند، شده بود. این امر کاهش شدید آثار تهاجمی و مخرب این سلولها را به دنبال داشت [۲۵].

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر عملکرد وابسته به غلظت استئورسپورین را در ایجاد تمایز در سلولهای عصبی پس از ۵ ساعت تیمار تأیید کرد. به طوری که غلظتهای ۲۱۴ و ۳۱۶ نانومولار با ایجاد بلندترین نوریتها در سلولهای تیمار یافته، باعث تمایز آنها به سمت نورون بالغ شده بودند. از سوی دیگر غلظت ۱۱۰ نانومولار، به علت ایجاد زواید نورونی کوتاه و نامناسب نمی تواند به عنوان غلظت تمایزی این ماده در سلولهای PC-12 در نظر گرفته شود. با توجه به اینکه این غلظت از غلظتهای مورد استفاده برای تمایز رده‌های سلولی عصبی از جمله PC-12 محسوب می‌شود [۱۸، ۱۶]، این تضاد در القای تمایز کامل مورفولوژیکی در سلولهای عصبی، بین این مطالعه و برخی مطالعات دیگر را می‌توان در تفاوت روشهای تشخیص نورون بالغ و اندازه گیری طول نوریتها قلمداد کرد. در مطالعات پیشین برای ارزیابی نورونهای تمایز یافته صرفاً ظاهر شاخه شاخه آنها یا نسبت طول نوریت به اندازه جسم سلولی نورون مد نظر قرار می‌گرفت [۱۸، ۱۷] و [۲۶]. در صورتی که در تحقیق حاضر برای ارزیابی بلوغ مورفولوژیکی نورونهای بالغ، یکی از دقیق ترین روشهای اندازه گیری طول نوریتها و زواید نورونی بر پایه محاسبات ریاضی استفاده شد که یکی از مزیت‌های این مطالعه نسبت به سایرین است [۲۲].

علاوه بر این، غلظت ۱۰۰۰ نانومولار استئورسپورین افزون بر



نمودار ۲. مقایسه میزان وقوع آپتوتوز در سلولهای تمایز یافته PC-12 پس از تیمار با غلظتهای متفاوت استئورسپورین.  
a/b/c: ستونهای با حروف مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند.

## بحث

در این تحقیق پس از تمایز سلولهای رده PC-12 به نورونهای بالغ توسط غلظتهای متفاوت استئورسپورین، مورفولوژی و وقوع آپتوتوز در سلولهای تمایز یافته برای به دست آوردن غلظت تمایزی مناسب این ماده ارزیابی شد.

رده سلولی PC-12 دارای پتانسیل تمایزی بالایی در پاسخ به فاکتورهای القا کننده سلولهای عصبی است به همین دلیل از سلولهای عصبی تمایز یافته این رده سلولی می‌توان به عنوان مدلی بسیار مناسب از نورونهای بالغ دستگاه عصبی در مطالعات استفاده کرد [۴].

NGF به عنوان معمول ترین و استئورسپورین به عنوان یکی از سریع ترین مواد القا کننده تمایز در این سلولها استفاده می‌شود. این دو ماده با دو روش متفاوت، سلولهای تمایز نیافته را هم از فاز تقسیم خارج می‌کنند و هم با ایجاد زواید نورونی، یک نورون بالغ تمایز یافته را به وجود می‌آورند [۶]. تفاوت در روند القای تمایز بین استئورسپورین و NGF و تاثیر مستقیم استئورسپورین بر پروتئینها سبب برتری زمانی تاثیر تمایزی این ماده در مقایسه با NGF شده است که در نوع خود بسیار قابل اهمیت است [۱۷]. از طرفی سلولهای عصبی تمایز یافته با استئورسپورین تا مدت‌ها (حدود یک ماه) می‌توانند در



در سلولها نشان داد که استفاده از این غلظت در عین حال که باعث ایجاد زاوید نوروئی مناسب و تمایز مورفولوژیکی سلولها می شود اما به علت القای آپوپتوز نمی تواند به عنوان غلظت مناسب برای تمایز سلولهای رده PC-12 به نوروئهای بالغ استفاده شود. از این رو در تحقیق حاضر غلظت ۲۱۴ نانومولار استئوروسپورین، به عنوان غلظت میانه غلظتهای ۱۱۰ و ۳۱۶ نانومولار که در اغلب تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرند، استفاده شد و با توجه به ایجاد بلندترین زاوید نوروئی و القای کمترین میزان آپوپتوز در سلولها به عنوان مناسب ترین غلظت تمایزی استئوروسپورین درمقایسه با سایر غلظتهای مورد مطالعه در این تحقیق معرفی می شود.

در مجموع با توجه به اثرهای مختلف غلظتهای متفاوت استئوروسپورین در تمایز و القای آپوپتوز و اختلاف در معرفی یک غلظت ثابت برای تمایز سلولها توسط استئوروسپورین، نتایج این تحقیق علاوه براین که ممکن است به عنوان راه گشایی برای به کارگیری صحیح این ماده در تمایز سریع سلولهای عصبی بدون القای آپوپتوز در آنها قرار گیرد، پیشنهاد می کند که هر آزمایش گر قبل از استفاده تمایزی از استئوروسپورین، نقش پروآپوپتوتیکی آن را نیز مدنظر داشته و مورد بررسی قرار دهد.

## References

1. Frassetto L, Schlieve C, Lieven C, Amy A, Jones M, Agarwal N, et al. Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor. *IOVS* 2006; 47: 427-38.
2. Fujita K, Lavarovici P, Gurrof G. Regulation of the differentiation of PC-12 cells. *Environment health perspect* 1989; 80:127-42.
3. Greene LA, Tischler A. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Nat Acid Sci* 1977; 73: 424-8.
4. Greene LA. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC-12 pheochromocytoma cells in serum-

ایجاد کمترین طول نوریت باعث به وجود آمدن ظاهری آسیب دیده در سلولها شده بود که نتایج حاصل از بررسی شاخص آپوپتوز در این سلولها نشان می دهد که به وجود آمدن ظاهر آسیب دیده در آنها با توجه به بالا بودن شاخص آپوپتوز در سلولهای تیمار شده با این غلظت به علت القای آپوپتوز در آنها است. این غلظت در برخی مقالات به عنوان غلظت تمایز دهنده [۱] و در برخی دیگر به عنوان غلظت الفاکتنده آپوپتوز [۱۶] معرفی شده بود که در تحقیق حاضر نقش پروآپوپتوتیکی این غلظت با القای آپوپتوز در بیش از ۱۰ درصد سلولها به شدت تایید شد.

نکته قابل توجهی که در بررسیهای شاخص آپوپتوز در غلظتهای دیگر می توان به آن اشاره کرد، القای آپوپتوز در سلولهای تمایز یافته با غلظت ۳۱۶ نانومولار بود. در برخی مطالعات به ویژه مطالعاتی که روی سلولهای گانگلیونی شبکیه چشم که ماهیتی عصبی دارند انجام شده، غلظت ۳۱۶ نانومولار استئوروسپورین با توجه به ایجاد نوریتهای مناسب و به جود آوردن سلولهای عصبی تمایزیافته به عنوان غلظت تمایزی مناسب این ماده در نظر گرفته شده است بدون آنکه توجهی به نقش القایی آن در ایجاد آپوپتوز شده باشد [۱]. تحقیق حاضر با بررسی همزمان مورفولوژی و میزان آپوپتوز

- free medium. *J Cell Biol* 1978; 78: 747-55.
5. Kaplan DR, Stephens RM. neurotrophin signal transduction by the Trk receptor *J Neurobiol* 1994; 25: 1404-17.
6. Gollapudi L, Neet K.E. Different Mechanisms for Inhibition of Cell Proliferation via Cell Cycle Proteins in PC-12 Cells by Nerve Growth Factor and Staurosporine. *J Neurosci Res* 1997; 49: 461-74.
7. Drubin, DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC-12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly promoting factors. *J Cell Biol* 1985; 101: 1799-807.

8. **Rasouly D, Rahamim E, Ringel L, Ginzburg I, Muarakata C, Matsuda Y, et al.** Neurites induced by staurosporine in PC-12 cells are resistant to colchicine and express high levels of tau proteins. *Mol Pharmacol* 1993; 45: 29-35.
9. **Hanemaaijer R, Ginzburg I.** Involvement of mature tau isoforms in the stabilization of neurites in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1991; 30: 163-71.
10. **Brugg B, Matus A.** PC12 cells express juvenile microtubule associated proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1988; 107: 643-50
11. **Black M, Aletta M, Greene LA.** Regulation of microtubule composition and stability during nerve growth factor-promoted neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1986; 103: 545-57
12. **Hashimoto S, Hagino A.** Staurosporine induced neurite outgrowth in PC-12 cells. *Exp Cell Res* 1983; 184: 351-9.
13. **Rasouly D, Shavit D, Zuniga R, Rafael B.** Staurosporine induces neurite outgrowth in neuronal hybrids(PC-12EN) lacking NGF receptors. *J Cell Biochem* 1996; 62: 356-71
14. **Knusel B, Hefti F.** K-252 compounds: Modulators of neurotrophin Signal transduction. *J Neurochem* 1992; 59: 87-96
15. **Schumacher A, Arnold S, Addicks K, Doerfer W.** Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial and CNS stem cell like neurosphere differentiation in murine embryonic stem cell. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23: 669-80
16. **Deshmukh M, Johnson E M.** Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications *Cell Death and Differentiation* 2000; 3: 250-61
17. **Rasouly D, Rahamim E, Lester D, Matsuda Y, Lazarovici P.** Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC-12 cells is independent of protein kinase C inhibition. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 35-43.
18. **Sadot E, Barg J, Rasouly D, Lazarovici P.** Short- and long-term mechanisms of tau regulation in PC-12 cells. *J Cell Sci* 1995; 108: 2857-64.
19. **Drechsel DN, Hymann AA, Cobb MH, Kirschner MW.** Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Cell Biol* 1992; 3: 1141-54.
20. **Wille H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow M, Mandelkow E.** Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 1992; 118: 573-84.
21. **Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee V.** Abnormal tau phosphorylation at ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 1993; 10: 1089-99.
22. **Rønn L, Ralets I, Hartz B, Bech M, Berezin A, Berezin V, et al.** A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J Neurosci Method* 2000; 100: 25-32.
23. **Gold R.** Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994; 71: 219-28.
24. **Prince JA, Orelund L.** Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull* 1997; 43: 515-23.
25. **Takahashi N, Shimizu T, Takeda K.** Low-dose staurosporine suppresses proliferation and induces neurites in human prostatic cancer TSU-Pr1 cells. *Prostate* 2000; 44: 328-33.
26. **Raffioni S, Bradshaw R.** Staurosporine causes EGF to induce differentiation in PC-12 cells via receptor up-regulation. *J Biol Chem* 1994; 270: 7568-72.
27. **ano H.** Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 2002; 69: 698-707.