Original Article

In Vitro Expression of BDNF, GDNF, NGF, NT3 and NT4/5 Genes in Selegiline Induced Bone Marrow Stromal Cells

Maryam Haji Ghasem Kashani, Ph.D.[1]*, Taghi Tiraihi, Ph.D.[2], Mohammad Taghi Ghorbanian, Ph.D.[2], Kataneh Abrari, Ph.D.[2]

1. Biology Department, Damghan University of Basic Sciences, Damghan, Iran
2. Anatomy Department, Tarbiat Modares University, School of Medical Science, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 36717-41167, Biology Department, Damghan University of Basic Sciences, Damghan, Iran***
Email: kashani_tmu @yahoo.com

Received: 12/Jan/2009, Accepted: 25/Jun/2009

Abstract

Objective: Two types of stem cells are found in the bone marrow: hematopoietic stem cells and marrow stromal cells (MSCs). Is it possible to induce the differentiation of bone marrow stromal cells into neural cells *in vitro* and subsequently transplant them into the brain? This might help repair neural lesions observed in some neurodegenerative diso ders such as Parkinson's disease (PD).

Materials and Methods: In this study, cultured MSCs were incubated in serum free medium containing 10^{-8} M selegiline for 24 hours and cells were cultured for another 48 hours in α minimal essential medium (α-MEM) containing 20% fetal bovine serum (FBS).
Then selegiline-treated cells were immunostained for neuronal markers such as NF-200 and TH.

Results: Cell counting results showed that Selegiline at doses of 10^{-6}, 10^{-7} and 10^{-8} M increased the mean percent of viable cells. The most effective dose of Selegiline for differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) was 10^{-8} M. Molecular studies indcated that the expression of BDNF, GDNF, NGF, NT3, and NT4/5 genes were increased in Selegiline-treated cells compared to non-treated group.

Conclusion: BMSCs can be directed to a neural fate *in vitro* and can be considered as a cell source in neurological disorders for autograft therapy.

Keywords: Bone Marrow Stromal Cells, Selegiline, Neurotrophic Factors

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 400-407

بیان ژن‌های BDNF، GNFD، NGF، NT3 و NT4/5 در سلول‌های استرومایی مغز استخوان رت بالغ تحت القای سلژیلین

مریم حاجی قاسم کاشانی .Ph.D[1*]، تقی طریحی .Ph.D[2]، محمدتقی قربانیان .Ph.D[2]، کتانه ابراری .Ph.D[2]

۱. دانشگاه علوم پایه دامغان، گروه زیست شناسی، دامغان، ایران
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، دامغان، کدپستی: ۴۱۱۶۷-۳۶۷۱۷، دانشگاه علوم پایه دامغان، گروه زیست‌شناسی
پست الکترونیک: Email: kashani_tmu @yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲، پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۰

چکیده

* **هدف:** بیان ژن‌های BDNF، GDNF، NGF، NT-3 و NT-4/5 در سلول‌های استرومایی مغز استخوان رت بالغ تحت القای سلژیلین
* **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش دارویی به نام سلژیلین به‌دلیل اثرات تروفیک خود مورد توجه قرار گرفت. این دارو در درمان بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های استرومایی مغز استخوان، این سلول‌ها مدت ۲۴ ساعت در معرض سلژیلین با غلظت 10^{-8} مولار قرار گرفتند سپس به مدت ۴۸ ساعت بعد، سلژیلین از محیط حذف شده و فقط سلول‌ها در معرض محیط و سرم قرار گرفتند.
* **یافته‌ها:** مقایسه نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد در غلظت‌های 10^{-6}، 10^{-7} و 10^{-8} مولار سلژیلین، میانگین درصد سلول‌های زنده بیشتر است. سلول‌های عصبی تمایز یافته در محیط کشت تحت القا سلژیلین با غلظت 10^{-8} مولار قرار گرفتند و در آن سلول‌های عصبی به شکل چندوجهی، سه گوش و یا دوکی شکل با زواید عصبی مشاهده شدند. سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله این سلول‌ها شمارش شده و نتایج حاصله به‌وسیله آزمون آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، در غلظت 10^{-8} سلژیلین میانگین درصد سلول‌های عصبی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با غلظت 10^{-9} وجود نداشت ولی با غلظت‌های 10^{-13} تا 10^{-5} از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان داد. مقایسه الگوی بیان ژن‌های BDNF, GDNF, NGF, NT3 NT4/5 , در سلول‌های استرومایی مغزاستخوان قبل و بعد از القای با سلژیلین نشان دادکه غلظت 10^{-8} مولار سلژیلین بیان ژن‌های مربوطه را درسلول‌های عصبی افزایش می‌دهد.
* **نتیجه‌گیری:** یافته‌های فوق نشان می‌دهند سلژیلین قادر است تمایز عصبی را در سلول‌های استرومایی مغز استخوان تحریک نموده و سلول‌های دوپامینرژیک با توانایی بیان فاکتورهای نوروتروفیک ایجاد نماید که از این نظر می‌توان گامی در جهت کاربرد درمانی این سلول‌ها در بیماری پارکینسون برداشت.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلژیلین، فاکتورهای نوروتروفیک

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ٤، زمستان ٨٨، صفحات: ٤٠٧-٤٠٠

مقدمه

در پستانداران پس از تولد، مغز استخوان اولین مکانی است که شروع به خون‌سازی می‌کند، سلول‌های خونی بالغ از بخش خارج عروقی، لایه ادوانتیشیا و اندوتلیوم عروق خونی عبور کرده و به داخل خون رها می‌شوند (۳-۱). مغز استخوان پس از تولد از دو سیستم اصلی با منشاء متفاوت تشکیل شده است که عبارتند از: ۱. بافت خون‌ساز و ۲. استرومایی که این بافت را حمایت می‌کند (۴، ۵).

مغز استخوان تنها ارگانی است که در آن دو نوع سلول بنیادی مجزا به همراه بافت‌هایشان در یک جا جمع شده‌اند. سلول‌های رتیکولار، سلول‌های چربی، سلول‌های استخوانی، ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال به صورت شبکه‌ای از سلول‌ها در فضای خارج سینوزوئیدها قرار دارند و محیط مناسبی را به نام Bone Marrow Microenvironment (BMW) فراهم می‌کنند (۶)، در این محیط سایتوکاین‌های آزاد شده و اینترکشن‌های بین سلولی نقش مهمی را در تکثیر و تمایز پیش‌سازهای خونی ایفا می‌کنند (۴، ۵ و ۷).

دو نوع سلول بنیادی در مغز استخوان وجود دارندکه عبارتند از: سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومایی (Mesenchymal Stromal Stem Cell; MSC) و سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells).

سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Cells; BMSCs) علاوه بر آنکه محیط مناسبی را برای تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز فراهم می‌کنند، قادرند به استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، ادیپوسیت‌ها تمایز یابند (۸)، گزارش‌هایی توسط محققین درخصوص تمایز آنها به سلول‌های عضله اسکلتی (۹) عضله قلبی (۱۰)، هپاتوسیت‌ها (۱۱)، گلیال‌ها و نورون‌ها و دیگر سلول‌ها در شرایط *in vitro* (تحت اثر عوامل القایی مختلف) ارایه شده است. از طرف دیگر این سلول‌ها در شرایط *in vivo* نیز قابلیت تمایز به سلول‌های گلیالی و نورونی را دارند (۵، ۱۲، ۱۳).

البته حتی سلول‌های استرومایی تمایز نیافته می‌توانند مارکرهایی مثل نستین، Class III Beta-Tubulin Isotype (MAP1)، Microtubule-Associated Protein 1، ویمنتین (Vimentin)، Neuron-Specific Nuclear Protein (NeuN) و Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) را بیان کنند. بنابراین در این سلول‌ها ژن‌های مزودرمال، اندودرمال و اکتودرمال بیان می‌شوند (۵، ۱۴). بنابراین از لحاظ قدرت تمایزی، این سلول‌ها در رده سلول‌های چند ظرفیتی قرار داده می‌شوند.

به طور کلی سلول‌های بنیادی بر حسب قابلیت تمایز به سه گروه تقسیم می‌شوند:

۱. Totipotent: جزء اولین سلول‌هایی هستند که در جنین شکل می‌گیرند و قابلیت تمایز به انواع سلول‌های ارگانیسم را دارند.

۲. Pluripotent: از جنین انسان در مرحله بلاستوسیست ۱۰۰ تا ۲۰۰ سلولی منشا می‌گیرند.

۳. Multipotent: این گروه را سلول‌های بنیادی بالغ (Adult stem cell) و یا سلول‌های بنیادی سوماتیک (Somatic stem cell) نیز می‌نامند. این سلول‌ها در تمام طول زندگی فرد در مغز استخوان، مغز، نخاع، پولپ دندان، خون محیطی، اپیدرم، عضله اسکلتی، روده، پانکراس، کبد، قرنیه و شبکیه وجود دارند. این سلول‌ها قادرند تحت شرایط فیزیولوژیک یا به دنبال ایجاد ضایعه به سلول‌های بافتی که در آن قرار دارند تمایز یابند و بافت آسیب دیده را ترمیم کنند (۱۷-۱۵)؛ به عنوان مثال سلول‌های بنیادی خون‌ساز در مغز استخوان به تمام انواع سلول‌های خونی مانند گلبول‌های قرمز، لنفوسیست‌های B و T، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها تمایز می‌یابند (۴، ۵).

سلول‌های بنیادی در مغز به نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت‌ها تمایز می‌یابند. سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال که در پوشش دستگاه گوارش و عمق کریپت‌ها قرار دارند به سلول‌های جذبی، گابلت، پانت و انتروآندوکرین تمایز می‌یابند و یا سلول‌های بنیادی پوست که در لایه بازال اپیدرم و قاعده فولیکول‌های مو قرار دارند به ترتیب به کراتینوسیت و فولیکول مو تمایز می‌یابند (۶، ۸، ۹).

علاوه بر آن سلول‌های بنیادی بالغ تحت شرایط پاتولوژیکی خاصی مانند التهاب یا تغییر در فاکتورهای محیطی به سلول‌های دیگری که مربوط به آن بافت خاص نمی‌باشد، تمایز می‌یابند. به این ویژگی Transdifferentiation و یا Adult Stem Cell Plasticity می‌گویند (۱۰، ۱۱، ۱۶، ۱۷). مطالعات زیادی در مورد مکانیسم توانایی تمایز بالای سلول‌های بنیادی بالغ انجام شده است. سلول‌های استرومایی مغز استخوان جزو سلول‌های بنیادی سوماتیک به حساب می‌آیند؛ این سلول‌های طویل، شبیه به فیبروبلاست بوده و انواع سیتوکین‌ها را تولید می‌کنند (۲۰-۱۸) که ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۱ درصد سلول‌های مغز استخوان را تشکیل می‌دهند (۲۱). نخستین بار پاتولوژیست آلمانی به نام کونهیم وجود این سلول‌ها را در مغز استخوان شناسایی کرد. وی با مطالعاتی که بر روند ترمیم زخم انجام داد، به این نتیجه رسید که مغز استخوان می‌تواند منشأ فیبروبلاست‌های رسوب دهنده الیاف کلاژن در محل ترمیم باشد (۲۲). سپس در سال ۱۹۸۶ فرندستین و همکارانش برای اولین بار این سلول‌های بنیادی غیرخون‌ساز را در مغز استخوان شناسایی کردند (۲۳).

آنها این سلول‌ها راکه قادر بودند به کف ظروف کشت بچسبند و از سلول‌های خون‌ساز مغز استخوان جدا شوند و به شکل کلونی‌هایی در آیند و ویژگی فاگوسیتوزی داشته باشند را تحت عنوان CFU-Fs (Colony forming unit fibroblasts) نامیدند (۵، ۶، ۲۴). البته به نام‌های دیگری نیز شناخته شده‌اند (۲۷-۲۵) که سلول‌های استرومایی مزانشیمی است؛ در حالی که این سلول‌ها را می‌توان در بافت‌هایی مثل استخوان تیغه‌ای (ترابکولار)، بافت چربی، سینوویوم، عضله اسکلتی، ریه، طحال، کبد، کلیه، مغز، غضروف ، قلب، پوست، دندان‌های شیری و سلول‌های اطراف عروق مربوط به ژله وارتون بندناف انسان نیز مشاهده نمود (۱۹، ۲۸).

از ویژگی دیگر سلول‌های استرومایی مغز استخوان آن است که این سلول‌ها قادرند در محیط کشت، تکثیر یافته و ۲۵ تا ۳۰ برابر شوند (۵، ۶، ۲۹، ۳۰)، بدون آنکه تمایزی داشته باشند. البته اگر تا ۱۲ پاساژ در محیط کشت باقی بمانند کم‌کم قدرت تمایز خود را از دست می‌دهند. از طرفی نیز تحقیقات نشان داده که این سلول‌ها قادرند در شرایط *in vitro* و *in vivo* به سلولهای عصبی تمایز یابند. مطالعات سنچز راموس و همکارانش نشان داد که سلول‌های استرومایی مغز استخوان انسان دارای ظرفیت تمایز به سلول‌های عصبی بوده است، در این تحقیقات از اسید رتینوئیک، BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)، فاکتور رشد عصبی (Epidermal Growth Facotr)، ترانسفرین (Transferrin) و سلنیوم (Selenium) استفاده گردید و به دنبال آن بخشی از سلول‌ها مارکر عصبی NeuN (حدود ۵ درصد) و بخش دیگر مارکر آستروسیتی GFAP (حدود ۱ درصد) را بیان کردند (۱۴، ۳۳-۳۱).

وودبوری در سال ۲۰۰۰ سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان و موش صحرایی را در محیط کشت تا بیش از ۲۰ پاساژ پیش برد و سپس سلول‌ها در معرض محیط کشت فاقد سرم و حاوی بتامرکاپتواتانول قرار داده شدند، بدین ترتیب کمتر از ۵۰ درصد سلول‌ها، فنوتیپ سلول عصبی را نشان دادند (۳۴، ۳۵). بنابراین سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد، نوروتروفین‌ها باعث تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های عصبی در محیط کشت می‌شوند و نیز وجود BHT (Butylated Hydroxy Toluene)، BHA (Butylated Hydroxyanisole)، DMSO (Dimethylsulfoxide) و 5-azacytidine در محیط کشت و یا هر عاملی که بتواند سطح cAMP داخل سلولی را افزایش دهد، می‌تواند این سلول‌ها را به سمت سلول‌های عصبی سوق دهد (۳۳، ۳۵، ۳۶). به طوری که دنگو و همکارانش در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که عوامل افزایش دهنده cAMP درون سلولی نظیر Isobutyl Methyl Xanthine و Dibutyryl cAMP نیز موجب تمایز سلول‌های BMSC به سلول عصبی می‌گردد (۳۷).

بنابراین می‌توان تمایز این سلول‌ها را در محیط کشت به گونه‌ای کنترل و تنظیم نمود که به سلول‌های عصبی تمایز یابند تا بتوان از آنها در جهت بهبودی بیماری‌های نورولوزیک استفاده کرد.

ابتدا باید القاکننده مناسبی انتخاب شود که بتواند این سلول‌ها را در محیط کشت به سمت سلول‌های مورد نظر سوق دهد که بدین‌ترتیب از داروی دپرنیل به منظور القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های استرومایی مغز استخوان استفاده شد.

فرندستین و همکارانش برای اولین بار در سال ۱۹۸۶، سلول‌های بنیادی غیرخون‌ساز را در مغز استخوان شناسایی کردند (۲۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به‌عنوان بهترین سلول‌های بنیادی در جهت سلول درمانی شناخته شده‌اند؛ به‌دلیل آنکه این سلول‌ها به راحتی تهیه و کشت داده می‌شوند، خالص کردنشان آسان است زیرا به کف ظرف کشت می‌چسبند و از سلول‌های رده خونی جدا می‌شوند (۵، ۳۶)، در شرایط *in vivo* به مدت طولانی زنده می‌مانند (۶)، ژن‌های مربوط به نورون‌های دوپامینرژیک و همین‌طور ژن‌های اندودرمال، مزودرمال و اکتودرمال را بیان می‌کنند (۳۴، ۳۸، ۳۹). واکنش ایمنی را در میزبان ایجاد نمی‌کنند، کاربرد آنها هیچ گونه موانع اخلاقی و قانونی ندارد (۱۴، ۲۸)، قدرت خود تکثیری و تمایز بالایی را در *in vitro* دارند، به‌طوری که قادرند در شرایط *in vivo* و *in vitro* به سلول عصبی تمایز یابند (۵، ۱۰، ۱۳).

مواد و روش ها

به منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتوکل هلسینکی سال ۱۹۷۵ و دستور کار انجمن علوم اعصاب

آمریکا انجام شد.

به منظور جداسازی سلول‌های استرومایی مغز استخوان از موش‌های صحرایی (۸- ۶ هفته) نژاد اسپراگوداولی استفاده شد؛ روش کار به این صورت بود که فمور و تیبیای موش‌ها خارج شده، مغز استخوان آنها به همراه محیط MEM - α و سرم FBS ۲۰ درصد از دیافیز استخوان‌ها در فلاسک مخصوص کشت سلولی تخلیه شد. پس از پنج پاساژ مکرر، سلول‌های استرومایی یک‌دست در کف فلاسک باقی ماند. به منظور تایید هویت استرومایی سلول‌های کشت داده شده، از روش ایمونوهیستوشیمی با ردیابی آنزیم آلکالین فسفاتاز به‌صورت یک مرحله‌ای و فیبرونکتین استفاده شد.

مرحله بعد در این پژوهش القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های BMSC بود. برای شروع کار، ابتدا لازم بود میزان زنده ماندن سلول پس از تاثیر داروی سلژیلین به دست آید. بدین ترتیب سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط کشت MEM - α فاقد سرم و حاوی غلظت‌های مختلف سلژیلین (10^{-2} تا 10^{-13} مولار) قرار گرفتند (۴۰). تعدادی از سلول‌ها نیز در محیط کشت فاقد سلژیلین و FBS قرار داده شدند و به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. سپس تریپسینه کردن و شمارش سلولی انجام شد، تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش سلولی با استفاده از آزمون کروسکال والیس (Kruskal-Wallis Test) و ANOVA صورت گرفت.

به منظور تعیین دوز مناسب داروی سلژیلین برای القای فنوتیپ عصبی، سلول‌های استرومایی مغز استخوان به مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط کشت MEM - α فاقد سرم، حاوی غلظت‌های 10^{-5} تا 10^{-13} مولار سلژیلین (۴۰، ۴۱) و سپس به مدت ۴۸ ساعت دیگردر محیط کشت MEM - α و سرم ۲۰ درصدقرار گرفته ودردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سر انجام رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله و مشاهده با میکروسکوپ نوری و شمارش سلول‌های شبه عصبی با استفاده از گراتیکول، با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × (۴۲، ۴۳) صورت گرفت. به منظور تایید هویت سلول‌های عصبی بیان مارکرهای عصبی نوروفیلامنت ۲۰۰ و تیروزین هیدروکسیلاز با روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت و نیز به منظور بررسی بیان ژن‌های GDNF NT-3، NGF، BDNF و NT-4/5 در سلول‌های حاصل از تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان در *in vitro* از روش Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) استفاده شد.

در این روش ابتدا mRNA استخراج شده از سلول با آنزیم کپی‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase) به cDNA تبدیل شد و سپس cDNA با روش PCR تکثیر شده و مورد بررسی قرار گرفت.

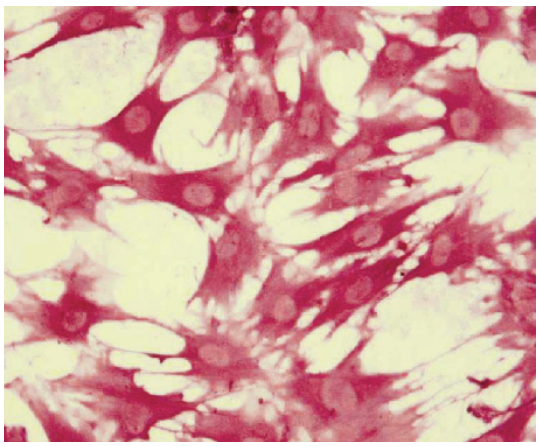
ابتدا پرایمرهای مربوط به هر ژن با نرم‌افزار Primer Design طراحی شد و با استفاده از نرم‌افزار Generunner مورد ارزیابی قرار گرفت. اطلاعات مربوط به پرایمرها، (F: پرایمر بالادست، R: پرایمر پایین‌دست) به قرار زیر است:

BDNF-F: 5'-GCC CAA CGA AGA AAA CCA TA-3'
BDNF-R: 5'-GAT TGG GTA GTT CGG CAT TG-3'
GDNF-F: 5'-GAC TCC AAT ATG CCC GAA GA-3'
GDNF-R: 5'-TAG CCC AAA CCC AAG TCA GT-3'
NGF-F: 5'-CCT CTT CGG ACA CTG TGG A-3'
NGF-R: 5'-CGT GGC TGT GGT CTT ATC T-3'
NT3-F: 5'-AGG TCA GAA TTC CAG CCG AT-3'
NT3-R: 5'-GTT TCC TCC GTG GTG ATG TT-3'
NT4/5-F: 5'-TAT GTG CGC CGT TGA CTG C-3'
NT5/5-R: 5'-CAC AGT CAG AAG GA CGG TA-3'
Beta-2M-F: 5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3'
Beta-2M-R: 5'-TTT TGG GCT TCA GAG TG-3'

یافته ها

در شکل ۱ پاساژ پنجم سلول‌های استرومایی مغز استخوان نشان داده می‌شود که سلول‌ها دوکی شکل بوده و کلونی‌های شبه فیبروبلاستی را ایجاد کرده‌اند. در شکل۲ واکنش مثبت سلول‌ها نسبت به آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داده شده است به طوری که سیتوپلاسم سلول‌های استرومایی محتوی این آنزیم به رنگ صورتی دیده شده‌اند. در شکل ۳ سلول‌هایی نشان داده شده که واکنش مثبت به آنتی‌بادی ضدفیبرونکتین را داشتند و نیز با به‌کارگیری اتیدیوم بروماید هسته‌هایشان به رنگ قرمز دیده می‌شود که با شمارش این سلول‌ها مشخص شد حدود ۹۷ درصد سلول‌ها، استرومایی هستند و به آنتی‌فیبرونکتین واکنش مثبت نشان داده‌اند.

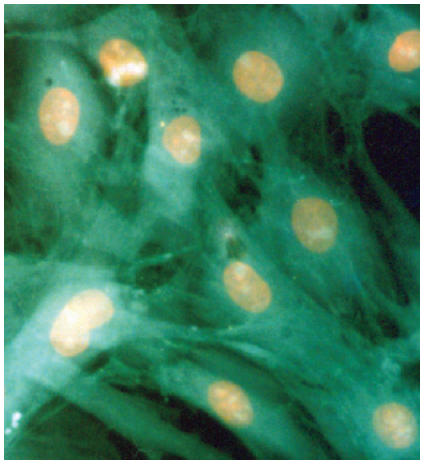
شکل ۱: پاساژ پنجم سلول‌های MSC را نشان می‌دهد که سلول‌ها دوکی شکل و کلونی‌های شبه فیبروبلاستی ایجاد کرده‌اند (۲۰۰×).



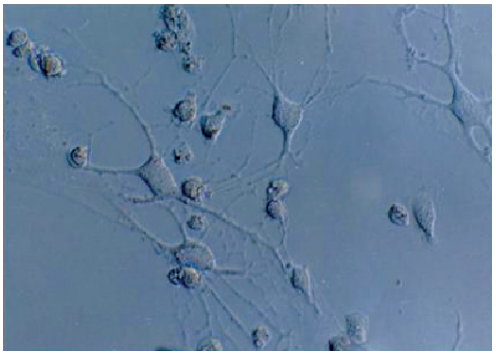
شکل ۲: شناسایی سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی: ایمونوسیتوشیمی سلول‌های BMSC با روش آلکالین‌فسفاتاز یک مرحله‌ای، در این تصویر سیتوپلاسم سلول‌هایی که واکنش مثبت به نشانگر آلکالین فسفاتاز نشان داده‌اند، به رنگ صورتی دیده می‌شود (۴۰۰ ×).

مقایسه دوگانه اثر غلظت‌های مختلف سلژیلین (10^{-2} تا 10^{-13}) بر میزان بقای سلول‌های استرومایی مورد بررسی قرار گرفت به گونه‌ای که میانگین درصد سلول‌های زنده در غلظت ۱۰-۶ مولار سلژیلین با غلظت‌های 10^{-13} ، 10^{-12} ، 10^{-11} ، 10^{-10}، 10^{-9}، 10^{-8}، 10^{-7} از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان

نمی‌دهد، در حالی که این میانگین با غلظت‌های 10^{-5}، 10^{-4}، 10^{-3}، 10^{-2} و همچنین با گروه کنترل، معنی‌دار است ($p<0/05$).



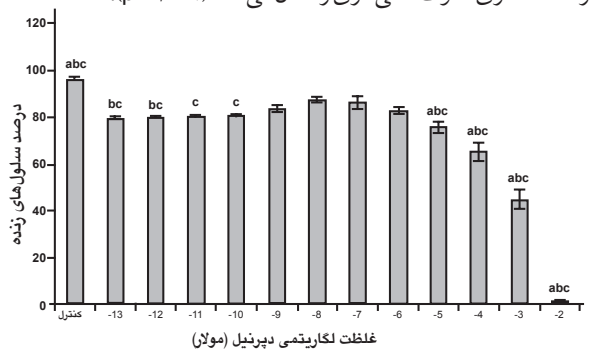
شکل ۳: سلول‌ها را با سیتوپلاسم حاوی رشته‌های سبز رنگ فیبرونکتین نشان می‌دهد و هسته سلول‌ها نیز با اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز روشن دیده می‌شوند (۴۰۰ ×).



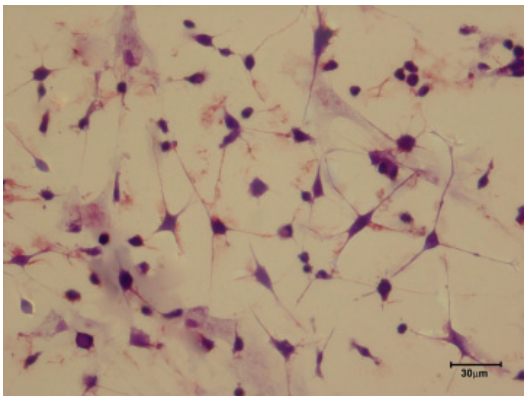
شکل ۴: تصویر فاز کنتراست سلول‌های شبه عصبی القا شده با غلظت 10^{-8} مولار دپرنیل، که در آن سلول‌های عصبی به شکل چند وجهی، سه گوش و یا دوکی شکل با زواید عصبی مشاهده شدند (۴۰۰ ×).

میانگین درصد سلول‌های زنده در غلظت 10^{-7} مولار سلژیلین با غلظت‌های 10^{-11}، 10^{-10}، 10^{-9}، 10^{-8} و 10^{-6} از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد، ولی با غلظت‌های 10^{-13}، 10^{-12}، 10^{-5}، 10^{-4}، 10^{-3} و با گروه کنترل این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار است و همچنین میانگین درصد سلول‌های زنده در غلظت 10^{-8} مولار سلژیلین با غلظت‌های 10^{-9}، 10^{-7}، 10^{-6} از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارد، ولی این اختلاف با غلظت‌های 10^{-13}، 10^{-12}، 10^{-11}، 10^{-10}، 10^{-5}، 10^{-4}، 10^{-3}، 10^{-2} و با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار است (نمودار ۱). بنابر این نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد در غلظت‌های 10^{-6}، 10^{-7} و 10^{-8} مولار سلژیلین، میانگین درصد سلول‌های زنده بیشتر است.

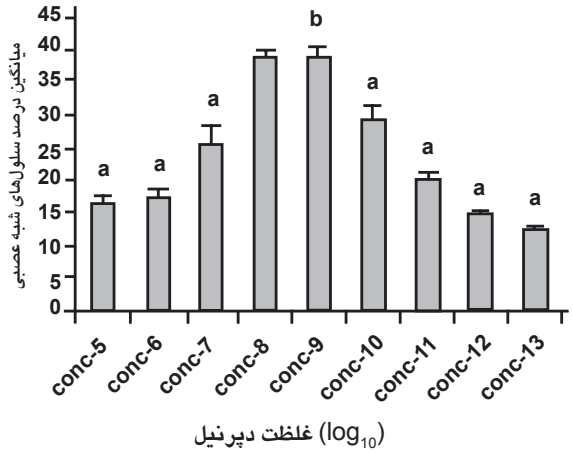
شکل ۴ سلول‌های عصبی تمایز یافته را نشان می‌دهد که در محیط کشت تحت القای سلژیلین با غلظت 10^{-8} مولار قرار گرفتند و در آن سلول‌های عصبی به شکل چندوجهی، سه گوش و یا دوکی شکل با زوائد عصبی مشاهده شدند. سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله (شکل ۵) این سلول‌ها شمارش شده و نتایج حاصله به وسیله آزمون آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (نمودار ۲)، در غلظت 10^{-8} سلژیلین میانگین درصد سلول‌های عصبی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با غلظت 10^{-9} ندارد ولی با غلظت‌های 10^{-13} تا 10^{-5} از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p<0/001$).



نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف دپرنیل بر میزان درصد سلول‌های زنده در سلول‌های استرومایی مغز استخوان
a: نسبت به غلظت 10^{-6} مولار دپرنیل معنی‌دار است ($p<0/05$).
b: نسبت به غلظت 10^{-7} مولار دپرنیل معنی‌دار است ($p<0/05$).
c: نسبت به غلظت 10^{-8} مولار دپرنیل معنی‌دار است ($p<0/05$).
d: تفاوت معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

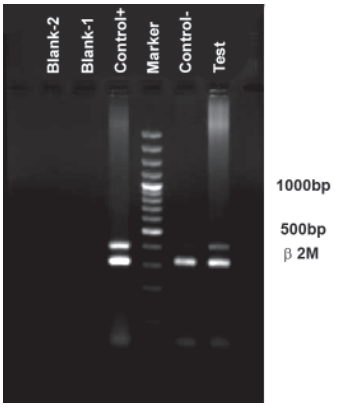


شکل ۵: سلول‌های شبه‌عصبی که با رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله، به رنگ بنفش تیره دیده شدند (۴۰۰ ×).

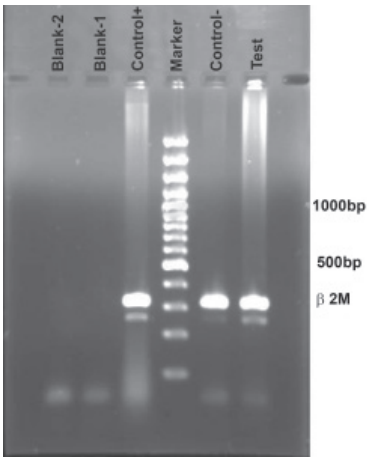


نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف دپرنیل بر القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی بالغ
a: نسبت به غلظت 10^{-8} مولار دپرنیل معنی‌دار است ($p<0/001$).
b: تفاوت معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

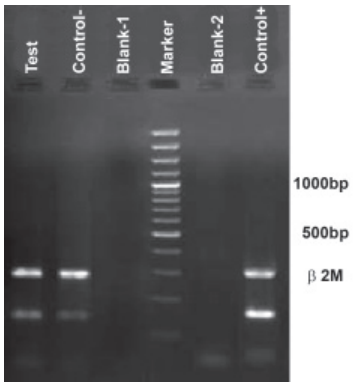
بنابراین با توجه به اینکه غلظت 10^{-8} مولار سلژیلین باعث افزایش بقای سلول‌ها می‌گردد، همین غلظت نیز به عنوان دوز مطلوبی برای القاء سلول‌های استرومایی به سمت سلول‌های عصبی در نظر گرفته شد. سلول‌های شبه عصبی ظاهر شده پس از تیمار سلول‌های استرومایی مغز استخوان با غلظت 10^{-8} مولار سلژیلین از نظر نشانگرهای عصبی مانند نوروفیلامنت ۲۰۰ کیلودالتون و تیروزین هیدروکسیلاز مورد بررسی قرار گرفتند (شکل‌های ۶ و ۷).



شکل ۶: الگوی بیان ژن BDNF، ۴۸ ساعت پس از القای دیفرنیل با غلظت 10^{-8} مولار

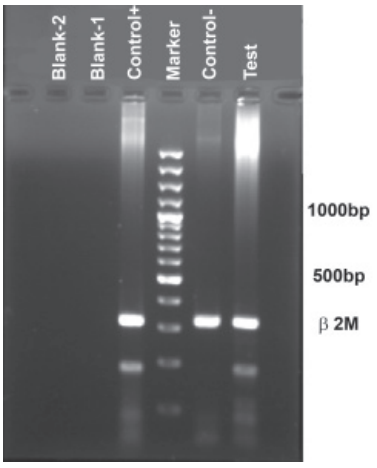


شکل ۷: الگوی بیان ژن GDNF، ۴۸ ساعت پس از القای دیفرنیل با غلظت 10^{-8} مولار

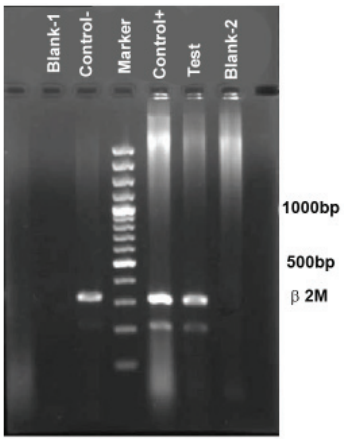


شکل ۸: الگوی بیان ژن NGF، ۴۸ ساعت پس از القای دیفرنیل با غلظت 10^{-8} مولار

مقایسه الگوی بیان ژن‌های BDNF, GDNF, NGF, NT3 NT4/5 در سلول‌های استرومایی مغز استخوان قبل و بعد از القا با غلظت 10^{-8} مولار سلژیلین در (شکل‌های ۱۲-۸) نشان داده شده است.



شکل ۹: الگوی بیان ژن NT-3، ۴۸ ساعت پس از القای دیفرنیل با غلظت 10^{-8} مولار



شکل ۱۰: الگوی بیان ژن NT-4/5، ۴۸ ساعت پس از القای دیفرنیل با غلظت 10^{-8} مولار

بحث

ارزیابی آنزیم آلکالین فسفاتاز به روش هیستوشیمی نشان داد که سلول‌های جدا شده از مغز استخوان موش صحرایی دارای فعالیت آلکالین فسفاتازی هستند. میزان بالای فعالیت این آنزیم از ویژگی سلول‌های تمایز نیافته مانند سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های زایای جنینی و کارسینومای جنینی است ولی با تمایز سلولی، این فعالیت نیز کاهش می‌یابد.

یکی دیگر از معیارهای تشخیص سلول‌های BMSC، بیان آنتی‌ژن سطحی فیبرونکتین است به‌طوری که با به کارگیری آنتی‌بادی ضدفیبرونکتین به روش ایمونوهیستوشیمی بیان این آنتی‌ژن نیز به اثبات رسید.

در این پژوهش تاثیر داروی سلژیلین بر میزان بقا و القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های استرومایی مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت. شمارش سلول و بررسی‌های آماری نشان داد که غلظت‌های 10^{-6}، 10^{-7} و 10^{-8} مولار سلژیلین، بیشترین تاثیر را بر میزان بقای سلول‌های استرومایی دارند. پس از تعیین دوز مناسب، این سلول‌ها جهت القای فنوتیپ

عصبی در معرض غلظت‌های 10^{-5} تا 10^{-13} مولار دپرنیل قرار داده شدند.

غلظت 10^{-8} مولار سلژیلین تاثیر به سزایی بر تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های عصبی دارد، چنانچه سلول‌های حاصل از تمایز در شرایط *in vitro* نوروفیلامنت ۲۰۰ و تیروزین هیدروکسیلاز را بیان کردند. همچنین غلظت مذکور باعث القای بیان بیشتر ژن‌های نوروتروفیک NGF، BDNF، NT-3، GDNF و NT4/5 در سلول‌های تمایز یافته شد. وجود سلول‌های بیان کننده نوروفیلامنت ۲۰۰ و تیروزین هیدورکسیلاز در شرایط *in vitro* با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی به اثبات رسید و نیز با استفاده از روش RT-PCR نشان داده شد که سلول‌های تمایز یافته، ژن‌های اعضای خانواده نوروتروفین‌ها شامل NT-3، GDNF، NGF، BDNF و NT4/5 را بیان می‌کنند. علت استفاده از سلژیلین به‌عنوان ماده القاکننده آن بود که این ماده باعث افزایش طول زواید نورون‌های دوپامینرژیک و حفظ بقای آنها در محیط کشت می‌گردد (۴۰، ۴۴).

البته سلول‌های استرومایی مغز استخوان تمایز نیافته نیز قادرند فاکتورهای نوروتروفیک GDNF، NGF و BDNF را بیان کنند (۲، ۴۵، ۴۶). سلژیلین باعث افزایش بیان فاکتورهای نوروتروفیک در آنها می‌گردد.

مطالعه‌ای نیز بر روی اثر سلژیلین بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انجام شده است که نشان داده سلژیلین بیان ژن‌های NGF، BDNF و NT-3 را در آنها القا می‌کند (۴۷). همچنین اثرات تروفیک سلژیلین بر نورون‌های دوپامینرژیک محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است و مشاهده شده که سلژیلین اثری مشابه BDNF بر روی این سلول‌ها دارد (۴۰، ۴۴).

بنابراین در پژوهش حاضر از این دارو به‌عنوان القاکننده عصبی استفاده شد، به‌طوری که در تحقیقی تاثیر BDNF و سلژیلین بر نورون‌های دوپامینی مغز میانی جنین رت در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد BDNF در جهت افزایش زواید عصبی نورون‌ها نقش دارد در حالی که سلژیلین باعث افزایش طول زواید نورون‌های دوپامینی و حفظ بقای آنها در محیط کشت می‌گردد. بنابراین با توجه به اثرات تروفیک این دارو بر نورون‌های دوپامینی، از آن به‌عنوان القاکننده استفاده شد.

در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که سلول‌های استرومایی مغز استخوان به هر دو شکل تیمار شده و تیمار نشده با دپرنیل قادرند بعد از پیوند به جسم مخطط موش‌های صحرایی پارکینسونی به سلول‌های عصبی و به ویژه سلول‌های دوپامینرژیک تمایز یابند.

با توجه به ارتباط فاکتورهای نوروتروفیک با بیماری‌های تحلیل عصبی در چند سال اخیر محققین بسیاری به پژوهش در این زمینه علاقه‌مند شده‌اند. به طور نمونه تزریق سیستماتیک NT-4/5، NT-3، BDNF، NGF و bFGF به جسم مخطط آسیب دیده نوزادان موش صحرایی نشان داد که فاکتورهای BDNF، NGF و NT-4/5 اثر حفاظتی قابل توجهی بر نورون‌ها دارند (۳۱، ۴۸، ۴۹).

چنانچه رامر و همکارانش در سال ۲۰۰۰، شاخ خلفی نخاع را قطع کرده و به‌دنبال آن درمان با NT-3، NGF و GDNF را شروع کردند و مشاهده کردند آکسون نورون‌های حسی ترمیم شده و فانکشن خود را به دست آوردند.

مجموعه این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که با استفاده از فاکتورهای نوروتروفیک می‌توان قابلیت درمانی سلول‌های پیوند زده شده را در بیمارک‌های نورولوژیک افزایش داد. بدین ترتیب با استفاده از اثر القایی دپرنیل می‌توان تعداد بی‌شماری سلول بیان کننده فاکتورهای نوروتروفیک را در *in vitro* تولید و از آنها جهت پیوند درمانی استفاده نمود.

احتمالا این سلول‌ها قادر خواهند بود پس از پیوند با مکانیسم‌های اتوکرین و یا پاراکرین، برخود و سلول‌های میزبان اثر گذاشته و نه تنها میزان بقا و تزاید سلولی را افزایش دهند، بلکه باعث عصب‌دهی مجدد و برقراری ارتباط عصبی گردند.

چنانچه ونگ و همکارانش در سال ۱۹۹۵ گزارش دادند که دو فاکتور BDNF و NT-3 باعث افزایش بیان سیناپتوفیرین می‌شوند و از این طریق ایجاد سیناپس‌های بالغ را تحریک می‌کند (۵۰).

نتیجه‌گیری

مجموع نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی، ایمونوهیستوشیمی، مولکولی در این پژوهش نشان داد که دپرنیل قادر است تمایز عصبی را در سلول‌های استرومایی مغز استخوان تحریک نموده و سلول‌های دوپامینرژیک با توانایی بیان فاکتورهای نوروتروفیک را ایجاد نماید. با پیوند این سلول‌ها به حیوانات مدل پارکینسونی و بررسی این سلول‌ها در *in vivo* و همچنین بهبود رفتاری در حیوانات نیز می‌توان گامی در جهت کاربرد درمانی این سلول‌ها در بیماری پارکینسون برداشت.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس ودانشگاه علوم پایه دامغان که حمایت مالی این طرح را بر عهده داشته اند تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Katia M, Monica N, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers. Exp Hematol. 2006; 34: 1563-1572.
2. Chopp M, Li Yi. Treatment of injury with marrow stromal. Lancet Neurol. 2002; 1: 92-100.
3. Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL. An overview of stem cell research and regulatory issues. Mayo Clin Proc. 2003; 78: 993-1003.
4. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 2000; 28: 875-884.
5. Tatard VM, D'Ippolito G, Diabira S, Valeyev A, Hackman J, McCarthy M, et al. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. Bone .2007; 40: 360-373.
6.Nikkhah G, Bentlage C, Cunnigham MG, Bjorklund A. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat parkinson model. J Neurosci .1994; 14: 3449-3461.
7. Tropel Philippe, Noel Daniele, Platet Nadine, Legrand Pierre. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res. 2004; 295: 395-406.
8. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. Science .1997; 276: 71-74.
9. Wakitani S, Saito T, Caplin AT. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve .1995; 18: 1417-1426.
10. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 2001; 410: 701-705.
11. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardnen R, IIlei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. Hepatology. 2000; 32(1): 11-16.
12. Dominici M, Hofmann T, Horwitz E. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. J Biol Regul Homeost Agents. 2001; 15: 28-37.
13. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM,

Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. Stem Cells. 2005; 23(3): 392-402.
14.Sanchez Romos J, Song S, Cardozo - Pelaez F, Hazzi , Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol. 2000; 164: 247-256.
15.Verfaillie CM, Pera FM, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2002; 369-391.
16. Chen Y, Teng F, Tang B. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. Cell Mol Life Sci. 2006; 63: 1649-1657.
17. Song S, Kamath S, Mosquera D, Zigova T, Sanberg P, Vesely DL, et al. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. Exp Neurol. 2004; 185: 191-197.
18. Lanotte M, Allen TD, Dexter TM. Histochemical and ultrastructural characteristics of a cell line from human bone marrow stroma. J Cell Sci. 1981; 50: 281-297.
19. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther. 2003; 5: 32-45.
20. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AL. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro,effects of dexamethason and IL-1 alpha. J Cell Physiol. 1996; 166: 585-92.
21. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC cell Biol. 2006; 7: 14.
22. Russell R, Newton BE, Ruth T. Wound healing and collagen formation. J Cell Biol. 1970; 44: 645-654.
23. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulaginal NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. 1976; 4: 267-274.
24. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C, Prockop D. 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.
25. Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. Brain Res Bull. 2002; 57(6): 795-808.
26. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature. 2006; 441(7097): 1094-1096.
28. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004; 8(3): 301-316.
29. Polak JM, Norrden SV. Introduction to immunochemistry, 2th ed. London UK. Bios Scientific Publishers. 1997.
30. Colter D, Class R, Digirolamo C, Prockop D. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(7): 3213-3218.
31. Sanchez - Romos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J Neurosci Res. 2002; 69: 880-893.
32. Jin K, Mao XO, Batteur S, Sun Y, Greenberg DA. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. Exp Neurol. 2003; 184: 78-89.
33. Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. Brain Res Bull. 2005; 68: 95-102.
34. Woodbury D, Reynolds K, Black I. Adult bone marrow stromal stem cells express germline,ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res. 2002; 69(6): 908-917.
35. Woodbury D, Schwarz E, Prockop D, Black I. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res. 2000; 61: 364- 370.
36. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Strazzer S, Comi GP. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. J Cell Mol Med. 2004; 8(3): 329-337.
37. 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.
38. Kuan W, Barker R. New therapeutic approaches to Parkinson's disease including neural transplants. Neurorehabil neural Repair. 2005; 19(3): 155-181.
39. Espejo EF, Gonzalez-Albo MC, Moraes JP, El Banoua F, Flores JA, Caraballo L. Functional regeneration in a rat Parkinson's model after intrastriatal grafts of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β1-expressing extra-adrenal chromaffin cells of the zuckerkandl's organ. J Neurosci. 2001; 21(24): 9888-9895.
40. McGeer PL, McGeer EG. Inflamation and neuodegeneration in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat-Disord. 2004; 10: S3-7.
41. Johnson RE, Schallert T, Becker JB. Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. Behav Brain Res. 1999; 104: 189-196.
42. Vander Kooy D, Weiss S. Why stem cells?. Science. 2000; 287: 1439-1441.
43. Dunnett SB, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. Nature. 1999; Suppl 6738; 399: A32-A39.
44. Lewis S, Caldwell MA, Barker RA. Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. Expert Rev Mol Med. 2003; 5(10): 1-20.
45. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. J Clin Invest. 2000; 105: 1663-1668.
46. Munoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. J Neurosci. 2004; 24(19): 4585-4595.
47. Park KW, Eglitis MA, Mouradian MM. Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. Neurosci Res. 2001; 40: 315-323.
48. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004; 8(3): 301-316.
49. Zhao LX, Zhang J, Cao F, Meng L, Wang DM, Li YH, et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. Exp Neurol. 2004; 190: 396- 406.
50. Yoo YM, Kim YJ, Lee U, Paik DJ, Yoo HT, Park CW, et al. Neurotrophic factor in the treatment of Parkinson disease. Neurosurg Focus. 2003; 15(1): 1-6.