A-PDF Creator DEMO: Purchase from www.A-PDF.com to remove the watermark

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم– شماره ۱۰۱
آبان ۱۳۹۱

بررسی بیان نشانگرهای شبه‌نورواپیتلیالی، شبه‌نورونی و شبه‌گابا ارژیکی در سلول‌های القاشده استرومایی مغز استخوان با استفاده از القاکننده‌های مناسب

نویسندگان: شهرام دارابی[۱]، تقی طریحی*[۲]، علیرضا دلشاد[۳]، مجید صادقی‌زاده[۴]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی ـ گروه علوم تشریح ، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران
۲. استاد ـ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استادیار ـ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. استاد ـ گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
* نویسنده مسئول: تقی طریحی E-mail: takialtr@modares.ac.ir

دریافت: ۹۱/۷/۲۴
آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۱۰/۱۷
پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۰

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های استرومایی مغز استخوان یک منبع دردسترس و مطلوب برای سلول‌درمانی است. شواهد بسیاری، نشان‌دهنده تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به نورون‌های شبه‌گابا ارژیک در شرایط مناسب القایی هستند. اختلال در نورون‌های گاباارژیک باعث ایجاد بیماری‌های تخریب نورونی می‌شود. در این مطالعه، ایجاد سلول‌های عصبی شبه‌گابا ارژیکی از سلول‌های بنیادین مغز استخوان به‌وسیله عوامل القاگر مناسب بررسی‌شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا سلول‌های استرومایی مغز استخوان از استخوان‌های ران و ساق پای رات جداشد و پس از پاساژ سوم سلول‌های استرومایی مغز استخوان در محیط پیش‌القایی بتامرکاپتو اتانل ۱ میلی‌مولار و رتینوییک اسید ۱۰ میکرومولار و سپس در محیط کشت القایی حاوی کریاتین ۵ میلی‌مولار به‌عنوان عوامل القاگر در روزهای مختلف قرارداده‌شد. در مراحل پیش‌القا و القا آثار عوامل القایی با روش‌های ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR بررسی‌شدند.

نتایج: نتایج نشان‌داد که پس از مرحله القا میزان زیادی از نورون‌های شبه‌گاباارژیکی ایجادشدند، براساس ارزیابی به‌وسیله آنتی‌بادی اختصاصی سلول‌های گاباارژیکی کریاتین ۵ میلی‌مولار و رتینوییک اسید ۱۰ میکرومولار در روز چهارم القا بیشترین میزان تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به نورون‌های شبه‌گاباارژیکی را داشتند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادین مغز استخوان، تحت تأثیر القاگرهای بتامرکاپتواتانل، رتینوییک اسید و کریاتین توانایی تبدیل به سلول‌های شبه‌گاباارژیکی را دارند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادین مغز استخوان، نورون‌های گابا ارژیک، رتینوییک اسید، کریاتین

مقدمه

سلول‌های گابا ارژیک، سلول‌های مهاری در سیستم عصبی هستند که در ایجاد بسیاری از بیماری‌های تخریب‌کننده نورونی، مانند بیماری هانتینگتون (۱)، آلزایمر (۲)، صرع (۳)، شیزوفرنی، بای پولار، اوتیسم (٤) پارکینسون و ضایعات مغزی و نخاعی نقش‌دارند (۵)؛ بنابراین ایجاد سلول‌های گاباارژیک و پیوند آنها در محل ضایعه می‌تواند در درمان این بیماری‌ها مؤثر باشد (۲). سلول‌درمانی، روشی جدید برای درمان بیماری‌هایی است که به هر دلیل، عملکرد سلول ازدست‌می‌رود یا سلول‌های بافت تخریب‌می‌شوند (۲). مشخص شده که سلول‌های بنیادین مغز استخوان می‌توانند موجب تشکیل طیفی وسیع از بافت‌های همبندی به‌طور کامل تمایزیافته، شامل غضروف، بافت چربی، استخوان، عصبی و همبندی شوند(٦، ۷، ۸ و۹). محققان، گزارش‌هایی مبنی‌بر تمایز سلول‌های بنیادین مغز استخوان به سلول‌های عضله اسکلتی (٦)، عضله قلبی، هپاتوسیت، گلیاها و نورون‌ها در شرایط In vitro ارائه‌داده‌اند (٦، ۷ و۸)؛ در مطالعات انجام‌شده نشان‌داده‌شده‌است که سلول‌های بنیادین مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی، توانایی تبدیل‌شدن به سلول‌های عصبی، تحت القاگرهای مناسب را دارند (٦، ۹ و۱۰).

کریاتین نقشی مهم در برآوردن نیاز زیاد سیستم عصبی به انرژی در تکامل و کارکردهای این سیستم برعهده‌دارد و این نقش را از طریق بافرینگ ATP انجام‌می‌دهد (۱۱). کریاتین سوبسترای آنزیم کریاتین کیناز است که میزان ATP سلول را تنظیم‌می‌کند؛ همچنین به‌عنوان یک نوروترانسمیتر و یک اسمولیت اصلی در سیستم عصبی است (۱۱). کریاتین در سیستم عصبی بیشتر به‌صورت آندوژنز تأمین‌می‌شود، زیرا سد خونی مغزی نفوذپذیری کمی به این ماده دارد (۱۱). در مطالعات قبلی نشان‌داده‌شده‌است که کریاتین ۵ میلی‌مولار در افزایش تراکم و بقای سلول‌های گاباارژیکی کشت سلول‌های استریاتوم نقش‌دارد درحالی‌که هیچ افزایشی در تعداد کل نورون‌ها مشاهده‌نشد، این می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که کریاتین به‌عنوان یک عامل تمایزدهنده است (۱۱)؛ همچنین گزارش‌شده که کریاتین، دارای آثار محافظت نورونی در مدل موشی ضایعات نخاعی و بیماری آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس (ALS) است (۱۲). طی آسیب نخاعی مصرف کریاتین به دلیل بهبود عملکرد متابولیسم انرژی، جلوی تخریب بیش از حد نورون‌ها را می‌گیرد (۱۳، ١٤ و۱۵). گزارش‌شده‌است که کریاتین توانایی تولید سلول‌های گاباارژیکی از استریاتوم (۱۱) و نخاع جنین رات (١٦) را دارد.

رتینوییک اسید فراورده متابولیک ویتامین A (رتینول) است که در القا، تمایز نورونی، رشد آکسونی و ترمیم عصبی نقش‌دارد (۱۷). جانداران، ویتامین A تولیدنمی‌کنند بلکه آن را از طریق مواد غذایی گیاهی با عنوان کاروتون یا مواد غذایی گوشتی با عنوان رتینوییدها دریافت‌می‌کنند (۱۷). ترکیب هم‌زمان رتینوییک اسید با استفاده از شاخص‌های رشد مختلف، سبب ایجاد انواع سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادین جنینی، خونی و عصبی می‌شود. در مطالعه‌ای نشان‌داده‌شده که سلول‌های بنیادی جنینی پس از سه روز قرارگرفتن در معرض رتینوییک اسید ۱۰ میکرومولار، سبب ایجاد حدود ٤۰ درصد سلول‌های گاباارژیکی شده‌است (۱۸).

آقای *غریبانی* و همکاران، سلول‌های بنیادین مغز استخوان را درمعرض بتامرکاپتواتانل به‌مدت ۱ ساعت و سپس رتینوییک اسید به‌مدت دو روز در مرحله پیش‌القا قراردادند و سلول‌ها را در مرحله القا، سه روز در کلرید پتاسیم ٤۰ میلی‌مولار قراردادند که باعث ایجاد سلول‌های گابا ارژیکی تا ٦۰ درصد شدند (۱۹)؛ در این

تحقیق، سعی‌شد که با روش تلفیق عوامل القایی کریاتین و رتینوییک اسید میزان تمایز سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی از سلول‌های بنیادین مغز استخوان افزایش‌یابد. با توجه به تولید سلول‌های گاباارژیکی توسط سایر محققان، هدف از انجام این تحقیق، افزایش تولید سلول‌های شبه-نورواپی تلیالی و شبه‌گاباارژیکی است. ازآنجاکه نورون-های گاباارژیک در سیستم عصبی دارای عملکردهایی بسیار، شامل اثر القایی روی سایر نورون‌ها علاوه‌بر اثر مهاری هستند، شاید در آینده بتوان برای سلول‌درمانی در درمان بیماری‌های سیستم عصبی از این سلول‌ها استفاده‌کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از موش صحرایی ماده و بالغ نژاد اسپراگو-داولی تهیه‌شده از موسسه پاستور با سن شش تا هشت هفته استفاده‌شد؛ حیوانات در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط استاندارد حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس با رعایت قوانین اخلاقی نگهداری‌شدند؛ سلول‌های استرومایی مغز استخوان پس از جداسازی از استخوان‌های دراز اندام تحتانی و شستشو با فسفات بافر سالین، تا پاساژ سوم در محیط کشت Dulbecco modified Eagle's medium: F12 (DMEM/F12; Gibco) به همراه FBS(fetal bovine serum) 10% قرارداده‌شدند. تمایز سلول‌های بنیادین مغز استخوان به سلول‌های شبه‌گاباارژیک، طی دو مرحله پیش القا و القا صورت‌گرفت. برای انجام پیش‌القا، با کاهش سرم سلول‌ها در محیط کشت DMEM:F12(۱:۱)، FBS 5% ، بتامرکاپتواتانل ۱ میلی-مولار و رتینوییک اسید ۱۰ میکرومولار به‌مدت یک، دو و سه روز قرارگرفت؛ پس از به‌دست‌آوردن بهترین روز با کمترین درصد مرگ‌ومیر، سلول‌ها با فسفات بافر سالین شستشوداده‌شده، در محیط کشت القایی حاوی کریاتین ۵ میلی‌مولار در DMEM:F12(۱:۱)، FBS 5% ، برای یافتن بیشترین درصد سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی، به مدت یک تا شش روز قراردادهشدند. پس از پاساژ سوم در سلول‌های بنیادین مغز استخوان (گروه شاهد)، گروه پیش‌القا و در گروه القا، بیان نشانگر سلول‌های بنیادین مغز استخوان Fibronectin ، بیان نشانگر سلول-های شبه‌نورو اپیتلیالی nestin، بیان نشانگرهای شبه-نورونی NeuN، Synaptophysin(Syp) ، MAP2 و همچنین بیان ژن‌های سلول‌های بیان‌کننده گاباارژیکی GAD1,GAD2، VGAT قرارشد.

تعیین میزان سلول‌های زنده با رنگ‌آمیزی تریپان بلو

برای انجام viability، حجمی از سلول‌ها با نسبت یکسان به‌وسیله رنگ تریپان بلو رنگ‌آمیزی‌شدند، تریپان بلو به سلول‌های مرده، وارد شده، سیتوپلاسم آنها آبی می‌شود، درحالی‌که سلول‌های زنده، رنگ را به خود جذب‌نمی‌کنند و سیتوپلاسم آنها روشن است. پس از شمارش سلول‌های زنده و مرده به‌وسیله لام نئوبار، درصد viability محاسبه‌شد.

بررسی ایمونوسیتوشیمی

پس از تریپسینه‌کردن سلول‌های بنیادین مغز استخوان در پاساژ سوم، تعداد ٤ هزار سلول به‌طور مساوی در هریک از خانه‌های پلیت شش خانه‌ای لامل‌گذاری‌شده ریخته‌شدند. مراحل بررسی ایمونوسیتوشیمی مشابه پرتکل‌های توصیه‌شده انجام‌شد (۱۹ و۲۰)؛ به‌طور خلاصه، سلول‌ها در محلول پارافرمالدیید ٤ درصد به-مدت ۲۰ دقیقه قراردادهشدند؛ پس از شستشو با فسفات بافر، سلول‌ها درون تریتون ایکس ۰/۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه قراردادهشدند. پس از شستشو با فسفات بافر سلول‌ها در آنتی‌بادی اولیه به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. آنتی‌بادی‌های اولیه، شامل آنتی‌بادی‌های اولیه Fibronectin (۱:٤۰۰)، nestin

(۱:۳۰۰)، MAP2 (۱:٤۰۰)، Syp(۱:۱۰۰)، NeuN (۱:۱۰۰) و NF200 (۱:۵۰۰)، از شرکت Millipore و GAD(۱:۵۰۰)، VGAT(۱:۵۰۰) و GABA (۱:۵۰۰) از شرکت سیگما بودند. سلول‌ها با فسفات بافر شسته‌شده، در آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC(1:100; Chemicon) که به رنگ سبز دیده‌می‌شود به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرارداده‌شدند. برای شمارش سلول‌ها از رنگ اتیدیوم بروماید که هسته سلول‌ها قرمز می‌شود، استفاده‌شد. سلول‌های با واکنش ایمنی مثبت با میکروسکوپ فلورسنت شمارش‌شدند.

RT-PCR

برای بررسی بیان ژن‌های GAD1، GAD2 و VGAT از روش RT-PCR استفاده‌شد؛ به این منظور، سلول‌ها در دو مرحله از لحاظ بیان ژن‌های بالا بررسی‌شدند: یکی بررسی در سلول‌های استرومایی مغز استخوان و دیگری بررسی پس از پایان مرحله القا؛ در این روش RNA کل از سلول‌ها با کیت استخراج RNA(Roche) استخراج‌شدند و با استفاده از کیت سنتز cDNA (Fermentas) به cDNA تبدیل‌شدند؛ سپس cDNA حاصل به روش PCR تکثیرشده، روی ژل آگاروز بررسی‌شد (۲۱).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تمام مقادیر برحسب Mean±SEM ارائه‌شده‌اند. اطلاعات به‌دست‌آمده از بررسی زنده‌بودن سلول‌ها و شمارش سلولی با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مورد مقایسه قرارگرفتند. سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ درنظرگرفته‌شد.

یافته‌ها

تعیین میزان زنده‌ماندن سلول‌ها با تریپان بلو در مرحله القا

از viability test در مراحل پیش‌القا و القا برای انتخاب روز و دز مناسب عوامل القایی که کمترین مرگ‌ومیر را در سلول‌ها داشته‌باشند، استفاده‌شد. نمودار ۱A نشان‌دهنده میزان مرگ‌ومیر در مرحله پیش‌القاست. در مرحله پیش‌القا اثر βME (β-mercaptoethanol) و رتینوییک اسید روی سلول‌های BMSCs(Bone marrow stem cells)، در روز صفر (BMSCs در محیط بدون عوامل القاگر که به‌عنوان گروه شاهد D0 درنظرگرفته‌شد)؛ روز اول (D1)، روز دوم (D2)، روز سوم (D3) و روز چهارم (D4) پیش‌القا بر میزان مرگ‌ومیر سلول‌ها بررسی‌شد؛ در گروه شاهد (D0) میزان مرگ‌ومیر، اختلافی معنی‌دار با سایر روزها دارد؛ همچنین روز چهارم، درصد مرگ‌ومیر بیش از سایر روزهاست. در پیش‌القا هدف، ایجاد سلول‌هایی است که بیشترین میزان بیان مارکر نوروایپتلیالی nestin را داشته‌باشند و ازسویی‌دیگر با توجه به عوارض مرگ‌ومیر ناشی از عوامل القایی، کمترین میزان مرگ‌ومیر را نیز دارا باشند. با توجه به بیشترین میزان بیان مارکر شبه‌نورو اپیتلیالی nestin (نمودار ۲) در روز سوم پیش‌القا و میزان viability بیشتر در روز سوم نسبت‌به روز چهارم (نمودار ۱B)، این روز به‌عنوان پیش‌القا برای ادامه کار مرحله القا انتخاب‌شد. نمودار ۱B نشان‌دهنده میزان مرگ‌ومیر در مرحله القاست. در مرحله القا سلول‌هایی که سه روز پیش‌القاشده‌اند، برای مدت یک تا شش روز (D1 تا D6) در محیط کشت القایی حاوی کریاتین ۵ میلی‌مولار قرار‌گرفتند (نمودار ۱B) که در روز اول القا، میزان بقای سلول‌ها بیش از سایر روزها و روزهای پنجم و ششم میزان مرگ‌ومیر بیش از سایر روزها بود. ازآنجاکه میزان مرگ‌ومیر در روز چهارم القا، کمتر از روزهای پنجم و ششم (نمودار ۱B) بود و با توجه به بیشترین میزان درصد بیان گابا در سلول‌های القاشده در روز ٤ (نمودار۲)، این روز به‌عنوان دز مناسب القا استفاده‌شد. نمودار۱، درصد سلول‌های زنده در پایان مرحله پیش‌القا و گروه القا را نشان‌می‌دهد. همان‌طورکه شکل نشان‌می‌دهد درصد زنده-

ماندن در گروه پیش‌القا و القا به‌صورت معنی‌دار در روز اول، بیش از روزهای دیگر است.

بررسی تمایز با روش ایمنوسیتوشیمی

شکل-۱ میکروگراف مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی اولیه آنتی fibronectin از سلول‌های BMSCs (A)، بیان nestin در پایان مرحله پیش‌القا (B)، بیان NF200 (نشانگر نورون بالغ) در پایان مرحله القا (C)، بیان GABA در پایان مرحله القا (D)، بیان Synaptophysin در پایان مرحله القا (E) و میکروگراف (F) مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی اولیه آنتی NeuN در پایان مرحله القاست که همگی با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC رنگ‌آمیزی-شده به رنگ سبز دیده‌می‌شوند؛ برای شمارش سلول‌ها از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده‌شده که هسته سلول‌ها قرمز شود.

برای اثبات استرومائی‌بودن سلول‌های BMSCs و تعیین خلوص آنها از آنتی‌بادی فیبرونکتین استفاده‌شد. شکل ۱، سلول‌ها را با سیتوپلاسم حاوی رشته‌های سبز-رنگ فیبرونکتین نشان‌می‌دهد که ۹۶ درصد سلول‌ها با آنتی‌فیبرونکتین واکنش‌دادند؛ همچنین در این مرحله، بررسی ایمونوسیتوشیمی BMSCs با استفاده از آنتی‌بادی‌های MAP2، Synaptophysin(Syp) ، NeuN، Nestin، GAD، VGAT و GABA انجام‌شد که در بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های BMSCs بعد از مراحل پیش-القا و القا درصدهایی متفاوت از ایمونوپوزیتیوبودن سلول‌ها به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنت تشخیص‌داده-شد (نمودار ۲). به‌منظور تعیین درصد سلول‌های ایمونوپوزیتیو شبه‌عصبی، شبه‌نورونی و همچنین شبه-گاباارژیکی، شمارش سلولی صورت‌گرفت. در گروه پیش‌القا، بیان مارکر nestin اغلب به‌طور معنی‌داری درصد سلول‌های شبه‌نورواپیتلیال بیشتری را نسبت‌به گروه BMSCs بیان‌کرد (نمودار۲ و شکل۱)، درحالی که میزان تمایز به سلول‌های شبه‌نورونی توسط ارزیابی با آنتی‌بادی‌های MAP2، Syn1 وNeuN در همین روز کم و به‌ترتیب ۳۶، ۲۶ و ۱۱ درصد بود (نمودار ۲). لازم به توضیح است که سلول‌های گروه القا، کمترین بیان آنتی‌بادی fibronectin را نشان‌دادند (۱/۳ درصد)؛ همچنین در پایان مرحله القا، بیشترین درصد تمایز به سلول‌های شبه‌گاباارژیکی ایجادشد (٦٦ درصد).

بررسی تمایز در پایان مراحل القا به روش RT-PCR

در بررسی RT-PCR باندی واضح از بیان ژن‌های GAD1، GAD2 و VGAT روی ژل الکتروفورز به‌خوبی ظاهر شد (شکل۲ و جدول ۱) درحالی‌که این سه ژن در سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیان‌نشد. با توجه به نتایج حاصل از بررسی میزان مرگ‌ومیر، ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR در پایان مرحله القا مشخص شد که سلول‌های استرومایی مغز استخوان پس از قرارگیری در محیط پیش‌القایی بتامرکاپتواتانل و رتینوییک اسید ۱۰ میکرومولار به‌مدت سه روز، در محیط کشت القایی حاوی DMEM:F12(1:1) ، FBS 5% و کریاتین ۵ میلی‌مولار به‌مدت چهار روز، توانایی تولید سلول‌های شبه‌گاباارژیکی دارند.

بحث

سلول‌های بنیادین مغز استخوان، منبعی خوب برای درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند؛ به‌راحتی به‌دست-می‌آیند و مشکلات دفع‌شدن به‌وسیله سیستم ایمنی در صورت پیوند، ندارند (۲۲). سلول‌های بنیادین مغز استخوان، پس از کشت و چند پاساژ، مورفولوژی یکسانی پیداکرده، برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومائی به دلیل وجود فیبرونکتین در سلول‌هایی با منشأ مزانشیمی به روش ایمونوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی-شدند؛ بیان ۹۲ درصدی این پروتئین در سلول‌ها مؤید

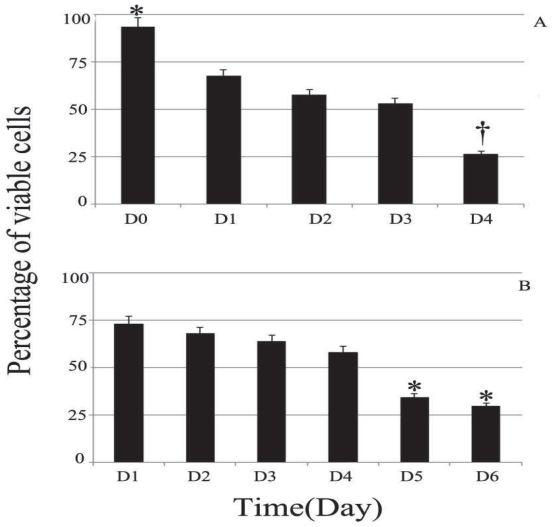
بنیادی‌بودن آنها بود (۲۳). *لاموری* و همکارانش با استفاده از آنتی‌بادی ضدفیبرونکتین هویت سلول‌های بنیادین مغز استخوان را تأییدکردند (۲٤). سلول‌های بنیادین مغز استخوان، پس از قرارگرفتن در محیط القایی در معرض شاخص‌های رشد، نوروتروفین‌ها، βME و RA(Retinoic acid)، میزان بیان پروتئین فیبرونکتین کاهش‌یافت و پروتئین‌های شبه‌عصبی بیان‌شد که تأیید-کننده سایر تحقیق‌هاست (۸ و۲۵). RA نقشی ضروری در رشد و تکامل سلول‌ها دارد؛ این ماده در بافت‌های مختلف جنینی و بالغ به‌ویژه در سیستم عصبی وجوددارد که سبب القای تمایز عصبی می‌شود. آقای *لی* و همکاران، سلول‌های بنیادین مغز استخوان را از موش صحرایی بالغ استخراج و به‌وسیله RA، سلول‌های شبه-عصبی ایجادکرد (۲٦)؛ پژوهشگری دیگر،، سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی بالغ را برای ۲٤ ساعت در معرض βME و سپس سه روز در معرض RA قرارداد؛ با این روش سلول‌های شبه‌عصبی ایجادشد (۸، ۲۷ و۲۸). کریاتین سوبسترایی برای آنزیم کریاتین کیناز موجود در سیتوپلاسم و میتوکندری بوده، به افزایش نسبت فسفوکریاتین به ATP منجرمی‌شود (۲۹)؛ همچنین اثبات‌شده‌است که کریاتین در سلول‌های عصبی آسیب-دیده، خاصیت ضدآپوپتوتیک دارد (۱٦ و۳۰)؛ نتایج به-دست‌آمده در این آزمایش بیانگر این نکته است که با استفاده از القاکننده βME و به‌دنبال آن RA و کریاتین می‌توان سلول‌های استرومائی مغز استخوان موش صحرایی را به‌طور عمده، به سمت سلول‌های شبه-گاباارژیک تمایزداد. تمایز سلول‌های بنیادی نخاع جنین و ناحیه استریاتوم تحت تأثیر کریاتین ارائه‌شده، در آنها میزان زیادی از سلول‌های بیان‌کننده گابا به‌دست‌آمد (۱۱ و۱٦). ازآنجاکه سلول‌های نورواپیتلیال تحت شرایط خاص و عوامل القایی به سلول‌های عصبی تمایزمی‌یابند (۳۱)، در این تحقیق سعی‌شد با استفاده از القاکننده کریاتین، این موضوع بیشتر بررسی‌شود؛ ازآنجاکه سلول‌های گاباارژیکی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های دستگاه عصبی نقش‌دارد، بنابراین ایجاد سلول‌های گاباارژیکی با درصد بالا از سلول‌های بنیادین مغز استخوان می‌تواند پیشنهادی مناسب در سلول درمانی، برای پیوند اتولوگ در بیماران سیستم عصبی باشد.

نتیجه‌گیری

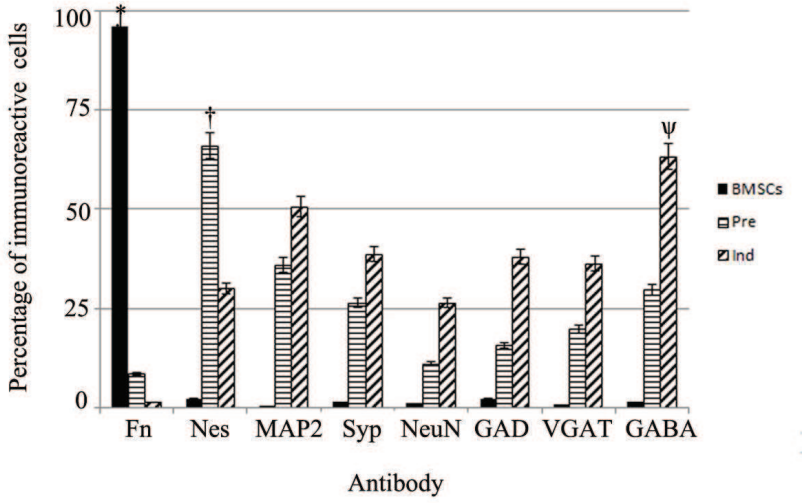
بنابراین پس از مرحله پیش‌القا توسط βME ۱ میلی-مولار و RA ۱۰ میکرومولار و سپس القا با کریاتین ۵ میلی‌مولار به‌مدت چهار روز، بیشترین درصد نورون‌های شبه‌گابا ارژیکی به میزان حدود ٦٦ درصد به‌دست‌آمد؛ همچنین سلول‌های استرومایی مغز استخوان، طی فرایند تمایز توانایی بیان مارکرهای ایمنوسیتوشیمیایی شبه-نورواپیتلیالی، شبه‌نورونی، بیان مارکر سیناپسی و سلول-های شبه‌گاباارژیکی را دارند.

تشکر و تقدیر

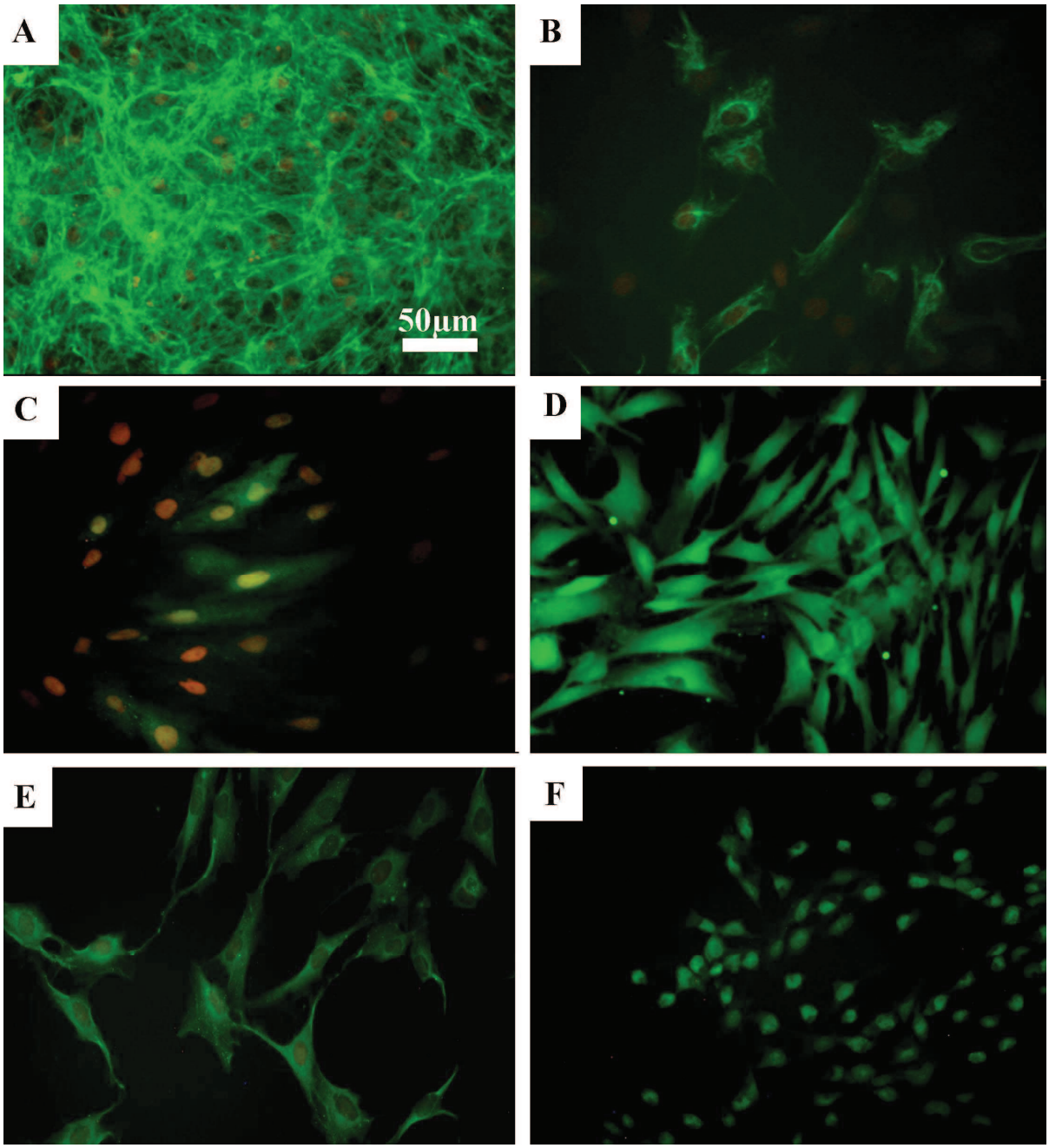
این پژوهش در دانشگاه تربیت مدرس تهران و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیای تهران انجام‌شد. از حمایت مالی و معنوی مرکز علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا تقدیر و تشکر می‌شود.



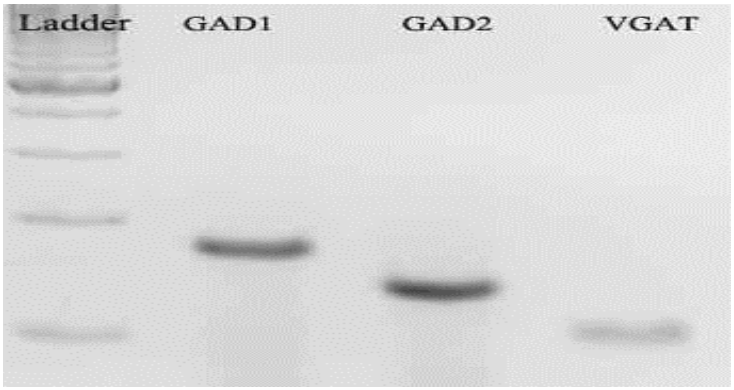
نمودار ۱. مقایسه درصد سلول‌های زنده در مرحله پیشالقا (گراف بالا) درروزهای اول، دوم و سوم پیش‌القا و در مرحله القا (گراف پایین) در روزهای اول تا ششم القا. گروه پیش‌القا، شامل سلول‌های BMSCs که به‌مدت یک، دو و سه روز، تحت تأثیر βME ۱ میلی‌مولار و رتینوییک اسید۱۰ میکرومولار قرارگرفتند. گروه القا، شامل سلول‌های پیش‌القاشده که با کریاتین ۵ میلی‌مولار به‌مدت شش روز پس از مرحله پیش‌القا، تحت القا قرارگرفتند. درگراف بالا علامت* بیانگر اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها (P < ۰/۰۵) است؛ همچنین علامت † بیانگر اختلاف معنی‌دار در بقای سلول‌ها در روز چهارم نسبت‌به سایر روزها (P < ۰/۰۵) است. در گراف پایین، علامت* بیانگر اختلاف معنی‌دار درصد مرگ‌ومیر در روزهای پنجم و ششم نسبت‌به سایر روزها در گروه‌های القاست (P < ۰/۰۵).



نمودار۲. نمودار میانگین درصد بیان آنتی‌بادی‌های Fibronectin(Fn) ، nestin ، MAP2 ، Syp ، NeuN، GAD، VGAT و GABA، توسط روش ایمونوسیتوشیمی‌در سلول‌های BMSCs و در پایان مراحل پیش‌القا و القا را نشان‌می‌دهد؛ * نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) در گروه BMSCs با گروه‌های تمایزیافته است؛ † بیانگر اختلا ف معنی‌دار در بیان nestin در گروه پیش‌القا نسبت‌به دیگر گروه‌هاست و ψ بیانگر اختلاف معنی‌دار بیان GABA در گروه القا نسبت‌به سایر گروه‌هاست.



شکل ۱. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی fibronectin در BMSCs (A) ، بیان nestin در پایان مرحله پیش‌القا (B)، بیان MAP2 (C)، GABA (D)، Synaptophysin (E) و NeuN (F) همگی در پایان مرحله القا هستند، رنگ سبز آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC است. برای شمارش سلول‌ها از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده‌شده که هسته سلول‌ها قرمز شود.



شکل۲. بیان ژن‌های GAD1، GAD2، VGAT پس از القا در سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی. لدر دویست جفت بازی در سمت چپ قرار گرفته‌است.

جدول ۱. پرایمرهای RT-PCR

ژن	پرایمر(3′→5′)	جفت باز
GAD1	F: AACAGTAGAGACCCCAAGAC R: GCAGATCTTGAGCAAACAG	336
GAD2	F: AGAGAGGAGGACTGATGC R: TTGTGTGCTGAGGCTTCC	279
VGAT	F: TTCCTATCTCCATCGGCATC R: TCCGTGATGACTTCCTTGG	198

منابع

1. M. Bosch, J.R. Pineda, C. Sunol, J. Petriz, E. Cattaneo, J. Alberch, J.M. Canals. Induction of GABAergic phenotype in a neural stem cell line for transplantation in an excitotoxic model of Huntington's disease. Experimental neurology. 2004; 190: 42-58.
2. K.L. Lanctot, N. Herrmann, P. Mazzotta, L.R. Khan, N. Ingber. GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia, Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie. 2004; 49: 439-453.
3. V. Schuler, C. Luscher, C. Blanchet, N. Klix, G. Sansig, K. Klebs, M. Schmutz, J , et al . Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). Neuron. 2001; 31: 47-58.
4. J.L. Rubenstein, M.M. Merzenich. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. Genes, brain, and behavior. 2003; 2: 255-267.
5. C. Frahm, C. Haupt, O.W. Witte. GABA neurons survive focal ischemic injury. Neuroscience.2004; 127: 341-346.
6. G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, F. Mavilio. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998; 279: 1528-1530.
7. M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284: 143-147.
8. D. Woodbury, K. Reynolds, I.B. Black. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. Journal of neuroscience research. 2002; 69: 908-917.
9. D. Woodbury, E.J. Schwarz, D.J. Prockop, I.B. Black. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. Journal of neuroscience research. 2000; 61: 364-370.
10. M. Naghdi, T. Tiraihi, S.A. Namin, J. Arabkheradmand. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. Cytotherapy. 2009; 11: 137-152.
11. R.H. Andres, A.D. Ducray, A.W. Huber, A. Perez-Bouza, S.H. Krebs, U. Schlattner, R.W. Seiler, T. Wallimann, H.R. Widmer. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. Journal of neurochemistry. 2005; 95: 33-45.
12. P. Klivenyi, N.Y. Calingasan, A. Starkov, I.G. Stavrovskaya, B.S. Kristal, L. Yang, B. Wieringa, M.F. Beal. Neuroprotective mechanisms of creatine occur in

the absence of mitochondrial creatine kinase. Neurobiology of disease. 2004; 15: 610-617.

13. O. Braissant, H. Henry. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: A review. Journal of inherited metabolic disease (2008).

14. L. Chen, R. Roberts, D.L. Friedman. Expression of brain-type creatine kinase and ubiquitous mitochondrial creatine kinase in the fetal rat brain: evidence for a nuclear energy shuttle. The Journal of comparative neurology.1995; 363: 389-401.

15. O.N. Hausmann, K. Fouad, T. Wallimann, M.E. Schwab. Protective effects of oral creatine supplementation on spinal cord injury in rats. Spinal cord. 2002; 40: 449-456.

16. A.D. Ducray, R. Qualls, U. Schlattner, R.H. Andres, E. Dreher, R.W. Seiler, T. Wallimann, H.R. Widmer. Creatine promotes the GABAergic phenotype in human fetal spinal cord cultures. Brain research. 2007; 1137: 50-57.

17. M. Maden.Role and distribution of retinoic acid during CNS development. International review of cytology.2001; 209: 1-77.

18. C. Chatzi, T. Brade, G. Duester. Retinoic acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the basal ganglia. PLoS biology.2011; 9: 4 e1000609.

19. P. Mohammad-Gharibani, T. Tiraihi, J. Arabkheradmand. In vitro transdifferentiation of bone marrow stromal cells into GABAergic-like neurons. Iranian biomedical journal. 2009; 13: 137-143.

20. A. Abdanipour, T. Tiraihi. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer. Brain research. 2012; 1440: 23-33.

21. A. Abdanipour, T. Tiraihi, A. Delshad. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. Iranian biomedical journal. 2011; 15: 113-121.

22. M. Dezawa, H. Kanno, M. Hoshino, H. Cho, N. Matsumoto, Y. Itokazu, N. Tajima, H. Yamada, H. Sawada, H. Ishikawa, T. Mimura, M. Kitada, Y. Suzuki, C. Ide. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. The Journal of clinical investigation. 2004; 113: 1701-1710.

23. A.R. Khalatbary, T. Tiraihi. Localization of bone marrow stromal cells in injured spinal cord treated by intravenous route depends on the hemorrhagic lesions in traumatized spinal tissues. Neurological research. 2007; 29: 21-26.

24. F.M. Lamoury, J. Croitoru-Lamoury, B.J. Brew. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. Cytotherapy. 2006; 8: 228-242.

25. Y. Li, M. Chopp, J. Chen, L. Wang, S.C. Gautam, Y.X. Xu, Z. Zhang. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. journal of cerebral blood flow and metabolism. 2000; 20: 1311-1319.

26. G. Li, Y. Ke, X. Jiang, R. Xu, Y. Zhou, W. Wang, W. Cheng, K. Liao. A pilot study on the culture and differentiation of bone marrow stromal cells from SD rats. S, Journal of biomedical engineering. 2004; 21: 16-20.

27. K. Mareschi, M. Novara, D. Rustichelli, I. Ferrero, D. Guido, E. Carbone, E. Medico, E. Madon, A. Vercelli, F. Fagioli. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K+ channel types. Experimental hematology. 2006; 34: 1563-1572.

28. F. Scintu, C. Reali, R. Pillai, M. Badiali, M.A. Sanna, F. Argiolu, M.S. Ristaldi, V. Sogos. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. BMC neuroscience. 2006; 7: 14.

29. R.H. Andres, A.D. Ducray, U. Schlattner, T. Wallimann, H.R. Widmer. Functions and effects of creatine in the central nervous system. Brain research bulletin . 2008; 76: 329-343.

30. A.D. Ducray, J.A. Schlappi, R. Qualls, R.H. Andres, R.W. Seiler, U. Schlattner, T. Wallimann, H.R. Widmer. Creatine treatment promotes differentiation of GABA-ergic neuronal precursors in cultured fetal rat spinal cord. Journal of neuroscience research. 2007; 85: 1863-1875.

31. A. Kalyani, K. Hobson, M.S. Rao. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. Developmental biology. 1997; 186: 202-223.