Neurogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells by the Non Toxic Factors of Bioactive Substance as an Inducer

Parastoo Barati[1], Marzieh Darvishi[2], Taghi Tiraihi[1*], Taher Doroudi[1]

[1]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran.
[2]Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Article Info:

Received: **12 Jan 2014** ***Accepted:*** **19 Apr 2014**

ABSTRACT

Introduction: Despite major progress in pharmacological and surgical approaches, spinal cord injury remains a complex medical challenge. Cell replacement therapy is one of the new approaches for spinal cord injury treatment. In this study, bioactive substance TNT (a new supplement) was utilized for induction of bone marrow stromal cells (BMSCs) into neural stem cells (NSCs). ***Materials and Methods:*** The BMSCs were extracted and cultured from the femurs and tibias of adult female wistar rats. After 3 or 4 passages, these cells were preinduced into neurospheres by TNT and neural induction supplement. Then neurospheres were induced into NSCs with B27 and TNT. The NSCs were evaluated with nestin, NF68 and SOX2. ***Results:*** The outcomes indicated that BMSCs were immunoreactive to CD106 (95.7±0.76), OCT4 (96.2±1.3) and CD45 (0.4±1.2). The optimal dose and time for application of TNT were 1 M and 6 days, respectively. Differentiated cells were able to express nestin and NF68. ***Conclusion:*** TNT as a non-toxic substance may be a good alternative for cell induction into NSCs for treatment of neurodegenerative disorders.

Key words:

1. Mesenchymal Stromal Cells
2. Cell Transplantation
3. Spinal Cord Injuries
4. Neural Stem Cells

* ***Corresponding Author:*** Taghi Tiraihi

E-mail: *takialtr@modares.ac.ir*

تمایز عصبی سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی توسط فاکتورهای غیرسمی مادهٔ فعال زیستی به عنوان یک القاءکننده

پرستو براتی[۱]، مرضیه درویشی[۲]، تقی طریحی[۱*]، طاهر درودی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
[۲]گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۲ دی ۱۳۹۲
تاریخ پذیرش: ۳۰ فروردین ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: علی‌رغم پیشرفت‌های فراوان در زمینهٔ داروشناسی و تکنیک‌های جراحی، ضایعهٔ نخاعی همچنان به عنوان یک مسئلهٔ پیچیده در علم پزشکی باقی مانده است. سلول درمانی یکی از روش‌های نوین است که برای درمان ضایعات نخاعی به کار می‌رود. در این مطالعه از مادهٔ فعال زیستی TNT (یک مکمل جدید) جهت تبدیل سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های بنیادی عصبی استفاده شد. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های استرومایی مغز استخوان، از استخوان‌های ران و درشت‌نی موش صحرایی ویستار مادهٔ بالغ جدا و کشت داده شدند. این سلول‌ها بعد از ۳ الی ۴ پاساژ سلولی در مرحلهٔ پیش القاء توسط مادهٔ فعال زیستی TNT و مکمل القای نورونی به سلول‌های نوروسفر تبدیل شدند. سپس در مرحلهٔ القاء سلول‌های نوروسفر با استفاده از B27 و TNT به سلول‌های بنیادی عصبی تمایز یافتند. سلول‌های بنیادی عصبی با نشانگرهای نستین، نوروفیلامنت ۶۸ و SOX2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. **یافته‌ها:** سلول‌های مشتق از مغز استخوان نشانگرهای CD106 (۹۵/۷±۰/۷۶)، OCT4 (۹۶/۲±۱/۳) و CD45 (۰/۴±۱/۲) را بیان می‌کنند. بهترین دوز و زمان برای استفاده از TNT به ترتیب در غلظت ۱ مولار و شش روز بود. سلول‌های تمایز یافته نشانگرهای عصبی نستین و نوروفیلامنت ۶۸ را بیان می‌کنند. **نتیجه‌گیری:** TNT یک مادهٔ غیرسمی است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای القای سلولی به سلول‌های بنیادی عصبی در درمان اختلالات تحلیل برندهٔ سیستم عصبی باشد.

کلید واژه‌ها:
۱. سلول‌های مزانشیمی استرومایی
۲. پیوند سلولی
۳. آسیب‌های طناب نخاعی
۴. سلول‌های بنیادی عصبی

* **نویسنده مسئول:** تقی طریحی
آدرس الکترونیکی: takialtr@modares.ac.ir

مقدمه

سلول درمانی یکی از روش‌هایی است که امروزه برای درمان اختلالات و آسیب‌های ناشی از صدمه‌ها و بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی[1] به کار گرفته شده است. سلول‌هایی که جهت درمان ضایعات عصبی به کار برده می‌شوند؛ باید به سهولت قابل دسترس باشند، توانایی زنده ماندن در شرایط In vivo را داشته باشند و علاوه بر آن واکنش ایمنی در فرد ایجاد نکنند (۲، ۱). براین‌اساس سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BMSCs)[2] دارای کلیهٔ خصوصیات فوق می‌باشند. این سلول‌ها چندتوان[3] هستند و به راحتی از مغز استخوان به دست می‌آیند. وقتی که در محیط آزمایشگاهی کشت داده می‌شوند، می‌توانند به سرعت تکثیر شوند و کلنی‌های سلولی را ایجاد کنند، همچنین نتایج تحقیقات متعدد حاکی از قدرت بالای تمایز در آن‌ها است (۴، ۳).

علاوه بر آن مشاهدات نشان می‌دهد که BMSCs در موش صحرایی و انسان ظرفیت تمایز به مشتقات غیر مزانشیمی، به خصوص سلول‌های عصبی و نوروگلیاها را دارند (۶، ۵). بررسی‌ها نشان داده که هر چه تعداد سلول‌های تزریقی بیشتر و توانایی عملکرد بالاتری داشته باشند احتمال بهبود اختلالات حسی و حرکتی ناشی از آسیب افزایش می‌یابد. فاکتورهای القایی همچون بتامرکاپتواتانول[4]، DMSO[5]، BHA[6]، IBMX[7] و dbcAMP[8] ترکیباتی هستند که با وجود القای سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های شبه عصبی، به علت سمی بودن باعث کاهش درصد سلول‌های باقی ماندهٔ تمایز یافته می‌گردند (۴، ۷).

از این رو در مطالعهٔ حاضر به دنبال استفاده از روش‌های غیرسمی جهت تولید سلول‌های عصبی برآمدیم تا میزان درصد سلول‌های عصبی تولید شده را طی تمایز افزایش دهیم. لذا به منظور حصول فن‌آوری تولید و کشت سلول‌های عصبی، سلول‌های BMSCs به دست آمده از نمونه‌های موش صحرایی، طی دو مرحلهٔ پیش القاء و القاء، تحت تأثیر تمایز سلولی قرار گرفتند. برای ارتقاء تولید سلول‌های شبه عصبی در مطالعهٔ حاضر از مادهٔ فعال زیستی TNT[9] به عنوان عامل تحریکی استفاده شد و در عین حال میزان تولید و بقاء سلول‌های شبه عصبی به دنبال تولید نوروسفر با استفاده از مادهٔ مذکور، مورد مطالعه قرار گرفت (۸).

مواد و روش‌ها

ابتدا موش‌های صحرایی بالغ ماده با وزن حدود ۲۳۰-۲۰۰ گرم به صورت تصادفی انتخاب و به وسیلهٔ ترکیبی از کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند. سپس از مغز استخوان‌های ران[10] و درشت‌نی[11] آن‌ها به روش اتولوگ و با کمک سرنگ حاوی ۶ میلی‌لیتر از محیط‌کشت DMEM (شرکت Gibco) و سرم جنین گاوی (FBS)[12] ۱۰ درصد (شرکت Gibco) آسپیره و به درون یک فلاسک ۲۵ سی سی تخلیه و در شرایط مرطوب برای مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند و پس از ۲ روز این محیط تعویض گردید. هنگام تعویض محیط سلول‌ها توسط PBS[13] استریل شسته شدند. سپس سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به کمک روش آنزیمی، یعنی افزودن یک سی سی از محلول Trypsin/EDTA ۰/۰۵ درصد، از کف فلاسک جدا و پاساژ داده شد و این کار حداقل برای ۴ پاساژ و هر بار بر اساس پر شدن کف فلاسک ادامه یافت.

تأیید سلول‌های BMSCs با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی

برای بررسی نشانگرهای اختصاصی، سلول‌های BMSCs بعد از پاساژ چهارم به پلیت‌های ۶ خانه منتقل شدند. در مرحلهٔ بعد سلول‌ها توسط پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند. به منظور رنگ‌آمیزی عناصر سیتوپلاسمی، غشای سلول‌ها توسط تریتون ۰/۳ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر شدند. سپس برای مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه (جدول ۱) قرار داده شدند. در ادامه به مدت ۲ ساعت در معرض آنتی‌بادی ثانویهٔ متصل[14] به FITC با غلظت (۱/۵۰۰) قرار گرفتند. تشخیص افتراقی هستهٔ سلول‌ها با DAPI (شرکت سیگما، Cat: ۹۵۴۲) به مدت ۱ دقیقه (غلظت ۰/۱ مولار: ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انجام شد.

تعیین غلظت مادهٔ TNT در مرحلهٔ تولید نوروسفر (پیش از القاء)

در این مرحله سلول‌ها بعد از پاساژ چهارم تحت تأثیر محیط القائی عصبی به نوروسفر تبدیل شدند. برای این منظور در پاساژ چهارم سلول‌ها تریپسینه شدند و بعد از تعیین درصد سلول‌های زنده توسط رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد، به پلیت‌های ۶ خانه منتقل شدند (۵۰۰ هزار سلول در هر خانه) و توسط محیط DMEM با ترکیبی از TNT کشت داده شدند.

برای این منظور سلول‌های BMSCs تولید شده بدین صورت گروه‌بندی شدند: سلول‌هایی به عنوان گروه کنترل تحت القای سه مادهٔ B27 (۱۰٪)، bFGF[15] (۲٪) و EGF[16] (۰/۵٪)-(شرکت Gibco) کشت داده شدند و همچنین سلول‌هایی با غلظت‌های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۲۵ مولار TNT، bFGF (۲٪) و EGF (۰/۵٪) در چهار گروه و به مدت ۳ و ۶ روز انکوبه شدند. قطر و تعداد نوروسفرها شمارش شد و بهترین زمان و غلظت مادهٔ TNT تعیین گردید. بعد از ۶ روز به منظور بررسی و تأیید نوروسفرها از لحاظ ایمونوسیتوشیمی گروهی از آن‌ها به پلیت‌های ۱۲ خانه انتقال داده شدند. قطر و تعداد نوروسفرها با استفاده از نرم افزار

[1] Central Nervous System (CNS)
[2] Bone Marrow Stromal Cells
[3] Multipotent
[4] β-Mercaptoethanol (BME)
[5] Dimethylsulfoxide (DMSO)
[6] Butylated Hydroxyanisole (BHA)
[7] Isobutylmethylxanthine (IBMX)
[8] Dibutyryl Cyclic AMP (dbCAMP)
[9] Bioactive substance TNT (a new supplement, code: 110112)
[10] Femur bone
[11] Tibia bone
[12] Fetal bovine serum
[13] Phosphate Buffer Saline
[14] Conjugate
[15] Basic fibroblast growth factor
[16] Epidermal growth factor

ImageJ شمارش و بهترین زمان و غلظت مادهٔ TNT (غلظت ۱ مولار و ۶ روز بعد از القاء) تعیین گردید.

تبدیل سلول نوروسفر به سلول بنیادی عصبی

۶ روز بعد از تشکیل نوروسفر، اسفرهای معلق ایجاد شده در محیط کف پلیت جدا شدند و به پلیت‌های ۶ خانه، پوشیده با پلی ال لایزین منتقل شدند. در این مرحله بهترین غلظت و زمان القاء با استفاده از ارزیابی درصد سلول‌های زنده با روش Viability Test و توسط رنگ حیاتی تریپان بلو ارزیابی شد. جهت تأیید نوروسفرها از نشانگرهای سلول‌های بنیادی و همچنین نشانگرهای مربوط به سلول‌های بنیادی عصبی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- لیست آنتی بادی‌ها

	غلظت	نام شرکت	آنتی بادی
Primary antibody	۱/۲۰۰	Millipore	Mouse anti-NF-68 monoclonal antibody
Primary antibody	۱/۲۰۰	Millipore	Mouse anti-CD45 polyclonal antibody
Primary antibody	۱/۲۰۰	Millipore	Mouse anti-Nestin polyclonal antibody
Secondary antibody	۱/۵۰۰	Millipore	Anti-mouse FITC-conjugated

بررسی تعداد نسل‌های القاء شده در نوروسفرهای مشتق از BMSCs

در این مرحله به منظور بررسی میزان پرتوانی[17] سلول‌های عصبی تولید شده، تغییر نسل‌های سلول‌های بنیادی عصبی ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. اسفرهای تولید شده در چند مرحله، از اسفر به سلول بنیادی عصبی تبدیل شدند و از نظر ریخت‌شناسی[18] سلول و بیان نشانگرهای سلول‌های پرتوان مورد بررسی قرار گرفتند.

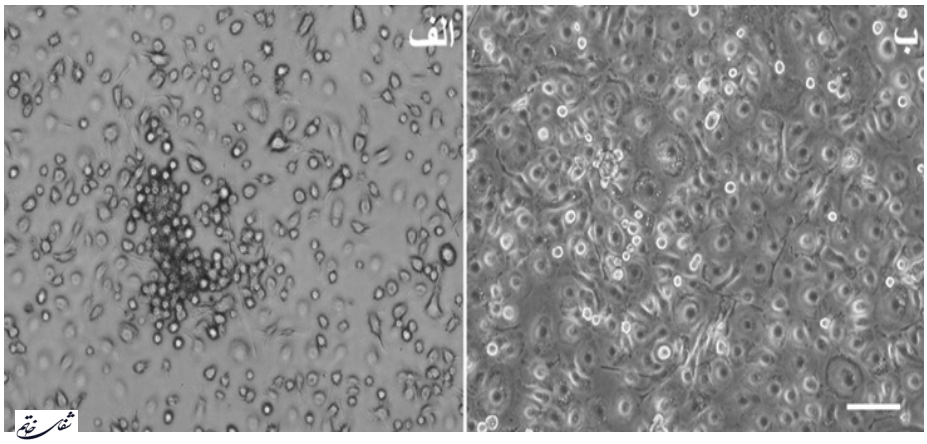
یافته‌ها

نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول‌های BMSCs

برای جداسازی و کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان، از استخوان‌های ران و درشت‌نی موش صحرایی بالغ استفاده شد. پس از انتقال تودهٔ بافت مغز استخوان به داخل ظرف کشت، سلول‌های خونی نمایان‌تر و با گذشت ۶ الی ۱۲ ساعت، این سلول‌های خونی در سطح محیط کشت شناور شده (تصویر ۱) و با تعویض محیط از ظرف کشت خارج شدند. این سلول‌های گرد قابل مشاهده به کف ظرف چسبیده و با حذف سلول‌های خونی، سلول‌های باقی‌مانده در کف ظرف، همان سلول‌های استرومایی هستند (تصویر ۱) که با گذشت زمان تکثیر شدند.

سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌هایی هستند که به ظروف کشت چسبیده و به سرعت تکثیر می‌شوند. این سلول‌ها در شرایط مطلوب تا ۲۰ پاساژ تکثیر داده شده و ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها تغییری نمی‌یابد. سلول‌ها از نظر ریخت‌شناسی از پاساژ چهارم، ظاهری به نسبت یکدست و یکنواخت داشتند. در شرایطی که سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیش از ۷۰ درصد ظرف کشت را پر کرده، سلول‌های دوکی شبه فیبروبلاستی و برخی از سلول‌ها به صورت پهن و چسبنده‌تر و از نظر اندازه، بزرگتر از سایر سلول‌ها در محیط کشت دیده شدند.

این سلول‌ها در تست ایمونوسیتوشیمی نشانگرهای اختصاصی BMSCs (CD106) را ۹۵/۷±۰/۷۶، نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی (OCT4) را ۹۶/۲±۱/۳ و نشانگر فیبرونکتین را بیان می‌کنند و علاوه بر آن نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک (CD45) را ۰/۴±۱/۲ بیان می‌کنند (نمودار ۱). شمارش سلولی توسط نرم افزار ImageJ انجام شد و همهٔ نتایج به‌صورت Mean±SEM گزارش شده‌است.



تصویر ۱- عکس فازکنتراست از مراحل کشت سلول‌های BMSCs. الف) اتصال سلول‌ها به ظروف‌کشت (۱۲ ساعت بعد از شروع کشت) ب) آمادگی سلول‌ها برای پاساژ سلولی اول (۷۲ ساعت بعد از شروع کشت). مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر.

[17] Pluripotency
[18] Morphology

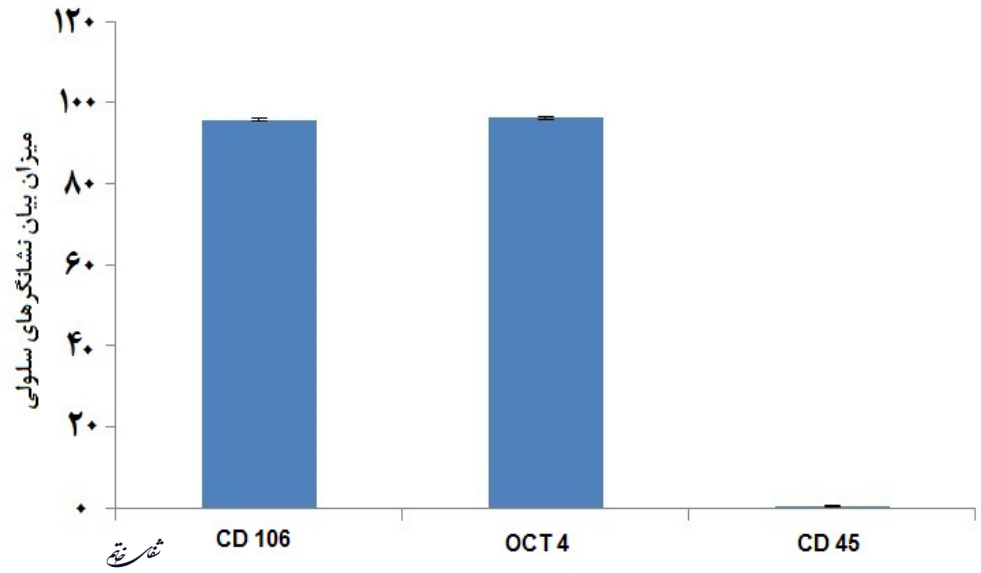
نتایج به دست آمده از تمایز سلول‌های BMSCs به نوروسفر تحت تأثیر القای TNT

نتایج نشان داد که سلول‌های BMSCs بعد از قرارگرفتن در محیط کشت القائی عصبی حاوی مادهٔ TNT توانایی تشکیل نوروسفر را دارند. سلول‌های BMSCs که غلظت یک مولار مادهٔ TNT را دریافت کرده‌اند ۶ روز بعد از القاء نسبت به سایر غلظت‌های استفاده شده با سرعت بیشتری در کنار هم جمع می‌شوند، به عبارت دیگر قطر و تعداد نوروسفرها در این گروه، نسبت به سایر گروه‌ها رشد چشمگیری داشته است (نمودار ۲ و ۳).

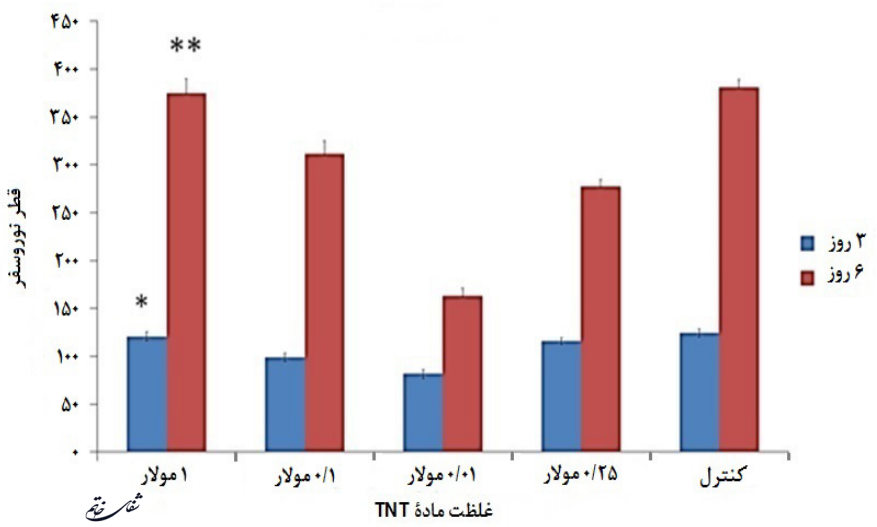
اسفرهای ایجاد شده در روز اول قطری حدود ۱۰۰ میکرومتر دارند و از قرارگیری تعداد کمی از سلول‌ها تشکیل شده‌اند. از روز اول تا روز سوم تعداد اسفرها افزایش می‌یابد و از روز سوم تا هفتم از تعداد آن‌ها کاسته شده و به قطر آن‌ها افزوده می‌شود به طوری که در روز هفتم به قطری در حدود ۵۰۰ میکرومتر می‌رسند. در مطالعهٔ انجام شده نوروسفرها توانایی انتقال تا ۷۰ نسل را نشان دادند (تصویر ۲). بررسی ایمونوسیتوشیمی این سلول‌ها نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی توانایی بیان نشانگرهای بنیادی (OCT4 و SOX2) و عصبی (نوروفیلامنت ۶۸ و نستین) را دارند. علاوه بر آن این نشانگرها بعد از ۷۰ نسل نیز توانایی بیان نشانگرهای سلول بنیادی را دارا می‌باشند (تصویر ۳).

نتایج به دست آمده از تبدیل سلول‌های نوروسفر به سلول شبه عصبی تحت تأثیر القای TNT

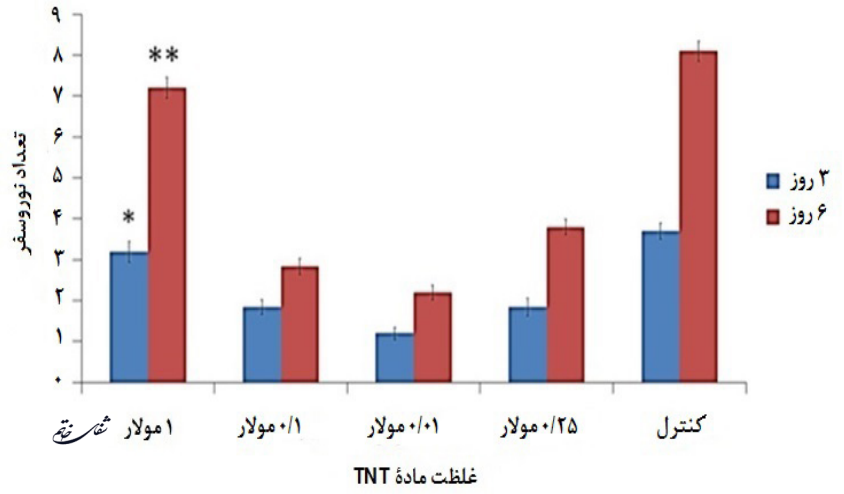
همچنین مشاهدات در این مطالعه نشان داد که نوروسفرها بعد از انتقال به پلیت‌های پوشیده با پلی ال لایزین بعد از ۷ روز، به کف پلیت چسبیده و به صورت سلول‌هایی کشیده و دوقطبی دیده می‌شوند که سلول‌های بنیادی عصبی هستند (تصویر ۴).



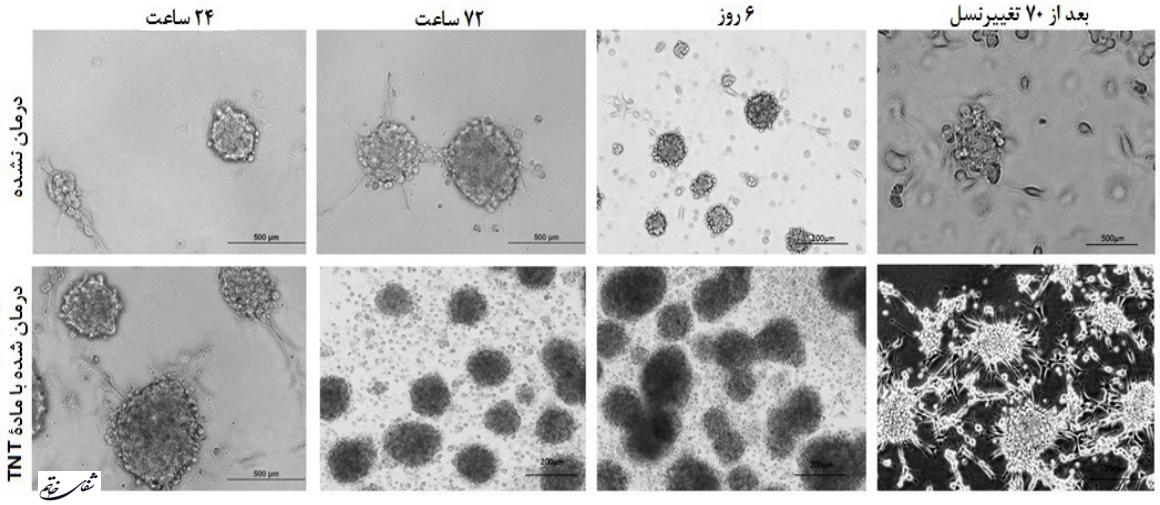
نمودار ۱- نتایج ایمونوسیتوشیمی میزان بیان نشانگرهای سطح سلولی را در سلول‌های BMSCs بعد از پاساژ سلولی چهارم نشان می‌دهد که به صورت Mean±SEM گزارش شده است. همان‌طور که نشان داده شده است، کمترین میزان بیان مربوط به نشانگرهای خونی می‌باشد. شمارش سلولی توسط نرم افزار ImageJ انجام شد.



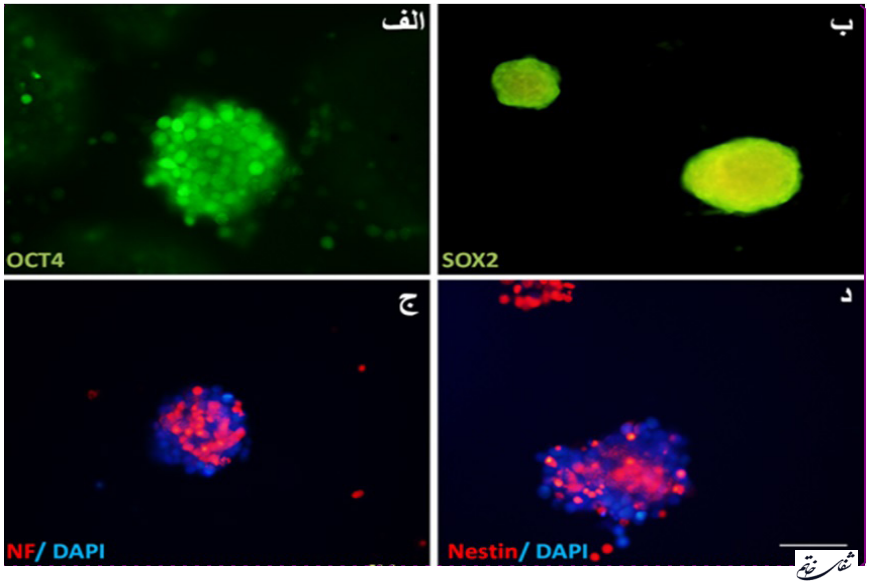
نمودار ۲- مقایسهٔ اندازهٔ قطر نوروسفر برحسب میکرومتر در دوزهای مختلف داروی TNT که به صورت Mean±SEM گزارش شده است. علامت * بیشترین اندازهٔ نوروسفر را در روز سوم القاء نشان می‌دهد و علامت ** نشان‌دهندهٔ بیشترین قطر نوروسفر در روز ۶ بعد از القاء می‌باشد. آزمون آماری One Way Anova بوده و سطح معنی‌داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.



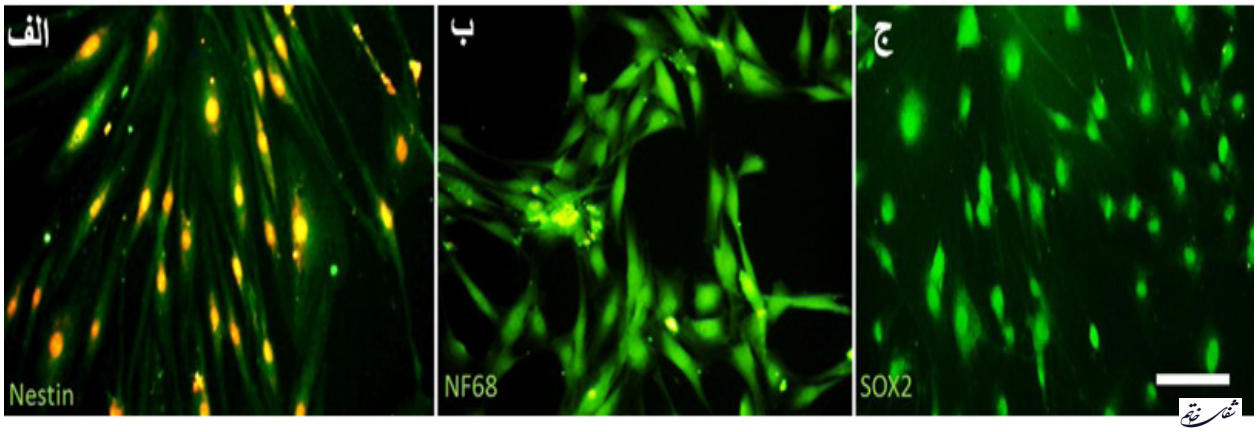
نمودار ۳- مقایسهٔ تعداد نوروسفر در دوزهای مختلف داروی TNT که به صورت Mean±SEM گزارش شده است. علامت * بیشترین تعداد نوروسفر را در روز سوم القاء نشان می‌دهد و علامت ** نشان‌دهندهٔ بیشترین تعداد نوروسفر در روز ۶ بعد از القاء می‌باشد. آزمون آماری One Way Anova بوده و سطح معنی‌داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.



تصویر ۲- سلول‌های BMSCs، تحت تأثیر محیط‌کشت عصبی ساخته شده، در کنار هم تجمع یافته و ساختارهای کروی شکلی به نام نوروسفر در محیط‌کشت تشکیل می‌دهند. این ساختارها بعد از یک روز در محیط‌کشت قابل شناسایی هستند. در روز اول، نوروسفرها دارای قطر و تعداد کمتری هستند و در روز ۶ تعداد آن‌ها و همچنین قطر آن‌ها افزایش می‌یابد.



تصویر ۳- بیان نشانگرهای OCT4 و SOX2 (نشانگرهای سلول‌های بنیادی) و نوروفیلامنت ۶۸ و نستین (نشانگرهای عصبی)، در سلول‌های نوروسفر مشتق از BMSCs مثبت ارزیابی شد. مقیاس: ۵۰ میکرومتر.



تصویر ۴- بیان نشانگرهای الف) نستین ب) نوروفیلامنت ۶۸ ج) SOX2، در سلول‌های شبه عصبی مشتق از نوروسفر مثبت ارزیابی شد. مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون از سلول‌های زیادی در زمینهٔ درمان اختلالات سیستم عصبی مرکزی استفاده گردیده که از جملهٔ آن‌ها می‌توان به استفاده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و سلول‌های بنیادی عصبی اشاره کرد که از انواع سلول‌های بنیادی بالغ هستند (۹، ۱۰).

از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که سلول‌های استرومایی مغز استخوان می‌توانند طیف وسیعی از سلول‌ها را ایجاد کنند. مطالعات متعددی به منظور تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های عصبی در محیط کشت، صورت گرفته است (۱۱، ۱۲).

زیرمجموعه‌ای از سلول‌های مغز استخوان در انسان و جوندگان دارای ظرفیت تمایز به سلول‌های عصبی بوده و به خصوص نشانگرهای مربوط به مراحل اولیهٔ تکامل نورون را بیان می‌نمایند (۱۳). همچنین جهت بررسی اثرات فاکتورهای آزاد شده توسط بافت‌های عصبی در حال تکامل و نیز واکنش‌های متقابل بین سلولی، سلول‌های استرومایی مغز استخوان را با سلول‌های مزنسفالیک جنین موش و یا سلول‌های گلیالی مغز نوزاد موش صحرایی کشت دادند که در پی آن افزایش بیان NeuN و GFAP را مشاهده نمودند (۱۴).

محققان دیگری از بتامرکاپتواتانول به عنوان عامل القاءکننده استفاده نمودند ولیکن این عامل تنها موجب تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به نورون گردید. عوامل دیگری که به طور مؤثر موجب تغییر فنوتیپ سلول‌های استرومایی مغز استخوان به فنوتیپ سلول عصبی گردیده شامل DMSO و BHA می‌باشند (۱۵). عوامل افزایش‌دهندهٔ میزان cAMP درون سلولی نیز موجب تمایز سلول‌های BMSCs و تغییر ریخت‌شناسی آن‌ها به ریخت‌شناسی سلول عصبی می‌گردد (۱۶).

تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینهٔ تولید نوروسفر از سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان انجام شده است (۱۷). عباس‌زاده و دارابی در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که BMSCs تحت تأثیر فاکتورهای EGF، bFGF و B27 به نوروسفر و سپس سلول بنیادی عصبی تمایز می‌یابند (۱۸، ۱۹). همچنین اثر این فاکتورها روی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیز تأیید گردید. این فاکتورها از عوامل میتوژنیک هستند و از طرفی فاکتور B27 علاوه بر خاصیت تمایزی، سمی نیز می‌باشد (۲۰).

فاکتورهایی که تاکنون برای تولید و تمایز سلول‌های شبه عصبی استفاده می‌شود، به‌عنوان عوامل سمی شناخته شده‌اند. از این رو مطالعات به سمتی پیش می‌رود که فاکتورهای مؤثرتر و غیرسمی را جایگزین فاکتورهای مذکور کنند. مطالعهٔ حاضر نشان داد که مادهٔ TNT توانایی تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان را به سلول‌های شبه عصبی دارد (۲۱، ۲۲).

در این مطالعه سلول‌های BMSCs بعد از کشت و به دست آمدن بافت یکنواخت سلولی به ساختارهای اسفری تبدیل شدند و برای این منظور از غلظت‌های مختلف مادهٔ TNT استفاده شد. در بین غلظت‌های به کار برده شده، غلظت یک مولار، تعداد نوروسفرهای بیشتر و در عین حال بزرگتری را در اختیار قرار داد. نوروسفرها با کاهش مولاریتهٔ مادهٔ TNT از تعدادشان کاسته شده و علاوه بر آن زمان طولانی‌تری برای تشکیل احتیاج داشتند. سلول‌های BMSCs بعد از مجاورت با مادهٔ TNT ابتدا به صورت گرد و شناور دیده شدند که این امر می‌تواند نشان‌دهندهٔ سرعت بالای تقسیم آن‌ها باشد. علاوه بر این، این سلول‌ها نشانگرهای سلول‌های بنیادی و عصبی را بیان کردند که این می‌تواند نشان‌دهندهٔ توانایی مادهٔ TNT برای القای عصبی باشد. همچنین بررسی نشان داد که این سلول‌ها نشانگرهای پیش‌ساز عصبی شامل نستین و SOX2 را نسبت به سایر نشانگرهای عصبی بیشتر بیان می‌کنند.

علاوه بر آن بررسی نشان داد که تا حدود ۷۰ نسل تولید نوروسفرها امکان‌پذیر می‌باشد که این امر تأیید کنندهٔ این مسئله است که مادهٔ TNT علاوه بر قدرت القای سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های نوروسفر و در نهایت سلول بنیادی عصبی، پرتوانی سلول را در این سلول‌ها حفظ می‌کند. این مطالعه نشان داد که می‌توان با استفاده از مادهٔ TNT سلول‌های BMSCs را به سلول‌های نوروسفر و سپس به سلول‌های بنیادی عصبی با توانایی بالای بیان نشانگرهای چندتوانی تبدیل کرد که می‌تواند برای درمان بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی[19] مهم و کاربردی باشد.

[19] Neurodegenerative

منابع

1. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplanrtation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. Neuropathology. 2003; 23: 169-80.

2. Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. Neuroreport. 2004; 15: 105-8.

3. Kaka GR, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Kazemi H. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. Int J Neurosci. 2012; 122(5): 237-47.

4. Ankeny DP, Mctigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidence for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp Neurol. 2004; 190(1): 17-31.

5. García R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuétara K, Pavón N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 316(3): 753-4.

6. Karami M, Bathaie SZ, Tiraihi T, Habibi M, Arabkheradmand J, Faghihihzadeh S. Crocin improved locomotor function and mechanical behavior in the rat model of contused spinal cord injury through decreasing calcitonin gene related peptide (CGRP). Phytomedicine. 2013; 21(1): 62-7.

7. Mezey E. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 1364-69.

8. Mohammad-Gharibani P, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Taheri T. Improvement of contusive spinal cord injury in rats by co-transplantation of gamma-aminobutyric acid-ergic cells and bone marrow stromal cells. Cytotherapy. 2013; 15(9): 1073-85.

9. Inoue M, Honmou O, Oka S, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. Glia. 2003; 44: 111-8.

10. Aligholi H, Hassanzadeh G, Azari H, Rezayat SM, Mehr SE, Akbari M, et al. A new and safe method for stereotactically harvesting neural stem/progenitor cells from the adult rat subventricular zone. J Neurosci Methods. 2014; 225: 81-9.

11. Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, Kohmura E. Morphogenic differentiation of bone marrow stromal cells co-culture with hypocampal slice. Brain Res. 2004; 1029(1): 114-9.

12. Cazalets JR, Bertrand S, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F. GABAergic control of spinal locomotor networks in the neonatal rat. Ann N Y Acad Sci. 1998; 860: 168-80.

13. Hung SC, Cheng H, Pan CY, Tsai MJ, Kao LS, Ma HL. In vitro differentiation of size-sieved stem cells in vitro electrical active neural cells. Stem Cells. 2002; 20: 522-9.

14. Jin K, Mao XO, Batteur S, Sun Y, Greenberg DA. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differentiation of growth factors and pattern of intracellular expansion. Exp Neurol. 2003; 184(1): 78-89.

15. Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the Adipose Tissue-Derived Stem Cells into Neuron-Like Cells Expressing Neurotrophins by Selegiline. Iran Biomed J. 2011; 15(4): 113-21.

16. Abdanipour A, Tiraihi T, Taheri T, Kazemi A. Microglial activation in rat experimental spinal cord injury model. Iran Biomed J. 2013; 17(4): 214-20.

17. Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, Delshad A, Taheri T. Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2013; 49(8): 638-52.

18. Abbaszadeh H, Tiraihi T, Delshad A. Bone marrow stromal cell transdifferentiation into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as a inducer with expression of platelet-derived growth factor α as a maturity marker. Iran Biomed J. 2013; 17(2): 62-70.

19. Gharibani P, Tiraihi T, Arabkheradmand J, Kazemi H. Induction of bone marrow stromal cells into GABAergic neuronal phenotype using creatine as inducer. Restor Neurol Neurosci. 2012; 30(6): 511-25.

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

21. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stromal cells

exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficiet after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol. 2002; 174(1): 11-20.

22. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. Lancet. 2004; 363(9419): 1432-7.