بررسی اثر دپرنیل بر تمایز سلول‌های استرومایی به سلول‌های عصبی تولیدکننده دوپامین در موش صحرایی

محمدتقی قربانیان [*۱]، تقی طریحی [۲]، سیدعلیرضا مصباح نمین [۳]، ناصر نقدی [۴]

خلاصه

سابقه و هدف: سلول‌های استرومایی مغز استخوان منبع با ارزشی برای پیوند اتوگرافت جهت استفاده بالینی در زمینه ترمیم سیستم عصبی مرکزی بوده و می‌توانند به انواع رده‌های سلولی از جمله سلول‌های عصبی تمایز یابند. تحقیقات نشان داده دپرنیل در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون اثر دارد و دارای اثر تروفیک روی سلول‌های عصبی در محیط in vitro می‌باشد. در این تحقیق اثر داروی دپرنیل بر تمایز سلول‌های استرومایی به سلول‌های عصبی تولیدکننده دوپامین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به روش ایمنوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز و اندازه‌گیری میانجی‌های عصبی دوپامین به روش HPLC تمایز BMSCs به سلول‌های شبه‌عصبی بررسی شد. همچنین به روش RT-PCR بیان ژن عامل نوروتروفیک BDNF در BMSCs مورد مطالعه قرار گرفت. داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج بررسی مولکولی نشان‌دهنده‌ی افزایش بیان ژن BDNF توسط سلول‌های القا شده با دپرنیل است. بررسی ایمنوسیتوشیمی (تیروزین هیدروکسیلاز) و کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) نشان داد که داروی دپرنیل با غلظت ۸-۱۰ مولار ظرفیت تمایز BMSCs به سلول‌های دوپامینرژیک و تولید و ترشح دوپامین را دارا است.

نتیجه‌گیری: سلول‌های استرومایی می‌توانند به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز یافته و برای پیوند سلولی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، دپرنیل، دوپامین، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا

۱- استاد گروه زیست شناسی دانشگاه علوم پایه دامغان

۲- استاد گروه آناتومی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۴- استاد بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی موسسه پاستور

* نویسنده مسوول: محمدتقی قربانیان

آدرس: دامغان، دانشگاه علوم پایه دامغان، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۶۷۱۶۴۱۱۶۷

پست الکترونیک: mtghorbanian@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۲ ۵۳۱ ۸۷۳۲

دورنویس: ۰۲۳۲ ۵۲۴۷۱۴۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۲۳

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۸/۲۵

مقدمه

بیماری پارکینسون یک اختلال تحلیل‌برنده‌ی سیستم عصبی (نورودژنراتیو) است که با از بین رفتن سلول‌های عصبی دوپامینرژیک در ماده‌ی سیاه مرتبط است [۱]. تاکنون روش‌های مختلف درمانی موفق نشده است که موجب توقف این بیماری شود. جایگزین کردن سلول‌های دوپامینرژیک، یکی از روش‌هایی است که می‌تواند از نظر بالینی این اختلال را بهبود بخشد. پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان، کاندید مناسبی برای درمان به روش پیوند سلولی است [۱]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی BMSCs (Bone marrow stromal cells) اولین بار توسط Alexander Friedenstein از مغز استخوان موش صحرایی جدا شده و مورد مطالعه قرار گرفت [۲]. اگر سلول‌های بنیادی مغز استخوان در معرض ریزمحیط قرار بگیرند، می‌توانند به انواع سلول‌ها تمایز یابند. سلول‌های استرومایی مغز استخوان بالغ شامل سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های پروژنیتور است [۳]. BMSCs علاوه بر تمایز به سلول‌های با خاستگاه مزانشیمی نظیر استخوان، غضروف و عضله، می‌توانند در محیط‌های برون‌تنی و درون‌تنی به سلول‌های عصبی و گلیالی نیز تمایز یابند [۴]. تولید و پشتیبانی سلول‌های عصبی دوپامینرژیک (یا بیان‌کننده تیروزین

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

هیدروکسیلاز) در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی با استفاده از BMSCs، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است [۱،۵]. اخیرا گزارش شده است که BMSCs انسانی می‌تواند به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز یابند. در یکی از این مطالعات بعد از انتقال ژن Notch به BMSCs، ۴۰ درصد این سلول‌ها به سلول‌های عصبی بالغ با فعالیت الکتروفیزیولوژیک و فنوتیپ دوپامینرژیک تمایز یافتند. پس از پیوند این سلول‌ها به مدل حیوانی پارکینسون، بهبود رفتاری مشاهده گردید [۶]. اطلاعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد، دپرنیل از بین رفتن پیش‌رونده سلول‌های عصبی دوپامینرژیک را در ماده سیاه در جریان پیری و بیماری پارکینسون کاهش می‌دهد [۷]. این دارو در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند اثری مشابه با BDNF (Brain derived neurotrophic factor) داشته باشد. اثرات تروفیک دپرنیل ممکن است به طور غیرمستقیم، با آزاد شدن BDNF همراه باشد. از طرفی گزارش شده است که BDNF حیات سلول‌های عصبی دوپامینرژیک را پشتیبانی می‌کند [۸]. اثر تروفیک دپرنیل ممکن است در درمان بیماری تحلیل‌برنده ساز و کارها نقش موثر باشد [۹]. هدف این پژوهش بررسی اثر دپرنیل بر تمایز سلول‌های استرومایی به سلول‌های عصبی تولیدکننده دوپامین است.

مواد و روش‌ها

حیوان: در این پژوهش از موش صحرایی بالغ (۶ تا ۸ هفته) نژاد Sprague Dawley استفاده شده است. برای هر گروه، ۵ سرحیوان استفاده شد که این حیوانات در شرایط نوری ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد و آب و غذای کافی نگهداری شدند. به منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتکل هلسینکی سال ۱۹۷۵ و دستور کار انجمن علوم اعصاب آمریکا انجام شد.

جداسازی و کشت سلول: سلول‌های استرومایی مغز استخوان از استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی استخراج گردیدند. بدین ترتیب که پس از جدا کردن عضلات اتصالی و قطع دو انتهای استخوان، با محیط کشت α MEM[1] (Gibco) کامل شده با سرم (FBS)[2] ۱۰ درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین (Gibco) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، توسط سوزن ۲۱ gauge عمل تخلیه (Flash out) مغز استخوان صورت گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. با این روش، سلول‌های استرومایی به کف فلاسک (Falcon) چسبیده باقی می‌مانند و سلول‌های خونی حذف می‌گردند. هنگامی که سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد فلاسک را پر کردند، پاساژ داده شدند و کشت بعدی با تراکم سلولی کمتر انجام شد. پاساژ سلول‌ها توسط Trypsin ۰/۲۵ درصد و EDTA[3] ۰/۰۴ درصد (Merck) انجام شد و این عمل تا پنج پاساژ ادامه یافت. ارزیابی میزان حیات (Viability) سلول‌ها، به روش Haemocytometer انجام شد.

القا توسط دپرنیل: BMSCs به دو گروه کنترل (سلول‌ها در محیط کشت بدون القاکننده) و گروه آزمایش (سلول‌ها مدت ۲۴ ساعت در معرض دپرنیل با غلظت 10^{-8} مولار) تقسیم شد. برای هر گروه ۵ نوبت (تکرار) کشت انجام شد.

ایمنوسیتوشیمی: به منظور تعیین بیان آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز، BMSCs القاشده توسط دپرنیل و BMSCs القا نشده (گروه کنترل)، در زمان‌های تعیین شده برداشت شد و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شد. سپس سلول‌ها مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°c در معرض HCL نرمال قرار گرفتند. پس از این مرحله، شستشوی سلول‌ها دوبار به مدت ۱۰ دقیقه توسط بافر بورات ۰/۱ M با pH= ۸/۵ و در ادامه سه بار و هر بار ۵ دقیقه با PBS انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول ۰/۳ درصد Triton X-100 حاوی سرم بز ۱۰ درصد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز تهیه شده در خرگوش (Chemicon; 1:200) انکوبه شدند. به منظور جلوگیری از خشک شدن، نمونه‌ها با یک قطعه پارافیلم پوشانده شدند و به مدت یک شب در درجه حرارت ۴°c انکوبه گردیدند. بعد از سه بار شستشو به مدت ۱۵ دقیقه با PBS به مدت ۲۰ دقیقه در معرض دی آمینو بنزیدین (Sigma DAB) قرار گرفتند. در پایان با آب مقطر شستشو داده و آب‌گیری و شفاف‌سازی انجام شد. به منظور تعیین بیان گلیکوپروتئین فیبرونکتین، نمونه‌های سلولی برای ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در محلول فرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. بعد از قرار گرفتن در معرض محلول ۰/۳ درصد Triton X-100 حاوی سرم بز ۱۰درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، با آنتی‌بادی اولیه آنتی‌فیبرونکتین تهیه شده در خرگوش (abcam ;1:200) به مدت یک شب در دمای ۴°c انکوبه شدند. پس از شستشو به مدت ۱۵ دقیقه با PBS، به مدت یک ساعت در دمای اتاق در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC ضد گوسفند برای فیبرونکتین قرار گرفتند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

1- Minimum Essential Medium Eagle Alpha
2- Fetal bovine serum
3 - ethylene-diamine-tetra-acetic acid

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR: RNA کل سلولی بر اساس دستور کار کیت سیناژن[1] استخراج شد. پس از آن با استفاده از ۱ میکروگرم RNA کل و بر اساس دستور کار کیت cDNA (Fermentas-K1621) تهیه شد. در ادامه با استفاده از ۱ میکروگرم cDNA ساخته شده به همراه بافر، $MgCl_2$ ۱ میلی-مولار، dNTP ۰/۲ میلی‌مولار، پرایمر بالا و پایین دست ۱۰ پیکومولار، آنزیم Taq Polymerase ۰/۲۵ میکرولیتر و آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، طبق برنامه در ۳۰ سیکل توسط دستگاه ترمال سایکلر تکثیر DNA انجام شد. پرایمر مورد استفاده و اندازه و شماره دست‌یابی ژن BDNF (Brain derived neurotrophic) و ژن کنترل داخلی 2M (β2-microglobulin) β در Genbank به این ترتیب است:

[F: 5 ' GCCCAACGAAGAAAACCATA 3', R: 5' GATTGGGTAGTTCGGCATTG 3' (NM 012513 : 405 bp)]

[F: 5 ' CCGTGATCTTTCTGGTGCTT 3' ,R: 5 ' TTTTGGGCTCCTTCAGAGTG 3' (NM 012512: 318bp)]

شرایط PCR به این صورت است: ۱- Initial Denaturation ۹۴°c به مدت ۵ دقیقه، ۲-Denaturation ۹۴°c به مدت ۳۰ ثانیه، ۳- Annealing ۵۵°c به مدت ۳۰ ثانیه، ۴- Extension ۷۲°c، ۴۵ ثانیه و ۵- پس از اتمام ۳۰ سیکل آخرین مرحله Final Extension در دمای ۷۲°c به مدت ۱۰دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصول به دست آمده با ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. بافت مغز موش صحرایی بالغ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای آنالیز دوپامین توسط دستگاه HPLC: نخست به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه سلولی، ۱۲۵ میکرولیتر محلول perchloric acid نرمال، $Na_2S_2O_5$ و Na_2-EDTA اضافه شد. محلول را بر روی یخ قرار داده و برای ادامه کار در داخل میکروسانتریفوژ قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰۰ rpm انجام گرفت. ۵۵۰ میکرولیتر از محلول بالایی (سوپرناتانت) برداشته شد و تا زمان اندازه‌گیری دوپامین در دمای ۸۰°c- نگهداری شد. برای اندازه-گیری دوپامین، ۵۰ میکرولیتر از محلول سوپرناتانت با ۵۰ میکرولیتر فاز متحرک رقیق شد و مقدار ۴۰ میکرولیتر از این محلول برای اندازه‌گیری دوپامین به دستگاه HPLC با رد یاب الکتروشیمی تزریق گردید. در این تحقیق برای نشان دادن قابلیت تمایز سلول‌های استرومایی توسط دپرنیل، میزان دوپامین در سلول های عصبی تمایزیافته اندازه‌گیری شد. سلول‌ها در دو گروه و در ۵ نوبت (تکرار) کشت داده شدند که شامل: ۱- گروه کنترل، سلول‌های استرومایی القانشده ۲- گروه آزمایش، سلول‌هایی که توسط دپرنیل با غلظت 10^{-8} مولار القا شدند. در زمان‌های تعیین شده (۲۴، ۴۸ ساعت و ۷ روز) پس از القای سلول‌های استرومایی توسط دپرنیل، نمونه‌ها برای استخراج و اندازه‌گیری میزان دوپامین توسط دستگاه HPLC آماده شدند.

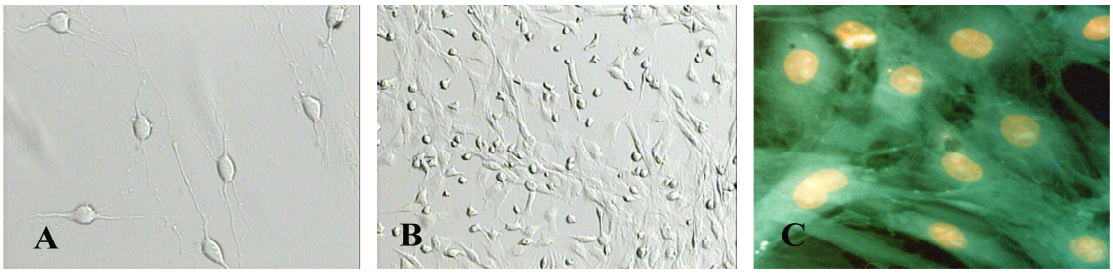
تحلیل آماری: داده‌های به دست آمده در گروه‌های آزمون، توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۴ و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

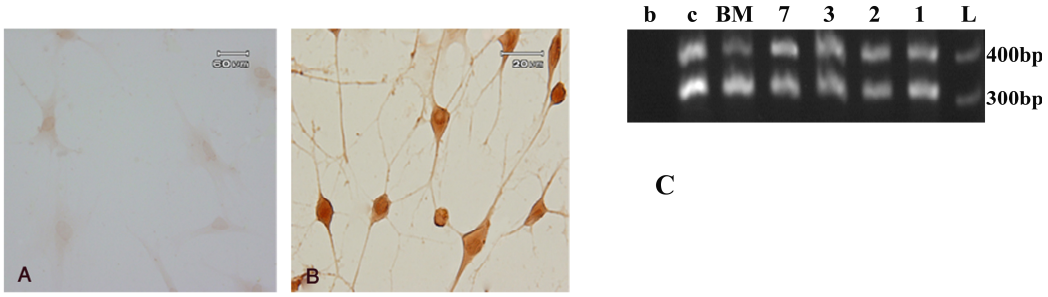
شناسایی سلول‌های استرومایی مغز استخوان و القا توسط دپرنیل: پس از استخراج سلول‌ها از مغز استخوان و کشت آنها در ظروف پلاستیکی مخصوص، این سلول‌ها به صورت یک لایه‌ی سلولی با مورفولوژی دوکی‌شکل نمایان شدند (تصویر ۱-B). هنگامی که ۷۰ تا ۸۰ درصد کف ظرف کشت از سلول پر شد، پاساژ سلولی یا تهیه subculture انجام شد. با ارزیابی میزان حیات، درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۵ درصد بود. برای تعیین میزان خلوص سلول‌های استرومایی از نشانگر آنتی‌فیبرونکتین استفاده شد. در شکل (۱-C)، سلول‌ها با سیتوپلاسم حاوی رشته-های سبزرنگ فیبرونکتین نشان داده می‌شود. برای شمارش سلول-های فیبرونکتین مثبت، هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز روشن درآمده‌اند و حدود ۹۷ درصد سلول‌ها با آنتی-فیبرونکتین واکنش دادند. در این تحقیق با استفاده از نشانگر آنتی-تیروزین هیدروکسیلاز تمایز BMSCs به سلول‌های دوپامینرژیک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج در گروه دپرنیل نشان می‌دهد که اکثر سلول‌های القا شده، به این نشانگر واکنش داده‌اند. سلول‌های القا نشده (BMSCs) نسبت به این نشانگر واکنشی نشان ندادند (تصویر ۲ -A و B).

1 - RNXTM [-Plus] Isolation of RNA Cat. No.: RN7713C

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۱- مشاهده سلول‌های BMSCs القاء شده توسط دپرنیل (تصویر A) و القا نشده (تصویرB) توسط میکروسکوپ اینورت (بزرگنمایی A - 400 X و B - 200X). C - رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس که سیتوپلاسم سلول‌های استرومایی به آنتی‌بادی فیبرونکتین واکنش داده به رنگ سبز و هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز متمایل به زرد مشاهده می‌شوند (بزرگنمایی 1000X).



شکل ۲- ایمنواستینینگ برای نشانگر آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز، قبل و ۴۸ ساعت پس از القای عصبی BMSCs، سلول القا نشده که رنگ نگرفته‌اند (تصویر A) ، سلول‌های القا شده توسط دپرنیل که به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند (تصویرB) C. الگوی بیان ژن BDNF قبل و بعد از القا توسط دپرنیل [یک روز پس از القا = 1، دو روز =2 ، سه روز= 3، ۷ روز=7، سلول‌های استرومایی القانشده =BM و کنترل مثبت (بافت مغز)= c و b=blank]، اندازه‌ی باندهای, BDNF =405 bp و β2M =318 bp است.

نتایج RT-PCR: همان گونه که در تصویر (۲ C) مشاهده می‌گردد، با استفاده از نرم‌افزار Uvitec بیان ژن BDNF در گروه‌های مختلف به صورت نیمه کمی مقایسه گردید. الگوی بیان ژن BDNF در نمونه‌های القاشده با دپرنیل نسبت به گروه سلول‌های استرومایی القا نشده، بیشتر است. همچنین شدت بیان در نمونه ۲۴ ساعت (۰/۰۲±۰/۷۷)، ۴۸ ساعت (۰/۰۲±۱/۰۳)، ۷۲ساعت (۰/۰۲±۱/۰۷) و ۷ روز (۰/۰۰۳±۰/۸۲) پس از القا، نسبت به گروه‌های BMSCs (۰/۰۱±۰/۳۴) و کنترل (۰/۰۲۴±۰/۶۷) در سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵) بیان ژن افزایش یافته است. اندازه‌گیری میزان دوپامین توسط سلول‌های القا شده با دپرنیل به روش HPLC. با توجه به پاسخ مثبت سلول‌های شبه-عصبی تمایزیافته از BMSCs القا شده توسط دپرنیل به نشان‌گر تیروزین هیدروکسیلاز، به منظور اندازه‌گیری میزان دوپامین از روش HPLC استفاده شد. نتایج کمی میزان دوپامین تولید شده توسط سلول‌های القاشده در جدول شماره‌ی ۱ آمده است که نشان دهنده‌ی تولید دوپامین توسط این سلول‌ها است. تحلیل آماری این نتایج در زمان‌های مختلف نیز انجام شده که در جدول شماره‌ی ۱ آمده است. به لحاظ آماری تولید میانجی عصبی دوپامین، در زمان ۲۴، ۴۸ ساعت و ۷ روز نسبت به کنترل در سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵) افزایش داشته است.

جدول ۱- غلظت دوپامین (اندازه‌گیری شده با HPLC) آزاد شده از سلول‌های شبه‌عصبی تمایزیافته قبل (کنترل) و بعد از القا BMSCs توسط دپرنیل با دوز 10^{-8} مولار (۲۴، ۴۸ ساعت و ۷ روز)

گروه		میانگین غلظت دوپامین (نانوگرم)
تجربی (القا شده)	۲۴ ساعت	۹/۳۹۷۷۳±۰/۰۳۰۹
	۴۸ ساعت	۸/۹۲۲۸۱±۰/۰۲۸۳
	۷ روز	۴/۸۳۳۴۹±۰/۰۳۳۲
کنترل	(BMSCs)	۰/۰۰

بحث

این پژوهش قصد دارد ظرفیت تمایز BMSCs را به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک نشان دهد. در این صورت می‌توان این سلول‌ها را به عنوان کاندید مناسب برای پیوند سلولی در اختلالات عصبی نظیر پارکینسون معرفی نمود. از آنجایی که تحقیق حاضر بر روی سلول‌های استرومایی مغز استخوان انجام

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

شده، لازم است آنها را از نظر مرفولوژی و خلوص، مورد بررسی قرار داد. به طور کلی، BMSCs سلول‌هایی هستند که به ظروف کشت پلاستیکی چسبیده و به سرعت تکثیر می‌شوند. پس از دومین پاساژ مورفولوژی سلول‌ها تغییری نشان نداد و قدرت تکثیر سلول‌ها تا چندین پاساژ حفظ شد. اندازه‌گیری حیات سلول‌ها نشان داد که حدود ۹۵ درصد از سلول‌ها، زنده بودند. مطالعات قبلی، این سلول‌ها را با سه مرفولوژی معرفی می‌کند که بیشتر شکل دوکی آنها قابل توجه است [۱۰]. برای تایید و تعیین میزان خلوص سلول‌های استرومایی کشت شده، از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده گردید. اثبات حضور گلیکوپروتئین فیبرونکتین، نشان داد که ۹۷ درصد سلول‌های کشت داده شده استرومایی بودند. کاربرد این روش برای تایید و تعیین میزان خلوص سلول‌های استرومایی در کارهای فراوان قبلی گزارش شده است. به عنوان مثال در گزارشی، سلول‌های استرومایی را سلول‌های بزرگ، پهن و فیبرونکتین مثبت معرفی کردند. [۱۱]. از طرفی گزارش شده دپرنیل در شرایط برون‌تنی دارای اثرات تروفیک بر روی سلول‌های دوپامینرژیک است و شبیه BDNF عمل می‌کند [۹]. در تحقیقات قبلی به روش RT-PCR نشان داده شد که BMSCs بدون القا، قادر به تولید عوامل نوروتروفیک است [۱۲، ۱۳، ۱۴]. الگوی بیان ژن عامل نوروتروفیک BDNF قبل و بعد از القا، نشان‌دهنده‌ی افزایش بیان پس از القا توسط دپرنیل است. فرض بر این است که محیط کشت و القاکننده‌های عصبی می‌توانند با تغییر بیان ژن‌های BMSCs، آنها را به سمت فنوتیپ سلول‌های عصبی و بیان ژن-های مربوط سوق دهند. تولید سلول‌های عصبی دوپامینرژیک (یا بیان‌کننده‌تیروزین هیدروکسیلاز) در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی از تمایز BMSCs و سایر سلول‌های بنیادی بالغ، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است [۱۴-۲۱]. در سلول‌های دوپامینرژیک حضور آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز برای ساخت میانجی‌های عصبی دوپامین ضروری است [۲۱]. سلول‌های تمایزیافته برای نشان‌گر تیروزین هیدروکسیلاز به روش ایمنوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از تیمار با دپرنیل، بیان این آنزیم در سلول‌های شبه‌عصبی مشاهده شد و در روز هفتم سلول‌های تیروزین هیدروکسیلاز مثبت افزایش قابل توجهی داشتند. اخیرا در دو مطالعه گزارش شده است که BMSCs انسانی به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز می‌یابد. در یکی از این مطالعات ژن Notch به BMSCs منتقل شد که در نتیجه ۴۰ درصد به سلول‌های عصبی بالغ با فعالیت الکتروفیزیولوژیکال و فنوتیپ دوپامینرژیک تمایز یافتند. پس از پیوند این سلول‌ها به مدل حیوانی پارکینسون، بهبود رفتاری مشاهده گردید [۱۵]. در مطالعه‌ای دیگر بدون انتقال ژن Notch، فقط از طریق تیمار BMSCs انسانی با عوامل رشد، حدود ۴۰ درصد سلول‌ها، تیروزین هیدروکسیلاز مثبت بودند [۱۹]. در پژوهشی دیگر، با استفاده از روش چندمرحله‌ای، توانستند با استفاده از رتینوئیک اسید، سلول‌هایی با مورفولوژی شبه‌عصبی و بیان‌کننده‌ی تیروزین هیدروکسیلاز تولید نمایند [۲۰]. همچنین با انتقال ژن تیروزین هیدروکسیلاز به BMSCs، از این سلول‌ها برای درمان موش صحرایی مبتلا به پارکینسون استفاده کردند. پس از ۶ هفته، حیوانات برای بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی و HPLC مورد ارزیابی قرار گرفتند. ضمن بهبود رفتاری، نتایج بررسی‌های هیستولوژیک نشان داد که ژن تیروزین هیدروکسیلاز توسط سلول‌های اطراف ناحیه پیوند، بیان شدند. همچنین بررسی HPLC نشان از افزایش معنی‌دار سطح دوپامین در موش‌های صحرایی درمان شده با BMSCs داشت [۲۱]. در پژوهشی دیگر با روش RT-PCR نشان داده شد که BMSCs چندین ژن دوپامینرژیک را بیان می-کنند [۱۴]. بیان ژن‌های مرتبط با تکوین و بقای نورون‌های دوپامینرژیک، این سلول‌ها را کاندید مناسبی برای سلول‌درمانی بیماری پارکینسون معرفی می‌کند. از طرفی با توجه به اثر نوروپروتکتیو دپرنیل بر نورون‌های دوپامینرژیک و افزایش بیان BDNF و آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز، می‌توان داروی دپرنیل را به عنوان القاکننده‌ی عصبی سلول‌های استرومایی معرفی کرد. از دستگاه HPLC می‌توان برای اندازه‌گیری مونوآمین‌ها مثل دوپامین در مقادیر کم و با قدرت جداسازی بالا و دقیق استفاده نمود [۲۲]. نتایج به دست آمده از بررسی سلول‌های با فنوتیپ عصبی به روش HPLC در زمان‌های ۲۴، ۴۸ ساعت و ۷ روز پس از القا، نشان داد که میانجی‌های عصبی دوپامین توسط این سلول‌ها آزاد می‌شود و با گذشت زمان بر مقدار آن افزوده می‌گردد.

نتیجه‌گیری

۱- وجود عامل نوروترفیک BDNF برای تمایز سلول-های استرومایی به سلول‌های دوپامینرژیک لازم به نظر می‌رسد ۲- این سلول‌ها علاوه بر بروز ویژگی‌های ریخت‌شناختی عصبی، می-توانند در محیط کشت القاشده توسط دپرنیل میانجی‌های عصبی دوپامین را آزادکنند ۳- سلول‌های استرومایی با قابلیت تمایز به سلول‌های دوپامینرژیک، به عنوان کاندید مناسب برای درمان بیماری پارکینسون مطرح هستند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

References:

[1] Kan I, Ben-Zur T, BarhumY, Levy YS, Burstein A, Charlow T, et al. Dopaminergic differentiation of human mesenchymal stem cells-Utilization of bioassay for tyrosine hydroxylase expression. ***Neuroscience Lett*** 2007;419(1):28-3.
[2] Brinchmann JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. ***J Neurologi Sci*** 2008;265(1-2):127-30.
[3] Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, Kohmura E. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. ***Brain res*** 2004;1029:114-9.
[4] Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, Lyeth BG. Cell death and long term maintenance of rat bone marrow stromal cells:a comparison of protocols. ***Brain res*** 2003;991(1-2):46-55.
[5] Shintani A, Nakao N, Kakishita K, Itakura T. Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells. ***Brain res*** 2007;1186:48-55.
[6] Suon S, Yang M, Iacovitti L. Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. ***Brain res*** 2006;1106(1):46-51.
[7] Maruyama W, Naoi M. Neuroprotection by deprenyl and related compounds. ***Mech Ageing Dev*** 1999; 111(2-3):189-200.
[8] Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. ***Nature*** 1991;350(6315):230-32.
[9] Kontkanen O, Castren E. Trophic effects of selegiline on cultured dopaminergic neurons. ***Brain res*** 1999; 829(1-2):190–2.
[10] Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2001; 98(14):7841-5.
[11] Tropel P, Nole D, Platet N, Legrand P, Benabid Al and Berger F.Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. ***Experi Cell Res*** 2004;295:395-406.
[12] Yamaguchi S, Kuroda S, Kobayashi H, Shichinohe H, Yano S, Hida K, et al. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells [BMSC]-a preliminary study using microarray analysis. ***Brain res*** 2006;1087(1):15-27.
[13] Chen C J, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, et al .Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. ***Exp Neurol*** 2006; 204(1):443-53.
[14] Kramer BC, Woodbury D, Black IB. Adult rat bone marrow stromal cells express genes associated with dopamine neurons. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2006;343(4):1045-52.
[15] Suon S, Yang M, Iacovitti L. Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. ***Brain Res*** 2006;1106(1):46-51.
[16] Park KW, Eglitis MA, Mouradian MM. Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. ***Neuroscience Res*** 2001;40(4):315-23.
[17] Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M.Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson’s disease. ***Neuroscience Lett*** 2001;316(2):67-70.
[18] Toda H, Takahashi J, Akira M, Konomi K, Nobuo H. Neurons Generated from Adult Rat Hippocampal Stem Cells Form Functional Glutamatergic and GABAergic Synapses in Vitro. ***Exp Neurol*** 2000;165:66-76.
[19] Tao H, Rao R, Ma DD. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. ***Dev Growth Diff*** 2005;47:423-33.
[20] Tatard VM, Ippolito G, Sylma D, Alexander V, Schiller PC .Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. ***Bone*** 2007;40:360-73.
[21] Lu L, Zhao C, Liu Y, Sun X, Duan C, Ji M, et al.Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson’s disease. ***Brain Res Prot*** 2005;15(1):46-51.
[22] Gramsbergen JB, Sandberg M, Annette MD, Brian K, Jens Z .Glutathione depletion in nigrostriatal slice cultures: GABA loss, dopamine resistance and protection by the tetrahydrobiopterin precursor sepiapterin. ***Brain Res*** 2002;935:47-58.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]