Original Article

Effect of Different Doses of Staurosporine for Neuronal Differentiation of PC-12 Cell Line

Sadri S., M.Sc., Davari zanjani M., M.Sc., Azadbakht M., Ph.D.*, Amini A., Ph.D., Amiri E., Ph.D.

** P.O.BOX: 67149-67346, Biology Department, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran*

Abstract

Purpose: The present study was designed to investigate the effect of different doses of Staurosporine on differentiation of PC-12 cell line into differentiated neuronal cells.

Materials and Methods: PC-12 cell line as a useful model system for neurobiological studies was maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Staurosporine were added to culture medium in different concentrations (110, 214, 316 and 1000 nM), then morphology and apoptotic index were assessed by total neurite length estimation and TUNEL staining.

Results: Data showed that total neurite length of PC-12 cells that were treated with 110, 214, 316 and 1000 nM was 44±9.3, 153±15.0, 104±10.4 and 31±9.6μm respectively. Therefore PC-12 cells that were treated with 214 nM Staurosporine had the greatest neurite length in compression with the other concentrations ($P<0.05$). In addition apoptotic index in these concentrations was 3±0.7,4±0.8,8±1.0 and 10±1.1 respectively, Therefore PC-12 cells that were treated with 110 and 214 nM Staurosporine had minimal apoptotic index ($P<0.05$).

Conclusion: Finally it can be concluded that 214 nM concentration of Staurosporine is an optimum concentration for differentiation of neuronal cell lines to differentiated neuronal cells.

Key words: Neuronal Differentiation, Staurosporine, Apoptosis, PC-12

مقاله تحقیقی

اثر غلظتهای مختلف استئورسپورین در تمایز عصبی سلولهای رده PC-12

سهیل صدری .M.Sc*، مریم داوری زنجانی .M.Sc*، ✍ مهری آزادبخت .Ph.D*،
علی امینی.Ph.D*، ایرج امیری .Ph.D**
* گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه
** گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
تاریخ وصول: تیرماه ۸۶، تاریخ پذیرش: شهریورماه ۸۶

چکیده

هدف: به دست آوردن غلظت مناسب استئورسپورین برای القای تمایز عصبی در سلولهای رده PC-12
مواد و روشها: در این بررسی رده سلولی PC-12 رشد یافته در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) همراه با۱۰ درصد سرم ، تحت تیمار با غلظتهای ۱۱۰، ۲۱٤، ۳۱٦ و ۱۰۰۰ نانومولار استئورسپورین قرار گرفت. سلولهای تیمار شده با غلظتهای مختلف استئورسپورین از نظر مورفولوژی، با اندازه گیری میزان طول نوریتهای هر سلول تمایز یافته وهمچنین از نظر القای آپوپتوز با روش رنگ آمیزی TUNEL (Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) و مقایسهٔ شاخص آپوپتوز ارزیابی شدند.
یافته‌ها: طول نوریتها در سلولهای تیمار یافته با غلظتهای ۱۱۰، ۲۱٤، ۳۱٦ و ۱۰۰۰ نانومولار به ترتیب۹/۳±٤٤، ۱۵/۰±۱۵۳، ۱۰/٤±۱۰٤و ۹/٦±۳۱ میکرو متر بود که در این بین سلولهای تیمار یافته با غلظت ۲۱٤ نانومولار در مقایسه با سایر غلظت‌ها به طرز معنی داری دارای بلندترین نوریتها بودند ($p<0.05$) همچنین شاخص آپوپتوز در این سلولها به ترتیب ۰/۷±۳، ۰/۸±٤، ۱/۰±۸ و ۱/۱±۱۰ بود که در بین آنها میزان القای آپوپتوز در سلولهای تیمارشده با غلظتهای ۱۱۰ و ۲۱٤ نانومولار به طرز معنی‌داری در مقایسه با غلظتهای ۳۱٦ و ۱۰۰۰ نانومولار کمتر بود ($p<0.05$).
نتیجه‌گیری: غلظت ۲۱٤ نانومولار استئورسپورین می‌تواند با ایجاد بلندترین نوریتها و القای کمترین میزان آپوپتوز در سلولهای ردهٔ PC-12، این سلولها را به سمت نورونهای بالغ متمایز کند؛ بنابراین می‌تواند به عنوان غلظت تمایزدهندهٔ مناسب این ماده استفاده شود.

کلید واژه‌ها: تمایز عصبی، استئورسپورین، آپوپتوز ، PC-12

مقدمه

طی تکوین سیستم عصبی در پستانداران انواع مختلف سلول عصبی ایجاد می‌شود که مسیرهای تکوین طبیعی اغلب این گروههای سلولی هنوز کاملاً مشخص نیست. مطالعه تکوین سلولهای عصبی در محیط آزمایشگاه علاوه برافزایش درک ما از مکانیسمهای تکوین، ابزار سودمندی را در شناخت روند بیماریهای نورودژنراتیو فراهم می‌سازد.

امروزه رده‌های سلولی به طور گسترده‌ای در مطالعات پاتوفیزیولوژی بیماریهای مختلف از جمله بیماریهای دستگاه عصبی استفاده می‌شوند اما استفاده از آنها به علت تقسیم پذیری و نداشتن خصوصیات یک سلول عصبی بالغ با مشکلاتی همراه است [۱]. در این بین رده سلولی PC-12 به

✍ آدرس مکاتبه: کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم،گروه زیست شناسی، صندوق پستی٦٧٣٤٦-٦٧١٤٩
E-mail: azadbakhtm@razi.ac.ir

دلیل داشتن پتانسیل تمایزی به نورون بالغ بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [۲]. این رده سلولی در پاسخ به اثر طولانی مدت NGF[1] از تقسیم می‌ایستد و با ایجاد زواید نوریتی بلند به سمت تشکیل یک نورون بالغ تمایز می‌یابد [۳ و٤]. NGF بامتوقف کردن چرخه سلولی در فاز G1 از طریق افزایش غلظت داخل سلولی پروتئین‌هایی مانندp53 وp21/WAF1 [۵ و ٦] و سپس ایجاد زواید نوریتی و پایدار کردن میکروتوبولها در امتداد این زواید [۹-۷] توسط افزایش بیان ژنهای tau [۸] وMAP ۲، سبب تمایز سلولهای عصبی می‌شود [۱۰ و۱۱].

علاوه بر NGF ماده شیمیایی دیگری به نام استئورسپورین[3] برای تمایز سلولهای عصبی استفاده شده است [۱۲و۱۳]. استئورسپورین یک محصول طبیعی از آلکالوئیدهای خانوادهk252a است که در سال ۱۹۷۷ از باکتری Streptomyces staurosporeus تخلیص شد [۱٤]. این ماده اخیراً به علت اثرمهار کنندگی غیراختصاصی پروتئین کینازها وتمایز رده‌های عصبی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است [۱و۱۵]. استئورسپورین بسته به غلظت به کار برده شده آن دارای عملکردی چندگانه است به عبارت دیگر رفتاری وابسته به غلظت دارد، به طوری که در غلظت ۵ نانو مولار اثر تمایزیNGF را مهار کرده[۱٦] ، غلظتهای ۵۰ تا ۳۵۰ نانو مولارآن سبب تمایز رده‌های سلولی در حال تقسیم به نورونهای بالغ می‌شود [۱۷] و در غلظت ۱۰۰۰ نانو مولار سبب القای آپوپتوز در نورونها می‌شود [۱٦]. درمقایسه با NGF، استئورسپورین بسیار سریعترسبب تمایز سلولهای عصبی وایجاد نوریتهای بلند در آنها می‌شود [۱۷]. استئورسپورین برخلاف NGF اثری بر غلظت پروتئین p53 و فرودستهای آن ندارد بلکه با مهار مستقیم p34cdc2وp33cdk2، که تشکیل کمپلکس سیلکین -CDK راساماندهی می کنند، همانند سازی DNA را مهار کرده وچرخه سلول را از فاز تقسیم خارج وسبب تمایز سلولها می‌شود [٦]. استئورسپورین برای ایجاد زواید نوریتی بر خلاف NGF که در سطح رونویسی بیان ژن tau را افزایش می‌داد، روی خود پروتئین tau اثر گذشته واز طریق مهار MAP2 کینازکه باعث فسفریله کردن پروتئین tau ودر نهایت مختل کردن فعالیت آن در پایداری میکروتوبولها و زواید نورونی می‌شود، فسفریلاسیون این پروتئین را به میزان قابل توجهی کم کرده و به این ترتیب شرایط را برای اتصال مناسب پروتئین tau به میکروتوبولها ودر نهایت ایجاد و پایداری زواید نوریتی فراهم می‌کند [۱۸و۱۹].همین خاصیت استئورسپورین در دفسفریلاسیون پروتئین tau سبب شده که دانشمندان تلاش خود را در استفاده از این ماده به عنوان دارویی در درمان بیماری آلزایمر که در آن فسفریلاسیون بیش از حد پروتئین tau رخ می‌دهد متمرکز کنند [۲۰و۲۱].

با توجه به ویژگیهای رده سلولی PC-12، این سلولها ابزاری سودمندی برای درک بهتر مکانیسمهای مولکولی درفرایند نورن زایی وتشکیل سیسم عصبی در طی روند تکوینی پستانداران به شمار می‌آیند. در این مطالعه از غلظتهای متفاوت استئوروسپورین به عنوان عامل القاگر تمایز سلولهای عصبی استفاده شد تا نقش نورون زایی آن بدون القای آپوپتوز در محیط آزمایشگاه بررسی شود.

مواد و روشها

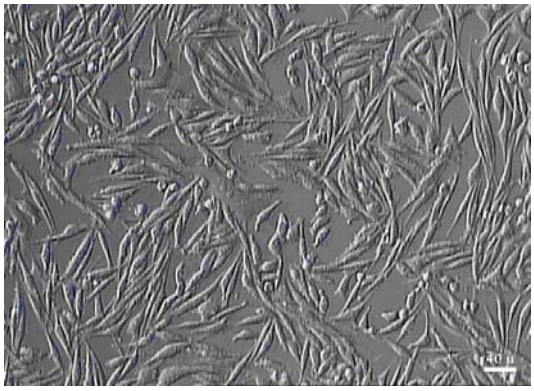
کشت سلولهای رده PC-12

در این مطالعه رده سلولی در حال رشد PC-12 (شکل -۱) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI)[4]

1. Nerve Growth Factor
2 - Microtubule Associated Protein
3 - Staurosporine (SSP)

4 - National Cell Bank of Iran (NCBI)

استفاده شد. برای رشد و تکثیر این سلولها از محیط کشت RPMI 1640 (Gibco,UK) همراه با افزودنیهایی شامل ده درصد FBS(Gibco,UK)[1]، دو میلی مولار L-Glutamine (Sigma,USA) و یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری[2] (Sigma, USA) استفاده شد. سلولها در فلاسکهای کشت ۴۰ میلی لیتری در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد با CO2 به میزان ۵ درصد نگهداری شدند.



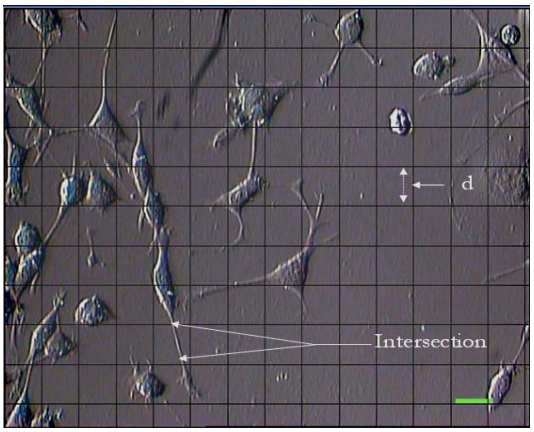
شکل۱. سلولهای در حال تقسیم و تمایز نیافته رده سلولی PC-12. بار: ۴۰ میکرومتر

تمایز سلولهای رده PC-12

بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، برای القای تمایز در سلولهای رده PC-12، این سلولها به مدت ۵ ساعت تحت تیمار غلظتهای مختلف استئورسپورین (Alexis,USA) شامل غلظتهای ۱۱۰، ۲۱۴، ۳۱۶ و ۱۰۰۰ نانومولار قرار گرفتند و پس از این مدت سلولها برای بررسی خصوصیات موروفولوژیک وهمچنین میزان القای آپوپتوز در اثر تیمار استئورسپورین ارزیابی شدند ودر هر ارزیابی، آزمایشها ٤ بار تکرار شد.

ارزیابی مورفولوژیک سلولهای تمایز یافته

برای فراهم نمودن امکان مشاهده مجزا و دقیق تر، سلولهای ردهٔ PC-12 با تراکم ۱۰٤سلول در هر خانهٔ ظرف کشت ۲٤ خانه، کشت شدند وپس از تمایز مورد ارزیابی مورفولوژیکی قرار گرفتند.



شکل ۲. ارزیابی مورفومتریک سلولهای تمایز یافته PC-12 از طریق قرار دادن تصویر سلول در پس زمینه ی دارای خطوط با فاصله های مشخص و شمارش intersection ها. بار : ۲۰ میکرومتر

یکی از بهترین شاخصها برای ارزیابی مورفولوژی نورونها اندازه گیری طول کل نوریتهای آن تحت عنوان (TNL)[3] است. برای این کار روش شمردن Intersectionهامناسب ترین روش است [۲۲]. در این روش که توسط رن (Ronn) معرفی شد از سلولهای عصبی تمایز یافته (نورونها) به صورت نقاط تصادفی در ظرف کشت (هر غلظت٤ خانه و هر خانه۱۰۰ سلول) با میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus IX-71 ,Japan) مجهز به دوربین عکس گرفته و در یک پس زمینه تعریف شده با خطوطی با فاصله‌های مشخص(d) قرار داده شد. تعداد نقاطی که نوریتها خطوط افقی را قطع می‌کنند تحت عنوان Intersection شمرده (شکل۲) و پس از قرار دادن در فرمول زیر، مقدار حاصل به عنوان طول کل نوریتهای یک نورون (TNL) محاسبه شد.

1 - Fetal Bovine Serum
2 - Non- Essential Amino Acid
3 - Total Neurite Lentgh

$$TNL = \frac{\pi.d}{۲} \times I$$

TNL= طول تمام نوریتهای یک نورون

d= فاصله بین دو خط افقی (۲۰میکرومتر)

I= تعداد intersectionها

$\pi = 3.14$

بررسی وقوع آپوپتوز در سلولهای تمایز یافته

برای بررسی میزان آپوپتوتیک بودن غلظتهای مختلف استئورسپورین از رنگ آمیزیTUNEL استفاده شد. این نوع رنگ آمیزی روشی برای مشخص کردن قطعه قطعه شدن منظم DNA در جریان مرگ سلولی از نوع آپوپتوزاست [۲۳]. برای انجام این آزمایش، سلولها با تراکم $۱۰^۳$ سلول در هر خانهٔ ظرف کشت ۹۶ خانه کشت و پس از تمایز با استئورسپورین توسط پارافرمالدهید ٤ درصد تثبیت شدند. نفوذ پذیری غشای سلولها با استفاده از محلول ۰/۲ درصد Triton X-100 (Sigma ,USA) به مدت دو دقیقه روی یخ انجام شد. سپس سلولها به مدت ۱ ساعت دردمای ۳۷ درجه و شرایط تاریکی با محلول ترکیبیTUNEL (Roche,Denmark) انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS[1] برای بهتر دیدن هسته، رنگ آمیزی پروپدیوم یدید[2] (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) انجام شد وسلولها پس از سه بار شستشو با PBSبا میکروسکوپ فلورسنت (Olympus AX-70, Japan) مطالعه شدند. سلولهای با هسته دارای رنگ زرد براق به عنوان سلولهای آپوپتوتیک شمارش شده و در نهایت شاخص آپوپتوز از تقسیم تعداد سلولهای آپوپتوتیک بر تعداد کل سلولها ضر بدر عدد ۱۰۰، برای هر یک از غلظتهای استئورسپورین محاسبه شد .سلولهای PC-12 که در محیط کشت همراه با اتانل ۵ درصد، به عنوان القاگر قوی آپوپتوز، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در این آزمایش از هر خانه ظرف کشت ، ٤۰ زمینه میکروسکوپی (بزرگنمایی x ۱۰۰) به طور تصادفی بررسی شد.

بررسیهای آماری

داده‌های مربوط به طول نوریتها و شاخص آپوپتوز به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین بیان شد و از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) با روش Post Hoc Test(Tukey HSD) برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین غلظتهای مختلف استئورسپورین استفاده شد و تفاوتهای با $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

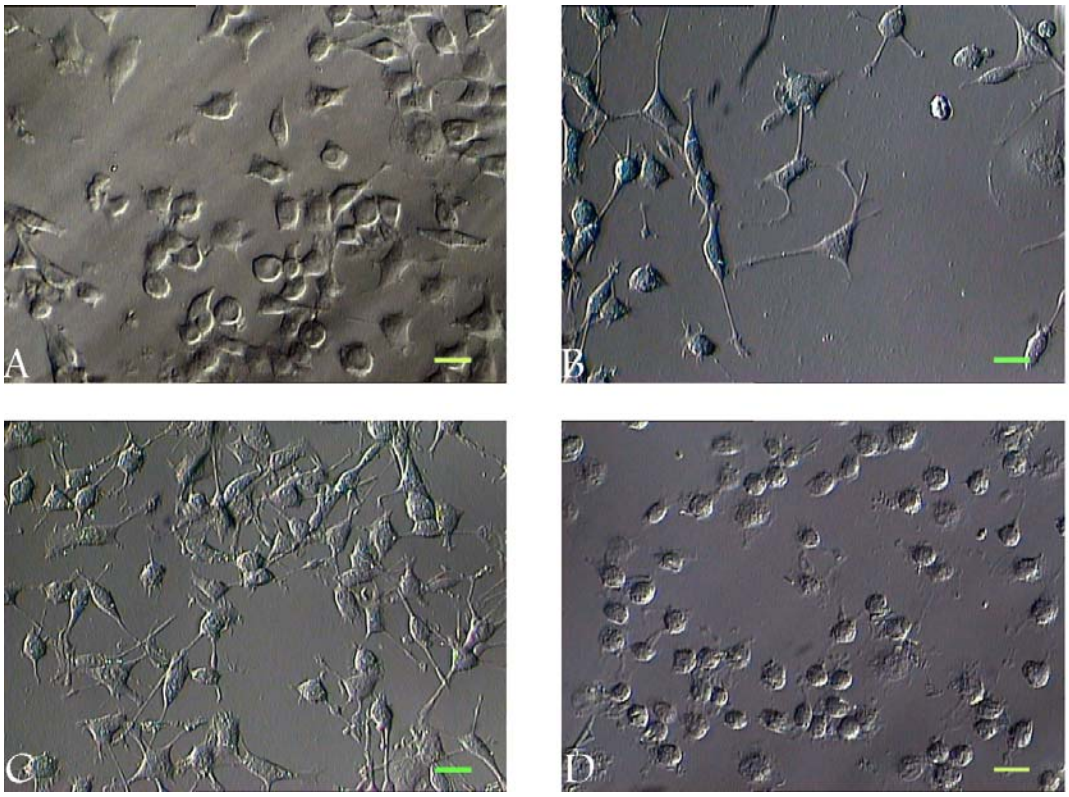
یافته‌ها

به منظور انتخاب مناسب ترین غلظت تمایز دهنده استئورسپورین با توجه به نقش وابسته به غلظت آن در القای تمایز و ایجاد زواید نورونی در سلولهای عصبی ، نتایج حاصل از ارزیابیهای مورفولوژیکی و بررسی شاخص آپوپتوز به طور همزمان مورد توجه قرار گرفت.

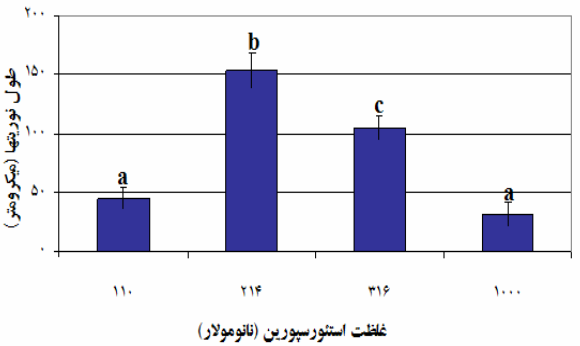
نتایج به دست آمده حاصل از بررسی موفولوژیکی سلولهای تمایز یافته PC-12 نشان داد که میانگین طول نوریتها در سلولهای تیمار یافته با غلظتهای ۱۱۰، ۲۱٤، ۳۱٦ و۱۰۰۰ نانومولار به ترتیب۹/۳±٤٤، ۱۵±۱۵۳، ۱۰/٤±۱۰٤و ۹/٦±۳۱ میکرو متر بود. در این میان تیمار با غلظت ۲۱٤ نانومولار استئورسپورین با اختلافی معنی دار ($p<0.05$) در مقایسه با سایر غلظتها، سبب القای تمایز و ایجاد بلندترین نوریتها در سلولهای رده PC-12 شده بود. پس از غلظت ۲۱٤ نانومولار، تیمار باغلظت ۳۱٦ نانومولار بلندترین نوریتها را ایجاد کرده بود، در حالی که غلظت ۱۱۰ نانومولار استئورسپورین نتوانسته بود بسیاری از سلولها را از لحاظ مورفولوژیکی کاملاً

1. Phosphate Buffer Saline
2. Propidium Iodide

متمایز کند و طول نوریت در آنها بسیار پـایین بـود. از سـوی دیگر سلولهای تیمار یافته با غلظت ۱۰۰۰ نانومولار علاوه بـر داشتن کمترین طول نوریت در مقایسه با سایر غلظتهـا، دارای ظاهر بسیار آسیب دیده نیز بودند (شکل۳، نمودار ۱).

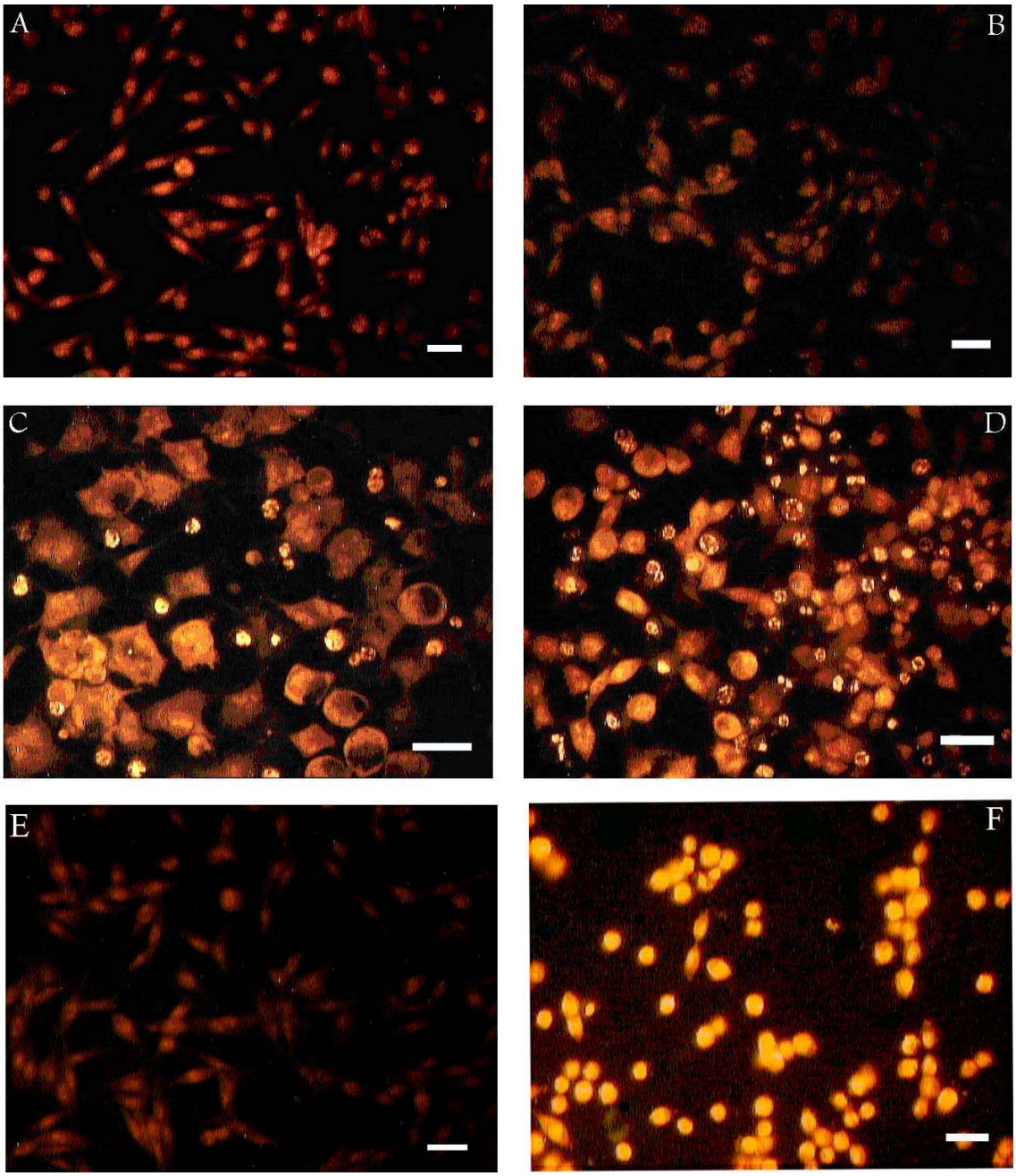


شکل ۳. اثر غلظتهای مختلف استئورسپورین بر ایجاد زواید نورونی (نوریت) در سلولهای رده سلولی PC-12.
A: غلظت ۱۱۰ نانو مولار، B: غلظت ۲۱٤ نانو مولارC، : غلظت ۳۱٦ نانو مولار، D: غلظت ۱۰۰۰ نانومولار. بار: ۲۰ میکرومتر



نمودار ۱. مقایسه طول نوریتها در سلولهای تمایز یافته PC-12 پس از تیمار با غلظتهای مختلف استئورسپورین.
a/b/c: ستونهای با حروف مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند($p<0.05$) .

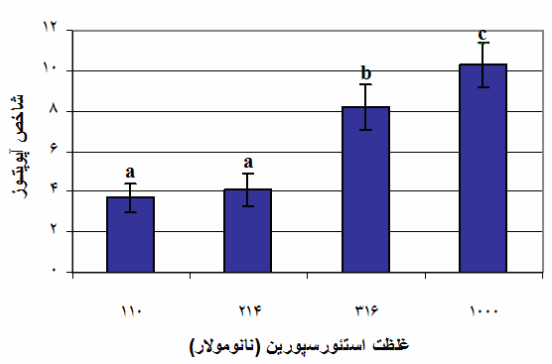
بررسیهای شاخص آپوپتوز درغلظتهای مورد آزمـایش نـشان داد که این شاخص در غلظتهـای ۱۱۰، ۲۱٤، ۳۱٦ و۱۰۰۰ نـانومولار به ترتیب ۰/۷±۳، ۰/۸±٤، ۱±۸ و ۱/۱±۱۰ بود که در ایـن بـین سلولهای تیمار شده با غلظتهای ۱۱۰ و ۲۱٤ نانومولار کمتـرین و سلولهای تیمار شده با غلظـت ۱۰۰۰ نـانومولار بیـشترین میـزان شاخص آپوپتوزی را دارا بودند. از طرفی غلظت ۳۱٦ نـانومولار با وجود اینکه سلولها را از لحاظ مورفولوژیکی به خوبی متمـایز کرده بود اما شاخص آپوپتوزی در سلولهای تیمار شـده بـا ایـن غلظت در مقایسه با غلظت ۲۱٤ نانومولار بـه طـرز معنـی داری بالاتر بود($p<0.05$) (شکل٤، نمودار۲).



شکل٤. اثر غلظتهای مختلف استئورسپورین بر القای آپوپتوز در سلولهای تمایز یافته PC-12.

A: غلظت ۱۱۰ نانو مولار، B: غلظت ۲۱٤ نانو مولار، C: غلظت ۳۱٦ نانو مولار، D: غلظت ۱۰۰۰ نانو مولار، E: سلولهای گروه کنترل منفی، F: سلولهای گروه کنترل مثبت .

- سلولهای به رنگ زرد درخشان دچار آپوپتوز شده اند. بار : ۲۰میکرومتر($p<0.05$)



نمودار ۲. مقایسه میزان وقوع آپوپتوز درسلولهای تمایز یافته PC-12 پس از تیمار با غلظتهای متفاوت استئورسپورین.

a/b/c: ستونهای با حروف مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند.

بحث

در این تحقیق پس از تمایز سلولهای رده PC-12 به نورونهای بالغ توسط غلظتهای متفاوت استئورسپورین، مورفولوژی و وقوع آپوپتوزدر سلولهای تمایز یافته برای به دست آوردن غلظت تمایزی مناسب این ماده ارزیابی شد.

رده سلولی PC-12 دارای پتانسیل تمایزی بالایی درپاسخ به فاکتورهای القا کننده سلولهای عصبی است به همین د لیل از سلولهای عصبی تمایز یافته این رده سلولی می‌توان به عنوان مدلی بسیار مناسب از نورونهای بالغ دستگاه عصبی در مطالعات استفاده کرد [٤].

NGF به عنوان معمول ترین و استئورسپورین به عنوان یکی از سریع ترین مواد القاکننده تمایز در این سلولها استفاده می‌شود .این دو ماده با دو روش متفاوت، سلولهای تمایز نیافته را هم از فاز تقسیم خارج می‌کنند و هم با ایجاد زواید نورونی، یک نورون بالغ تمایز یافته را به وجود می‌آورند [٦]. تفاوت در روند القای تمایز بین استئورسپورین و NGF وتاثیر مستقیم استئورسپورین بر پروتئینها سبب برتری زمانی تاثیر تمایزی این ماده در مقایسه با NGF شده است که در نوع خود بسیار قابل اهمیت است [۱۷]. از طرفی سلولهای عصبی تمایز یافته با استئورسپورین تا مدتها (حدود یک ماه) می‌توانند در محیط کشت و در حضور این ماده با درصد بقای بالا زنده بمانندکه از ویژگیهای دیگر این ماده است [٢٤].

عملکرد استئوروسپورین علاوه بر غلظت مورد استفاده از آن به نوع سلولهای تیمار یافته با این ماده نیز بستگی دارد به طوری که غلظت ۱۰ نانو مولار این ماده طی مدت سه روز سبب تمایز ۸۰ درصد از سلولهای رده Tsu-Pr1 که مدلی آزمایشگاهی از سلولهای توموری سرطان پروستات هستند، شده بود. این امر کاهش شدید آثار تهاجمی و مخرب این سلولها را به دنبال داشت [۲۵].

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر عملکرد وابسته به غلظت استئورسپورین را در ایجاد تمایز در سلولهای عصبی پس از ۵ ساعت تیمار تائید کرد. به طوری که غلظتهای٢١٤ و ٣١٦ نانومولار با ایجاد بلندترین نوریتها در سلولهای تمایز یافته، باعث تمایز آنها به سمت نورون بالغ شده بودند. از سوی دیگر غلظت۱۱۰ نانومولار، به علت ایجاد زواید نورونی کوتاه و نامناسب نمی تواند به عنوان غلظت تمایزی این ماده در سلولهای PC-12 در نظر گرفته شود. با توجه به اینکه این غلظت از غلظتهای مورد استفاده برای تمایز رده‌های سلولی عصبی از جمله PC-12 محسوب می‌شود [١٨،١٦]،این تضاد در القای تمایز کامل مورفولوژیکی در سلولهای عصبی، بین این مطالعه و برخی مطالعات دیگر را می‌توان در تفاوت روشهای تشخیص نورون بالغ و اندازه گیری طول نوریتها قلمداد کرد. در مطالعات پیشین برای ارزیابی نورون‌های تمایز یافته صرفاً ظاهر شاخه شاخه آنها یا نسبت طول نوریت به اندازه جسم سلولی نورون مد نظر قرار می‌گرفت [۱۷،۱۸ و٢٦]. در صورتی که در تحقیق حاضر برای ارزیابی بلوغ مورفولوژیکی نورونهای بالغ، یکی از دقیق ترین روشهای اندازه گیری طول نوریتها و زواید نورونی بر پایه محاسبات ریاضی استفاده شد که یکی از مزیتهای این مطالعه نسبت به سایرین است [۲۲].

علاوه بر این، غلظت ۱۰۰۰ نانومولاراستئورسپورین افزون بر

ایجاد کمترین طول نوریت باعث به وجود آمدن ظاهری آسیب دیده در سلولها شده بود که نتایج حاصل از بررسی شاخص آپوپتوز در این سلولها نشان می‌دهد که به وجود آمدن ظاهر آسیب دیده در آنها با توجه به بالا بودن شاخص آپوپتوز در سلولهای تیمار شده با این غلظت به علت القای آپوپتوز در آنها است .این غلظت در برخی مقالات به عنوان غلظت تمایز دهنده [۱] و در برخی دیگر به عنوان غلظت القاکننده آپوپتوز [۱۶] معرفی شده بود که در تحقیق حاضر نقش پروآپوپتوتیکی این غلظت با القای آپوپتوز در بیش از ۱۰درصد سلولها به شدت تایید شد .

نکته قابل توجهی که در بررسیهای شاخص آپوپتوز در غلظتهای دیگر می‌توان به آن اشاره کرد، القای آپوپتوز در سلولهای تمایز یافته با غلظت ۳۱۶ نانومولار بود. در برخی مطالعات به ویژه مطالعاتی که روی سلولهای گانگلیونی شبکیه چشم که ماهیتی عصبی دارند انجام شده، غلظت ۳۱۶ نانومولاراستئورسپورین با توجه به ایجاد نوریتهای مناسب و به جود آوردن سلولهای عصبی تمایزیافته به عنوان غلظت تمایزی مناسب این ماده در نظر گرفته شده است بدون آنکه توجهی به نقش القایی آن در ایجاد آپوپتوز شده باشد [۱]. تحقیق حاضر با بررسی همزمان مورفولوژی ومیزان آپوپتوز در سلولها نشان داد که استفاده از این غلظت در عین حال که باعث ایجاد زاویه نورونی مناسب و تمایز مورفولوژیکی سلولها می‌شود اما به علت القای آپوپتوز نمی تواند به عنوان غلظت مناسب برای تمایز سلولهای رده PC-12 به نورونهای بالغ استفاده شود. از این رو در تحقیق حاضر غلظت ۲۱٤ نانومولار استئوروسپورین، به عنوان غلظت میانه غلظتهای۱۱۰ و ۳۱٦ نانومولار که در اغلب تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند، استفاده شد و با توجه به ایجاد بلندترین زوایه نورونی و القای کمترین میزان آپوپتوز در سلولها به عنوان مناسب ترین غلظت تمایزی استئوروسپورین درمقایسه با سایر غلظتهای مورد مطالعه در این تحقیق معرفی می‌شود.

در مجموع با توجه به اثرهای مختلف غلظتهای متفاوت استئورسپورین در تمایز والقای آپوپتوز و اختلاف در معرفی یک غلظت ثابت برای تمایز سلولها توسط استئورسپورین، نتایج این تحقیق علاوه براین که ممکن است به عنوان راه گشایی برای به کارگیری صحیح این ماده در تمایز سریع سلولهای عصبی بدون القای آپوپتوز در آنها قرار گیرد، پیشنهاد می‌کند که هر آزمایش گر قبل از استفاده تمایزی از استئورسپورین، نقش پروآپوپتوتیکی آن را نیز مدنظر داشته و مورد بررسی قرار دهد.

References

1. **Frassetto L, Schlieve C, Lieven C, Amy A, Jones M, Agarwal N, et al.** Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor. IOVS 2006; 47: 427-38.
2. **Fujita K, Lavarovici P, Gurrof G.** Regulation of the differentiation of PC-12 cells. Environment health perspect 1989; 80:127-42.
3. **Greene LA, Tischler A.** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor .Nat Acid Sci 1977; 73: 424-8.
4. **Greene LA.** Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC-12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. J Cell Biol 1978; 78: 747–55.
5. **Kaplan DR, Stephens RM.** neurotrophin signal transduction by the Trk receptorJ Neurobiol 1994; 25: 1404-17.
6. **Gollapudi L, Neet K.E.** Different Mechanisms for Inhibition of Cell Proliferation via Cell Cycle Proteins in PC-12 Cells by Nerve Growth Factor and Staurosporine. J Neurosci Res1997; 49: 461-74.
7. **Drubin, DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW.** Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC-12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly promoting factors. J Cell Biol 1985; 101: 1799-807.

8. **Rasouly D, Rahamim E, Ringel L, Ginzburg I, Muarakata C,Matsuda Y, et al.** Neurites induced by staurosporine in PC-12 cells are resistant to colchicine and express high levels of tau proteins. Mol Pharmacol 1993; 45: 29-35.
9. **Hanemaaijer R, Ginzburg I.** Involvement of mature tau isoforms in the stabilization of neurites in PC12 cells. J Neurosci Res 1991; 30: 163-71.
10. **Brugg B,** Matus A.PC12 cells express juvenile microtubule associated proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. J Cell Biol 1988; 107: 643-50
11. **Black M, Aletta M, Greene LA.** Regulation of microtubule composition and stability during nerve growth factor-promoted neurite outgrowth. J Cell Biol 1986; 103: 545-57
12. **Hashimoto S, Hagino A.** Staurosporine induced neurite outgrowth in PC-12 cells. Exp Cell Res 1983; 184: 351–9.
13. **Rasouly D, Shavit D, Zuniga R, Rafael B.** Staurosporine induces neurite outgrowth in neuronal hybrids(PC-12EN) lacking NGF receptors. J Cell Biochem 1996; 62: 356-71
14. **Knusel B, Hefti F**.K-252 compounds: Modulators of neurotrophin Signal transduction. J Neurochem 1992; 59: 87–96
15. **Schumacher A,Arnold S,Addicks K,Doerfor W.** Staurosporine is a potent activator of neuronal,glial and CNS stem cellilike neurosphere differentiation in murine embryonic stem cell. Mol Cell Neurosci 2003; 23: 669-80
16. **Deshmukh M, Johnson E M.** Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications Cell Death and Differentiation 2000; 3: 250-61
17. **Rasouly D, Rahamim E, Lester D, Matsuda Y, Lazarovici P.** Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC-12 cells is independent of protein kinase C inhibition. Mol Pharmacol 1992; 42: 35-43.
18. **Sadot E, Barg J, Rasouly D, Lazarovici P.** Short- and long-term mechanisms of tau regulation in PC-12 cells. J Cell Sci 1995; 108: 2857-64.
19. **Drechsel DN, Hymann AA, Cobb MH, Kirschner MW.** Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol Cell Biol 1992; 3: 1141-54.
20. **Wille H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow M, Mandelkow E.** Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimmers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. J Cell Biol 1992; 118: 573-84.
21. **Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee V.** Abnormal tau phosphorylation at ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron 1993; 10: 1089-99.
22. **Rønn L, Ralets I , Hartz B, Bech M , Berezin A, Berezin V, et al.** A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereologicalprinciples. J Neurosci Method 2000; 100: 25-32.
23. **Gold R.** Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab Invest 1994; 71: 219-28.
24. **Prince JA, Oreland L.** Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. Brain Res Bull 1997; 43: 515–23.
25. **Takahashi N, Shimizu T, Takeda K.** Low-dose staurosporine suppresses proliferation and induces neurites in human prostatic cancer TSU-Pr1 cells. Prostate 2000; 44: 328–33.
26. **Raffioni S, Bradshaw R**. Staurosporine causes EGF to induce differentiation in PC-12 cells via receptor up-regulation. .J Biol Chem 1994; 270: 7568-72.
27. **ano H.** Stem cell biology of the central nervous system. J Neurosci Res 2002; 69:698–707.