

دانشور پژوهشی

بررسی بیان نشانگرهای شبه‌نور و اپیتلیالی، شبه‌نورونی و شبه‌گابا ارژیکی در سلول‌های القا شده 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 - گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران
 ۲. استاد - گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۳. استادیار - گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
 ۴. استاد - گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- * نویسنده مسئول: تقی طریحی
E-mail: takialtr@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های استرومایی مغز استخوان یک منبع در دسترس 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 گابا ارژیک باعث ایجاد بیماری‌های تخریب نورونی می‌شود. در این مطالعه، ایجاد سلول‌های عصبی شبه‌گابا ارژیکی از سلول‌های بنیادین مغز استخوان به وسیله عوامل القاگر مناسب بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا سلول‌های استرومایی مغز استخوان از استخوان‌های ران و ساق پای رات جدا شد و پس از پاساژ سوم سلول‌های استرومایی مغز استخوان در محیط پیش‌القایی بتامرکاپتو اتانل ۱ میلی‌مولار و رتینویک اسید ۱۰ میکرومولار و سپس در محیط کشت القایی حاوی کریاتین ۵ میلی‌مولار به‌عنوان عوامل القاگر در روزهای مختلف قرار داده شد. در مراحل پیش‌لقا و القا آثار عوامل القایی با روش‌های ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR بررسی شدند. نتایج: نتایج نشان‌داد که پس از مرحله القا میزان زیادی از نورون‌های شبه‌گابا ارژیکی ایجاد شدند، براساس ارزیابی به‌وسیله آنتی‌بادی اختصاصی سلول‌های گابا ارژیکی کریاتین ۵ میلی‌مولار و رتینویک اسید ۱۰ میکرومولار در روز چهارم القا بیشترین میزان تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به نورون‌های شبه‌گابا ارژیکی را داشتند. نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادین مغز استخوان، تحت تأثیر القاگرهای بتامرکاپتو اتانل، رتینویک اسید و کریاتین توانایی تبدیل به سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی را دارند.

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

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

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

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 (۴) پارکینسون و ضایعات مغزی و نخاعی نقش دارند (۵)؛ بنابراین ایجاد سلول‌های گابا ارژیک 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 از دست می‌رود یا سلول‌های بافت تخریب می‌شوند (۲). مشخص شده که سلول‌های بنیادین مغز استخوان می‌توانند موجب تشکیل طیفی وسیع از بافت‌های همبندی به‌طور کامل تمایز یافته، شامل غضروف، بافت چربی، استخوان، عصبی و همبندی شوند (۶، ۷، ۸ و ۹). محققان، گزارش‌هایی مبنی بر تمایز سلول‌های بنیادین مغز استخوان به سلول‌های عضله اسکلتی (۶)، عضله قلبی، هیپاتوسیت، گلیاها و نورون‌ها در شرایط *In vitro* ارائه‌داده‌اند (۶، ۷ و ۸)؛ در مطالعات انجام‌شده نشان‌داده شده است که سلول‌های بنیادین مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی، توانایی تبدیل شدن به سلول‌های عصبی، تحت القاگرهای مناسب را دارند (۶، ۹ و ۱۰).

کریاتین نقش مهمی در برآوردن نیاز زیاد سیستم عصبی به انرژی در تکامل و کارکردهای این سیستم بر-عهده‌دارد و این نقش را از طریق بافرینگ ATP انجام می‌دهد (۱۱). کریاتین سوپسترای آنزیم کریاتین کیناز است که میزان ATP سلول را تنظیم می‌کند؛ همچنین به-عنوان یک نوروترانسمیتر و یک اسمولیت اصلی در سیستم عصبی است (۱۱). کریاتین در سیستم عصبی بیشتر به‌صورت آندوژنز تأمین می‌شود، زیرا سد خونی مغزی نفوذپذیری کمی به این ماده دارد (۱۱). در

مطالعات قبلی نشان‌داده شده است که کریاتین ۵ میلی-مولار در افزایش تراکم و بقای سلول‌های گابا ارژیکی کشت سلول‌های استریاتوم نقش دارد درحالی‌که هیچ افزایشی در تعداد کل نورون‌ها مشاهده نشد، این می-تواند نشان‌دهنده این باشد که کریاتین به‌عنوان یک عامل تمایزدهنده است (۱۱)؛ همچنین گزارش شده 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، ۱۴ و ۱۵). گزارش شده است که کریاتین توانایی تولید سلول‌های گابا ارژیکی از استریاتوم (۱۱) و نخاع جنین رات (۱۶) را دارد.

رتینویک اسید فراورده متابولیک ویتامین A (رتینول) است که در القا، تمایز نورونی، رشد آکسونی و ترمیم عصبی نقش دارد (۱۷). جانداران، ویتامین A تولید نمی‌کنند بلکه آن را از طریق مواد غذایی گیاهی با عنوان کاروتون یا مواد غذایی گوشتی با عنوان رتینوئیدها دریافت می‌کنند (۱۷). ترکیب هم‌زمان رتینویک اسید با استفاده از شاخص‌های رشد مختلف، سبب ایجاد انواع سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادین جنینی، خونی و عصبی می-شود. در مطالعه‌ای نشان‌داده شده که سلول‌های بنیادی جنینی پس از سه روز قرارگرفتن در معرض رتینویک اسید ۱۰ میکرومولار، سبب ایجاد حدود ۴۰ درصد سلول‌های گابا ارژیکی شده است (۱۸).

آقای غریبانی و همکاران، سلول‌های بنیادین مغز استخوان را در معرض بتامراکپتواتانل به مدت ۱ ساعت و سپس رتینویک اسید به مدت دو روز در مرحله پیش‌القا قرار دادند و سلول‌ها را در مرحله القا، سه روز در کلرید پتاسیم ۴۰ میلی‌مولار قرار دادند که باعث ایجاد سلول‌های گابا ارژیکی تا ۶۰ درصد شدند (۱۹)؛ در این

کریاتین ۵ میلی مولار در (۱:۱) DMEM:F12، 5% FBS، برای یافتن بیشترین درصد سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی، به مدت یک تا شش روز قرارداد شدند. 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 سلول‌های شبه‌نورو اپیتلیالی nestin، بیان نشانگرهای شبه-نورونی NeuN، Synaptophysin(Syp)، MAP2 و همچنین بیان ژن‌های سلول‌های بیان‌کننده گابا ارژیکی VGAT، GAD1، GAD2 قرار شد.

تعیین میزان سلول‌های زنده با رنگ‌آمیزی تریپان بلو
برای انجام viability، حجمی از سلول‌ها با نسبت یکسان به وسیله رنگ تریپان بلو رنگ‌آمیزی شدند، تریپان بلو به سلول‌های مرده، وارد شده، سیتوپلاسم آنها آبی می‌شود، درحالی‌که سلول‌های زنده، رنگ را به خود جذب نمی‌کنند و سیتوپلاسم آنها روشن است. پس از شمارش سلول‌های زنده و مرده به وسیله لام نئوبار، درصد viability محاسبه شد.

بررسی ایمونوسیتوشیمی

پس از ترپسینه‌کردن سلول‌های بنیادین مغز استخوان در پاساژ سوم، تعداد ۴ هزار سلول به‌طور مساوی در هر یک از خانه‌های پلیت شش خانه‌ای لامل‌گذاری شده ریخته شدند. مراحل بررسی ایمونوسیتوشیمی مشابه پرتکل‌های توصیه‌شده انجام شد (۱۹ و ۲۰)؛ به‌طور خلاصه، سلول‌ها در محلول پارافرمالیدید ۴ درصد به-مدت ۲۰ دقیقه قرارداد شدند؛ پس از شستشو با فسفات بافر، سلول‌ها درون تریتون ایکس ۰/۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرارداد شدند. پس از شستشو با فسفات بافر سلول‌ها در آنتی‌بادی اولیه به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. آنتی‌بادی‌های اولیه، شامل آنتی‌بادی‌های اولیه Fibronectin (۱:۴۰۰)، nestin

تحقیق، سعی شد که با روش تلفیق عوامل القایی کریاتین و رتینوییک اسید میزان تمایز سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی از سلول‌های بنیادین مغز استخوان افزایش یابد. با توجه به تولید سلول‌های گابا ارژیکی توسط سایر محققان، هدف از انجام این تحقیق، افزایش تولید سلول‌های شبه-نورویایی تلیالی و شبه‌گابا ارژیکی است. از آنجاکه نورون‌های گابا ارژیکی در سیستم عصبی دارای عملکردهایی بسیار، شامل اثر القایی روی سایر نورون‌ها علاوه بر اثر مهاری هستند، شاید در آینده بتوان برای سلول‌درمانی در درمان بیماری‌های سیستم عصبی از این سلول‌ها استفاده کرد.

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 استفاده شد؛ حیوانات در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط استاندارد حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس با رعایت قوانین اخلاقی نگهداری شدند؛ 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: FBS(fetal bovine serum) 10% (DMEM/F12; Gibco) به همراه F12 (DMEM/F12; Gibco) قرار داده شدند. تمایز سلول‌های بنیادین مغز استخوان به سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی، طی دو مرحله پیش‌القا و القا صورت گرفت. برای انجام پیش‌القا، با کاهش سرم سلول‌ها در محیط کشت (DMEM:F12(۱:۱)، 5% FBS، بتامرکاپتوتانل ۱ میلی-مولار و رتینوییک اسید ۱۰ میکرومولار به‌مدت یک، دو و سه روز قرار گرفت؛ پس از به‌دست آوردن بهترین روز با کمترین درصد مرگ‌ومیر، سلول‌ها با فسفات بافر سالین شستشو داده‌شده، در محیط کشت القایی حاوی

مرگ‌ومیر را در سلول‌ها داشته‌باشند، استفاده‌شد. نمودار ۱A نشان‌دهنده میزان مرگ‌ومیر در مرحله پیش‌القاست. در مرحله پیش‌القا اثر β ME (β -mercaptoethanol) و رتینویک اسید روی سلول‌های BMSCs (Bone marrow stem cells) در روز صفر (BMSCs در محیط بدون عوامل القاگر که به‌عنوان گروه شاهد D0 در نظر گرفته‌شد)؛ 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 نورواپتیلیالی nestin را داشته‌باشند و ازسویی دیگر با توجه به عوارض مرگ‌ومیر ناشی از عوامل القایی، کمترین میزان مرگ‌ومیر را نیز دارا باشند. با توجه به بیشترین میزان بیان مارکر شبه‌نورواپتیلیالی nestin (نمودار ۲) در روز سوم پیش‌القا و میزان viability بیشتر در روز سوم نسبت به روز چهارم (نمودار ۱B)، این روز به‌عنوان پیش‌القا برای ادامه کار مرحله القا انتخاب‌شد. نمودار ۱B نشان‌دهنده میزان مرگ‌ومیر در مرحله القا است. در مرحله القا سلول‌هایی که سه روز پیش‌القا شده‌اند، برای مدت یک تا شش روز (D1 تا D6) در محیط کشت القایی حاوی کریاتین ۵ میلی‌مولار قرار-گرفتند (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. از آنجاکه 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 القا شده در روز ۴ (نمودار ۲)، این روز به‌عنوان دز مناسب القا استفاده‌شد. نمودار ۱، درصد سلول‌های زنده در پایان مرحله پیش‌القا و گروه القا را نشان‌می‌دهد. همان‌طور که شکل نشان‌می‌دهد درصد زنده-

(۱:۳۰۰)، MAP2 (۱:۶۰۰)، 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 کوئژوگه به FITC(1:100; Chemicon) که به رنگ سبز دیده‌می‌شود به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرارداده‌شدند. برای شمارش سلول‌ها از رنگ اتیدیوم بروماید که هسته سلول‌ها قرمز می‌شود، استفاده-شد. 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) استخراج-شدند و با استفاده از کیت سنتز cDNA (Fermentas) به cDNA تبدیل‌شدند؛ سپس cDNA حاصل به روش PCR تکثیر شده، روی ژل آگاروز بررسی‌شد (۲۱).

تجزیه و تحلیل آماری

تمام مقادیر برحسب $Mean \pm SEM$ 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 $P < 0/05$ در نظر گرفته‌شد.

یافته‌ها

تعیین میزان زنده‌ماندن سلول‌ها با تربیان بلو در مرحله القا از viability test در مراحل پیش‌القا و القا برای انتخاب روز و دز مناسب عوامل القایی که کمترین

گروه BMSCs بیان‌کرد (نمودار ۲ و شکل ۱)، درحالی که میزان تمایز به سلول‌های شبه‌نورونی توسط ارزیابی با آنتی‌بادی‌های MAP2، Syn1 و NeuN در همین روز کم و به ترتیب 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 شبه‌گابارژیکی ایجاد شد (۶۶ درصد).

بررسی تمایز در پایان مراحل القا به روش RT-PCR

در بررسی RT-PCR بانندی واضح از بیان ژن‌های GAD1، GAD2 و VGAT روی ژل الکتروفورز به خوبی ظاهر شد (شکل ۲ و جدول ۱) درحالی‌که این سه ژن در سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیان‌نشده. 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 بتامراکپتواتانل و رتینویک اسید ۱۰ میکرومولار به مدت سه روز، در محیط کشت القایی حاوی DMEM:F12(1:1)، 5% FBS و کریاتین ۵ میلی‌مولار به مدت چهار روز، توانایی تولید سلول‌های شبه‌گابارژیکی دارند.

بحث

سلول‌های بنیادین مغز استخوان، منبعی خوب برای درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند؛ به راحتی به دست می‌آیند و مشکلات دفع شدن به وسیله سیستم ایمنی در صورت پیوند، ندارند (۲۲). سلول‌های بنیادین مغز استخوان، پس از کشت و چند پاساژ، مورفولوژی یکسانی پیدا کرده، برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی به دلیل وجود فیبرونکتین در سلول‌هایی با منشأ مزانشیمی به روش ایمونوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی شدند؛ بیان ۹۲ درصدی این پروتئین در سلول‌ها مؤید

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

بررسی تمایز با روش ایمونوسیتوشیمی

شکل ۱- میکروگراف مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی اولیه آنتی fibronectin از سلول‌های (A) BMSCs، بیان nestin در پایان مرحله پیش‌القا (B)، بیان NF200 (نشانه‌گر 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 دیده می‌شوند؛ برای شمارش سلول‌ها از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده شده که هسته سلول‌ها قرمز شود.

برای اثبات استرومایی بودن سلول‌های BMSCs و تعیین خلوص آنها از آنتی‌بادی فیبرونکتین استفاده شد. شکل ۱، سلول‌ها را با سیتوپلاسم حاوی رشته‌های سبز-رنگ فیبرونکتین نشان می‌دهد که ۹۶ درصد سلول‌ها با آنتی‌فیبرونکتین واکنش دادند؛ همچنین در این مرحله، بررسی ایمونوسیتوشیمی BMSCs با استفاده از آنتی‌بادی‌های MAP2، Synaptophysin(Syp)، NeuN، Nestin، GAD، VGAT و GABA انجام شد که در بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های BMSCs بعد از مراحل پیش-القا و القا درصدهایی متفاوت از ایمونوپوزیتیو بودن سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت تشخیص داده شد (نمودار ۲). به منظور تعیین درصد سلول‌های ایمونوپوزیتیو شبه‌عصبی، شبه‌نورونی و همچنین شبه-گابارژیکی، شمارش سلولی صورت گرفت. در گروه پیش‌القا، بیان مارکر nestin اغلب به طور معنی‌داری درصد سلول‌های شبه‌نورواپیتلیال بیشتری را نسبت به

بنیادی بودن آنها بود (۲۳). لاموری و همکارانش با استفاده از آنتی‌بادی ضد فیبرونکتین هیت سلول‌های بنیادین مغز استخوان را تأیید کردند (۲۴). سلول‌های بنیادین مغز استخوان، پس از قرار گرفتن در محیط القایی در معرض شاخص‌های رشد، نوروتروفین‌ها، β ME و RA (Retinoic acid)، میزان بیان پروتئین فیبرونکتین کاهش یافت و پروتئین‌های شبه‌عصبی بیان شد که تأیید کننده سایر تحقیق‌هاست (۸ و ۲۵). RA نقشی ضروری در رشد و تکامل سلول‌ها دارد؛ این ماده در بافت‌های مختلف جنینی و بالغ به‌ویژه در سیستم عصبی وجود دارد که سبب القای تمایز عصبی می‌شود. آقای لی و همکاران، سلول‌های بنیادین مغز استخوان را از موش صحرایی بالغ استخراج و به‌وسیله RA، سلول‌های شبه‌عصبی ایجاد کرد (۲۶)؛ پژوهشگری دیگر، سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی بالغ را برای ۲۴ ساعت در معرض β ME و سپس سه روز در معرض RA قرارداد؛ با این روش سلول‌های شبه‌عصبی ایجاد شد (۸، ۲۷ و ۲۸). کریاتین سوپسترای برای آنزیم کریاتین کیناز موجود در سیتوپلاسم و میتوکندری بوده، به افزایش نسبت فسفوکریاتین به ATP منجر می‌شود (۲۹)؛ همچنین اثبات شده است که کریاتین در سلول‌های عصبی آسیب‌دیده، خاصیت ضد آپوپتوتیک دارد (۱۶ و ۳۰)؛ نتایج به دست آمده در این آزمایش بیانگر این نکته است که با استفاده از القاکننده β ME و به دنبال آن RA و کریاتین می‌توان سلول‌های استرومائی مغز استخوان موش صحرایی را به‌طور عمده، به سمت سلول‌های شبه‌گابا ارژیک تمایز داد. تمایز سلول‌های بنیادی نخاع جنین

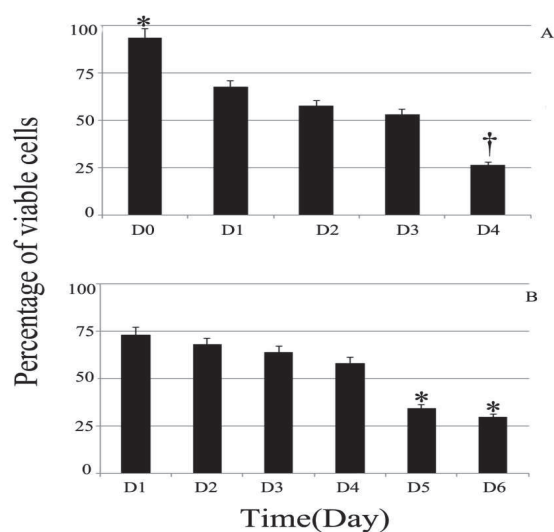
و ناحیه استریاتوم تحت تأثیر کریاتین ارائه شده، در آنها میزان زیادی از سلول‌های بیان‌کننده گابا به دست آمد (۱۱ و ۱۶). از آنجاکه سلول‌های نورواپتیلیال تحت شرایط خاص و عوامل القایی به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابند (۳۱)، در این تحقیق سعی شد با استفاده از القاکننده کریاتین، این موضوع بیشتر بررسی شود؛ از آنجاکه سلول‌های گابا ارژیکی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های دستگاه عصبی نقش دارد، بنابراین ایجاد سلول‌های گابا ارژیکی با درصد بالا از سلول‌های بنیادین مغز استخوان می‌تواند پیشنهادی مناسب در سلول درمانی، برای پیوند اتولوگ در بیماران سیستم عصبی باشد.

نتیجه‌گیری

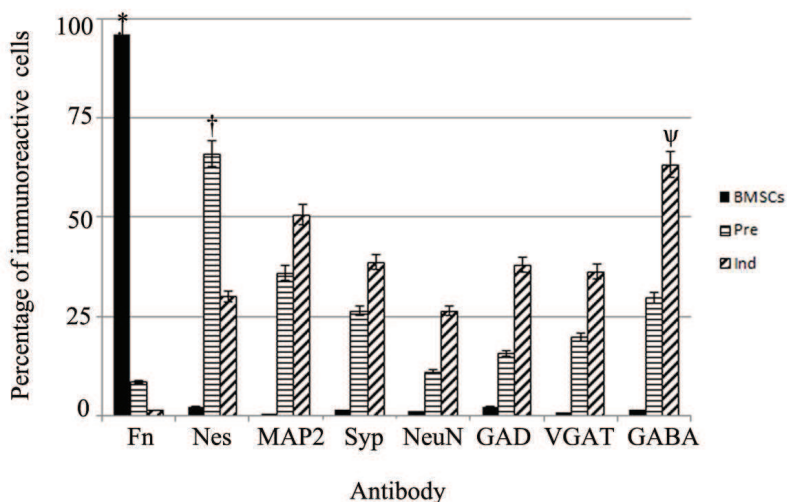
بنابراین پس از مرحله پیش‌القا توسط β ME ۱ میلی-مولار و RA ۱۰ میکرومولار و سپس القا با کریاتین ۵ میلی‌مولار به مدت چهار روز، بیشترین درصد نورون‌های شبه‌گابا ارژیکی به میزان حدود ۶۶ درصد به دست آمد؛ همچنین سلول‌های استرومائی مغز استخوان، طی فرایند تمایز توانایی بیان مارکرهای ایمنوسیتوشیمیایی شبه‌نورواپتیلیالی، شبه‌نورونی، بیان مارکر سیناپسی و سلول‌های شبه‌گابا ارژیکی را دارند.

تشکر و تقدیر

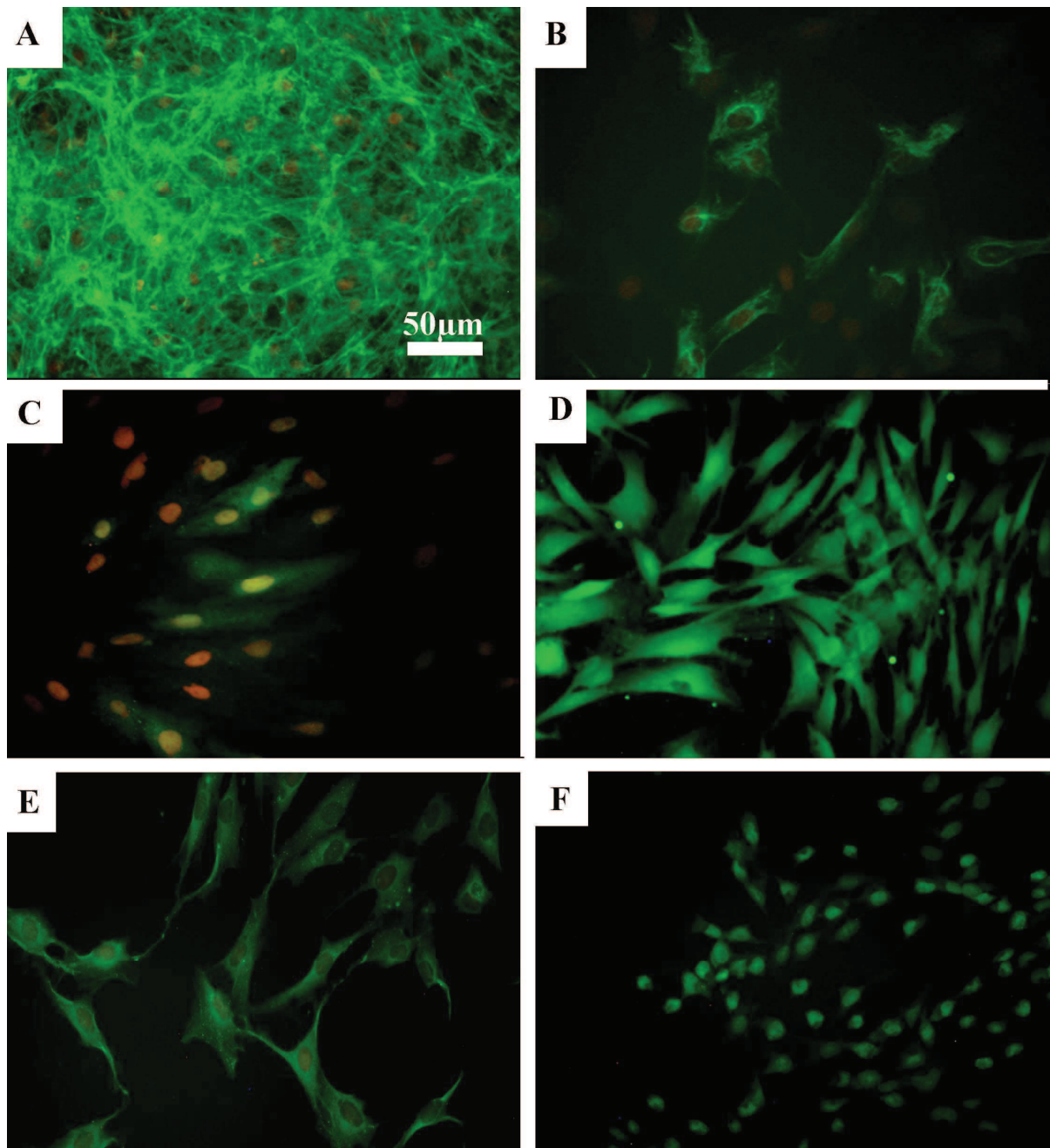
این پژوهش در دانشگاه تربیت مدرس تهران و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیای تهران انجام شد. از حمایت مالی و معنوی مرکز علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیای تقدیر و تشکر می‌شود.



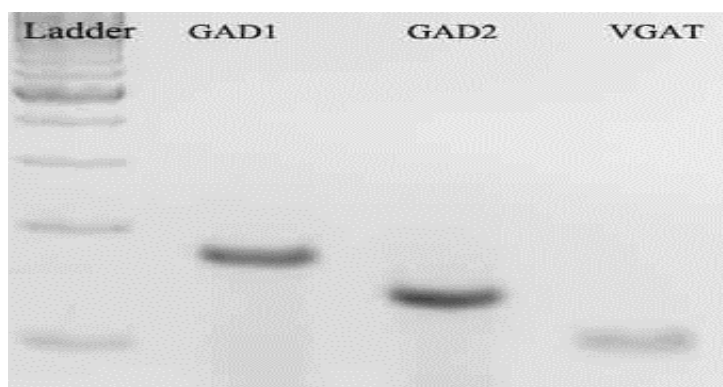
نمودار ۱. مقایسه درصد سلول‌های زنده در مرحله پیش‌القا (گراف بالا) در روزهای اول، دوم و سوم پیش‌القا و در مرحله القا (گراف پایین) در روزهای اول تا ششم القا. گروه پیش‌القا، شامل سلول‌های BMSCs که به مدت یک، دو و سه روز، تحت تأثیر ۱ βME میلی‌مولار و رتینویک اسید ۱۰ میکرومولار قرار گرفتند. گروه القا، شامل سلول‌های پیش‌القا شده که با کریاتین ۵ میلی‌مولار به مدت شش روز پس از مرحله پیش‌القا، تحت القا قرار گرفتند. در گراف بالا علامت * بیانگر اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها ($P < 0.05$) است؛ همچنین علامت † بیانگر اختلاف معنی‌دار در بقای سلول‌ها در روز چهارم نسبت به سایر روزها ($P < 0.05$) است. در گراف پایین، علامت * بیانگر اختلاف معنی‌دار درصد مرگ‌ومیر در روزهای پنجم و ششم نسبت به سایر روزها در گروه‌های القاست ($P < 0.05$).



نمودار ۲. نمودار میانگین درصد بیان آنتی‌بادی‌های (Fn، nestin، MAP2، Syp، NeuN، GAD، VGAT، GABA) توسط روش ایمنوسیتوشیمی در سلول‌های BMSCs و در پایان مراحل پیش‌القا و القا را نشان می‌دهد؛ * نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در گروه BMSCs با گروه‌های تمایز یافته است؛ † بیانگر اختلاف معنی‌دار در بیان nestin در گروه پیش‌القا نسبت به دیگر گروه‌هاست و ψ بیانگر اختلاف معنی‌دار بیان GABA در گروه القا نسبت به سایر گروه‌هاست.



شکل ۱. رنگ آمیزی 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 استفاده شده که هسته سلول‌ها قرمز شود.



شکل ۲. بیان ژن‌های GAD1، GAD2، VGAT پس از القا در سلول‌های شبه‌گابا ارزیکی. لدر دویست جفت بازی در سمت چپ قرار گرفته است.

جدول ۱. پرایمرهای RT-PCR

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

منابع

- 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.
- K.L. Lancot, 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.
- 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.
- 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.
- C. Frahm, C. Haupt, O.W. Witte. GABA neurons survive focal ischemic injury. *Neuroscience*. 2004; 127: 341-346.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Transdifferentiation 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. Intraatrial 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. *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. Argioli, 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 GABAergic 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.