مقاله تحقیقی

بهبود علایم بیماری پارکینسون در موشهای صحرایی پس از پیوند سلولهای بنیادی رویانی

فردین فتحی .M.Sc*، تقی الطریحی .Ph.D*، منصوره موحدین .Ph.D*، سیدجواد مولی .Ph.D**

*گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

**گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۳

چکیده

هدف: ایجاد مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون به‌منظور ارزیابی توانایی درمانی سلولهای بنیادی رویانی به‌عنوان جایگزین مناسبی برای درمانهای رایج می‌باشد.

مواد و روشها: مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون در موشهای صحرایی ایجاد شد و سلولهای بنیادی رویانی CCE در سه گروه به موشهای پارکینسونی پیوند شدند؛ سلولهای درمان شده با اسید رتینوییک، سلولهای درمان نشده با اسید رتینوییک و سلولهای حامل ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF: Brain derived neurotiophic factor). سلولها قبل از پیوند بابرومودیوکسی یوریدین (Brdu) نشاندار شدند. موشها در گروه چهارم فقط محیط کشت حاوی سلولها را دریافت کردند. در روزهای پنجم و پانزدهم ارزیابیهای بافتی و ایمونوهیستوشیمی و هشت هفته بعد از عمل پیوند، ارزیابی رفتاری از موشها به‌عمل آمد.

یافته‌ها: در بخش ارزیابی بافتی در روز پانزدهم، انجام رنگ‌آمیزی‌های عمومی H&E و اختصاصی کرزیل ویوله نشان داد که سلولهای پیوند شده به سلولهای عصبی تمایز یافته و به نظر می‌رسد که با بافت میزبان نیز سازگاری پیدا کرده‌اند. مطالعه انجام شده با میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن سلولهای عصبی و الیگودندروسیت را در محل پیوند نشان داد. در همین روز ارزیابی به‌عمل آمده با استفاده از آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز به‌عنوان یکی از مهمترین شاخصهای سلولهای دوپامینرژیک، تمایز سلولهای پیوند شده به سلولهای دوپامینرژیک را تأیید کرد. از طرف دیگر؛ نتیجه ارزیابی ایمونوهیستوشیمی در روز پنجم برای سلولهای نشاندار شده با بروموديوکسی یوریدین (Brdu) و سلولهایی که هنوز آنتی‌ژن SSEA1 را به‌عنوان یک مارکر اختصاصی سلولهای بنیادی رویانی بیان می‌کنند مثبت بود. نتایج به‌دست آمده در ارزیابیهای بافتی و ایمونوهیستوشیمی با انجام ارزیابی رفتاری تأیید شد به‌طوری که موشها در گروههایی که سلولها را به شکل درمان نشده با اسید رتینوییک، درمان شده با اسید رتینوییک و حامل ژن BDNF دریافت کرده بودند، در مقایسه با شاهد بهبود پیدا کردند.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، بیانگر این است که سلولهای بنیادی رویانی دودمان CCE علاوه بر اینکه دودمان مناسبی برای انتقال ژن و تمایز به سلولهای دوپامینرژیک هستند؛ قادرند به‌صورت مدلی مناسب برای انجام مطالعات سلول درمانی و ژن درمانی به‌کار گرفته شوند.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی رویانی، تمایز عصبی، سلول درمانی، ژن درمانی، دودمان سلولی CCE

مقدمه

سلولهای بنیادی رویانی

سلولهای بنیادی رویانی (ES: Embryonic Stem) سلولهایی هستند که در مرحله بلاستوسیست به روش آزمایشگاهی از توده سلولی داخلی جنین جداسازی می‌شوند. کشت موفقیت‌آمیز توده‌های سلولی داخلی و تهیه دودمانهای سلولی پایدار از سلولهای رویانی چند ظرفیتی رویانهای اولیه تحت عنوان ES lines، پیشرفت غیرمنتظره‌ای بود که در سال ۱۹۸۰ برای بیولوژیستهای سلولی و مولکولی حاصل شد؛ زمانی که

آدرس مکاتبه : تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵

روشهای ویژه‌ای کشف شدند که از طریق آنها سلولهای بنیادی رویانی در محیط آزمایشگاهی توانایی رشد و تکثیر را کسب کردند [۱ و ۲]. این سلولها دارای توانایی تجدید خود به‌طور نامحدود و قدرت تمایز به انواع سلولهای پیکری هستند. طی بررسیهای آزمایشگاهی مشخص شده است که این سلولها به سلولهای پیکری ویژه تمایز پیدا کرده و فرایندهای اولیه تکوین را تقلید و تکرار می‌کنند. این ویژگیها باعث شده است تا سلولهای بنیادی رویانی علاوه بر اینکه به‌صورت مدل مناسبی برای مطالعه تکوین اولیه جنین استفاده شوند، به یک منبع‌دهنده و جذاب سلولی برای استراتژیهای سلول درمانی و ژن درمانی نیز تبدیل شوند.

روشهای ویژه جداسازی سلولهای بنیادی از بلاستوسیستهای مرحله پیش لانه‌گزینی که برای اولین بار گزارش شده‌اند [۱ و ۲]؛ امروزه به روشهای استانداردی تبدیل شده‌اند که با کمی تغییر استفاده می‌شوند [۳]. یکی از نکات جالب در زمینه جداسازی سلولهای بنیادی رویانی این است که تا امروز فقط سلولهای جداسازی شده از سه گونه موش، میمون و انسان قادر به رشد و تجدید خود به‌طور طولانی مدت بوده‌اند [۴-۶].

تاکنون سلولهای بنیادی رویانی (ES) به سلولهای زیادی تمایز یافته‌اند که از جمله آنها می‌توان به سلولهای عصبی [۷-۹]، سلولهای عضلانی قلبی [۱۰]، سلولهای مترشحه انسولین [۱۱]، سلولهای پیش‌ساز خونی [۱۲] و سلولهای مختلف دیگر [۱۳] اشاره کرد. همچنین در زمینه تمایز سلولهای بنیادی رویانی انسان به سلولهای قلبی [۱۴]، سلولهای مترشحه انسولین [۱۵] و سلولهای عصبی [۱۶] نیز گزارشهایی ارایه شده است. این پیشرفتها می‌تواند راه را برای به‌کارگیری سلولهای بنیادی انسان در درمان بیماریها باز کند.

بیماری پارکینسون

این بیماری یک نوع اختلال وابسته به سن در سیستم عصبی انسانی است که در اثر تخریب پیشرونده و وسیع نورونهای دوپامینرژیک جسم سیاه ایجاد می‌شود. فقدان دوپامین در پایانه‌های اصلی این نورونها در جسم مخطط، منجر به بروز علایم نورولوژیک ویژه این بیماری می‌شود. این بیماری بیشتر از ۲ درصد افراد بالای ۶۵ سال را در بر می‌گیرد [۱۷]. بیماری پارکینسون در سطح پاتولوژیک به‌وسیله تخریب پیشرونده و فقدان نورونهای دوپامینرژیک مسیر نیگر و استریاتال مشخص می‌شود [۱۷] که منجر به بروز علایم کلاسیک پارکینسون می‌شود. این علایم شامل لرزش[1]، سفتی حرکات[2] و کندی حرکات[3] است [۱۷]. با پیشرفت بیماری نورونهای نورادرنرژیک هسته لوکوس سرولئوس هم درگیر شده که با علایمی نظیر دمانس مغزی[4] و افسردگی[5] مشخص می‌شود [۱۷]. افسردگی می‌تواند مربوط به اختلال در هسته‌های رافه نیز باشد. اختلال در این هسته‌ها اغلب مرتبط با بیماری پارکینسون است [۱۷]، علاوه بر از دست رفتن نورونها، ویژگی برجسته و ثانویه بیماری پارکینسون تشکیل آنکلوزیونهای[6] رشته‌ای داخل سلولی است که اجسام لوی (Lewy bodies) نامیده شده و شامل تجمعات پروتئینی غیرطبیعی از جمله پروتئین سینکولین (Synuclein) است. این تجمعات در نورونهای دوپامینرژیک ایجاد می‌شوند [۱۷].

علت تخریب انتخابی تجمعات ویژه نورونی در بیماری پارکینسون ناشناخته است [۱۷]. اما از نظر پاتوفیزیولوژی عواملی مانند افزایش استرسهای اکسیداتیو، اختلال عمل میتوکندریایی و آسیبهای خارج سلولی[7] به‌عنوان علتهای پیشنهادی ارایه شده است [۱۷]. از آنجایی که در اکثر موارد، ابتلا به بیماری پارکینسون به شکل تک‌گیری[8] است حدس بر این است که ترکیبی از عوامل مستعدکننده ژنتیکی و عوامل محیطی نظیر حشره‌کشها و ویروسها در ایجاد بیماری نقش دارند [۱۷].

نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک همچنین نشان می‌دهد که تعدادی از عوامل محیطی، خطر ابتلا به پارکینسون را افزایش می‌دهند. از جمله این عوامل می‌توان به استفاده از آب جاری، زراعت کردن، حشره‌کشها، علف‌کشها، مواد شیمیایی صنعتی و زندگی در روستا اشاره کرد. شواهد اپیدمیولوژیک جالبی نیز در مورد وجود یک رابطه معکوس مابین سیگار کشیدن و

1. Tremor
2. Rigidity
3. Hypokynesia
4. Dementia
5. Depression
6. Inclusions
7. Exocytotic
8. Sporadic

پارکینسون وجود دارد [۱۸].

درمان پارکینسون

درمان رایج علایم حرکتی پارکینسون شامل درمان علامتی[1] بیماری است که به‌صورت استفاده از ترکیب L-DOPA و کاربیدوپا (Carbidopa) است [۱۷ و ۱۸]. این داروها باعث افزایش سنتز و آزادسازی دوپامین می‌شوند. معمولاً همراه با به‌کارگیری داروهای مذکور، تحریک مغزی و عمقی هسته‌های گلوبوس پالیدوس و هسته ساب تالامیک نیز انجام می‌شود [۱۸]. باور بر این است که تحریکات عمقی از طریق بلوکه کردن دپلاریزاسیون در نورونها، منجر به تسکین علایم حرکتی می‌شوند [۱۷]، این نوع درمان در مراحل اولیه بیماری کاملاً مؤثر است. اما ادامه آن در اکثر بیماران منجر به بروز علایمی نظیر نوسانات حرکتی[2]، اختلال حرکتی[3] و پسیکوزیس[4] می‌شود [۱۸]. علاوه بر این؛ پارکینسون با علایمی نظیر جمود[5]، اختلالات سیستم اتونومیک و دمانس مرتبط بوده که به درمان دوپامینی پاسخ نمی‌دهند. بنابراین اکثر بیماران پارکینسونی سرانجام یک نوع ناتوانی را تجربه می‌کنند که به‌وسیله درمانهای قابل دسترس و رایج قابل کنترل نیست. بر همین اساس تلاشهای گسترده و هماهنگی در برای تکامل یک نوع درمان نوروپروتکتیو صورت گرفته تا روند تخریب بیماری را متوقف یا کند سازد [۱۸].

از جمله روشهای درمانی بیماری پارکینسون که به‌منظور ترمیم یا برگردان فعالیت مغز انجام می‌گیرد؛ جایگزین کردن بخشی از بافت مغز با بخش مرکزی غده آدرنال به‌صورت پیوند اتولوگوس، پیوند سلولهای جسم سیاه جنینی، پیوند سوسپانسیونهای سلولی یا یک بافت کشت داده شده و پیوند سلولها یا وکتورهایی است که تحت مهندسی ژنتیک قرار گرفته و فاکتورهای مورد نظر را تولید می‌کنند. علاوه بر این؛ درمان به شکل جایگزینی ژنی[6] و به‌کارگیری فاکتورهای رشد هم مورد توجه محققین قرار گرفته است. به‌طور کلی درمان آزمایشگاهی این بیماری یک حوزه پژوهشی در حال تکامل سریع بوده و در این میان پیوند سلولهای عصبی و بنیادی برای درمان پارکینسون به میزان زیادی مورد توجه محققین قرار گرفته است [۱۸].

پیوند جسم سیاه جنینی به مغز بیماران پارکینسونی

تاکنون حدود ۳۵۰ بیمار پارکینسونی پیوندهایی از بافت جنین اولیه را با منشاء انسانی و خوکی دریافت کرده‌اند. در حال حاضر به خوبی این واقعیت آشکار شده است که نورونهای دوپامینرژیک مزانسفالیک جنین انسان بعد از پیوند به مغز انسان زنده می‌مانند. مشاهدات بالینی نشان داده است که این پیوندها زنده مانده، دوپامین را تولید و ترشح کرده و از این طریق باعث تسکین علایم بیماران پارکینسونی می‌شوند. همچنین مطالعات اخیر شواهدی را فراهم می‌کنند مبنی بر اینکه بعد از پیوند بافت مزانسفالیک جنینی انسان، روند آزادسازی منظم دوپامین به جسم مخطط برگردانده شده و سلولهای پیوند شده قادرند به‌طور عملکردی با مدارهای عصبی موجود در مغز بیماران ارتباط برقرار کنند. اگرچه نتایج تحقیقات انجام شده دلایل قانع‌کننده‌ای را برای انجام روش جایگزینی سلولی فراهم می‌کنند اما به نظر نمی‌رسد که پیوند بافت عصبی جنین انسان بتواند تبدیل به یک روش درمانی رایج برای عده زیادی از بیماران شود. چرا که اولاً میزان محدودی از بافت جنینی انسان قابل دسترس است؛ ثانیاً مشکلات بزرگی در استاندارد کردن، خالص‌سازی و تهیه بافتهای زنده جنینی وجود دارد و ثالثاً استفاده مداوم از مقادیر زیادی بافت جنینی انسان با مشکلات اخلاقی همراه است. یکی از موانع دیگر در به‌کارگیری بافتهای جنینی برای درمان بیماران پارکینسونی این است که فقط ۵ تا ۲۰ درصد از نورونهای دوپامینرژیک پیوند شده در محل پیوند زنده می‌مانند که این درصد، درصد بسیار کمی است. بنابراین برای القای بهبودی قابل توجه در هر بیمار پارکینسونی لازم است بافت مغزی ۶ تا ۸ جنین به‌کار گرفته شود [۱۸].

استفاده از پیوند سلولهای بنیادی بالغ و رویانی برای درمان پارکینسون

کاملاً محتمل است که درمان براساس به‌کارگیری سلولهای

1. Symptomatic treatment
2. Motor fluctuation
3. Dyskynesia
4. Psychcosis
5. Freezing
6. Gene Replacement Therapy

بنیادی در انسان برای اولین بار در بیماران پارکینسونی آزمایش شود. دلیل اصلی این ادعا آن است که شواهد خوب و قابل توجهی در دست است که به‌کارگیری روش جایگزین سلولی در این بیماران، می‌تواند به خوبی عمل کند [۱۸]. دلیل دیگر آن است که روشهای مبتنی بر به‌کارگیری سلولهای بنیادی در درمان بیمارانی که کارآیی بالینی درمان به‌وسیله یک مکانیسم منفرد و مشخص (نظیر برگرداندن روند انتقال دوپامین در بیماران پارکینسونی) تعیین می‌شود از شانس بیشتری برخوردار هستند.

اساساً دو راه برای استفاده از سلولهای بنیادی یا پیش‌ساز و نابالغ به‌صورت پیوند به بیماران پارکینسونی وجود دارد [۱۸]؛ اولین راه آن است که سلولها قبل از عمل پیوند به‌صورت آزمایشگاهی به نورونهای دوپامینرژیک تمایز داده شوند که در این صورت سلولهای بنیادی تقریباً می‌توانند به یک منبع سلولی با ظرفیت نامحدود برای تولید نورونهای دوپامینرژیک تبدیل شوند و آمادش‌های سلولی نیز می‌توانند از نظر زنده بودن سلولها و خالص بودن آنها، به‌وسیله روشهای استاندارد تحت کنترل کیفی و کمی قرار گیرند. از نظر تئوریک، نورونهای دوپامینرژیک را می‌توان از سلولهای بنیادی با چند منشاء مختلف تولید کرد. سلولهای بنیادی رویانی که از سلول تخم لقاح یافته منشاء می‌گیرند؛ سلولهای بنیادی عصبی که از مغز جنین یا موجود بالغ گرفته می‌شوند و سلولهای بنیادی که از سایر بافتها مانند مغز استخوان تهیه می‌شوند [۱۹].

دومین راه برای استفاده از سلولهای بنیادی یا پیش‌ساز برای پیوند به بیماران پارکینسونی آن است که سلولهای تمایز نیافته یا پیش‌ساز عصبی متعاقب پیوند به جسم مخطط یا جسم سیاه به نورونهای دوپامینرژیک تبدیل شوند. این نورونها در مقایسه با نورونهای جنینی اولیه بهتر می‌توانند با سلولهای میزبان ارتباط برقرار کرده، سازگار شوند و به شکل مناسبی مسیر نیگرواستریاتال را بازسازی کنند. اما اینکه فرضیه مذکور عملاً تحقق پیدا می‌کند یا خیر، در حال حاضر کاملاً شناخته شده نیست. این فرضیه تا حدودی به‌وسیله کاری که اخیراً در این زمینه صورت گرفته حمایت می‌شود [۱۸]. بی‌جورکلند Bjorklund و همکاران [۲۰] سلولهای بنیادی رویانی و تمایز نیافته موش را در مقادیر کم به جسم مخطط موشهای صحرایی که به‌صورت آزمایشگاهی پارکینسونی شده بودند پیوند زدند. آنها مشاهده کردند که درصد بالایی از این سلولها به سلولهای دوپامینرژیک مزانسفالیک تمایز پیدا کرده و مارکرهای عصبی این سلولها را بیان می‌کنند. سلولهای پیوند شده باعث بهبود رفتاری موشها شده اما توانایی این سلولها برای عصب‌دهی مجدد جسم مخطط و آزادسازی دوپامین به‌همان اندازه که باعث بهبود رفتاری موشها می‌شوند، نامشخص است [۱۸]. محققین دیگری نیز توانایی سلولهای بنیادی رویانی را در تمایز به سلولهای عصبی به‌صورت *in vivo*، ارزیابی کرده و به نتایج قابل توجهی دست یافته‌اند [۲۳-۲۱].

مهمترین نتیجه علمی که از انجام تحقیقات آزمایشگاهی در زمینه پیوند سلولهای عصبی به بیماران و خصوصاً بیماران پارکینسونی حاصل شده است، آن است که سلولهای جایگزین شده می‌توانند به خوبی در مغز بیماران عمل کنند. با وجود این، نظر به تکامل درمانهای مؤثر و جدیدی نظیر تحریک عمقی برای بیمارانی که مبتلا به پارکینسون پیشرفته هستند طرح این سؤال ضروری به نظر می‌رسد که آیا انجام تحقیقات بیشتر برای پیشرفت روشهای مبتنی بر سلول درمانی برای پارکینسون ضروری است یا خیر؟ محققین برجسته در زمینه بیماری پارکینسون معتقدند اگر سلول درمانی موفقیت‌آمیز باشد این نوع درمان دارای ویژگیهای بی‌نظیر بوده و نسبت به سایر روشهای درمانی از مزیتهای بیشتری برخوردار است. هدف از سلول درمانی برگرداندن انتقال دوپامین به جسم مخطط است. در مواردی که عمل سلول درمانی با موفقیت انجام می‌شود پیشرفت درمانی بزرگی برای بیمار حاصل شده و به بیمار اجازه داده می‌شود که معالجات درمانی دیگر را قطع کند بدون اینکه آثار جانبی خاصی متوجه او شود. نورونهای پیوند شده، حداقل تا ۱۰ سال پس از جراحی به‌وسیله فرایند بیماری تخریب نمی‌شوند. این مسئله بیانگر این است که تسکین علایم بیماری برای سال‌های طولانی می‌تواند حفظ شود تکنولوژی جداسازی، تمایز و دستوری سلولهای بنیادی ممکن است یک جهش علمی باشد که بتواند روشهای درمانی جایگزین سلولی را به درمانهای مفیدی برای تعداد زیادی از بیماران مبتلا به اختلالات حرکتی تبدیل کند. البته در این راستا نیاز است که از

مکانیسم‌های تمایز سلولی، ترمیم و بهبود عملکردی اطلاعات بیشتری کسب کنیم [۱۸].

بنابراین در راستای پژوهشهایی که برای به فعالیت رساندن پتانسیل سلولهای بنیادی رویانی در درمان بیماریهای مختلف و خصوصاً پارکینسون انجام می‌شود و با توجه به نتایج مطالعاتی که تاکنون در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی برای پارکینسون انجام شده است؛ پژوهش حاضر طرح‌ریزی شد تا توانایی سلولهای بنیادی رویانی در درمان پارکینسون و نیز بیان و انتقال ژن BDNF به‌عنوان یک عامل درمانی تحت ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی رویانی CCE

در این پژوهش پاساژ بیستم دودمان سلولی CCE استفاده شد. برای کشت این سلولها از محیط کشت DMEM، سرم FBS به میزان ۱۵ درصد، اسیدآمینه‌های غیرضروری به میزان یک درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰ u/ml، استرپتومایسین ۵۰u/ml، ۲-مرکاپتواتانول ۰/۱ میلی‌مولار و LIF با غلظت ۱۰ng/ml استفاده شد. سلولها در دیشهای ۶۰ میلی‌متری که کف آنها به‌وسیله ژلاتین ۱ درصد حل شده در PBS، پوشانده شده بود کشت داده شدند. دمای انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO_2 آن ۵ درصد بود [۲۴ و ۲۵].

آماده‌سازی سلولها برای پیوند

برای انجام این پژوهش ۴ گروه مورد مطالعه وجود داشت.

گروه اول

پاساژ بیستم سلولهای CCE در این پژوهش استفاده شد. سلولها پس از ذوب شدن به مدت دو هفته در حضور LIF کشت داده شدند، سپس برای آماده‌سازی عمل پیوند، نشاندار شدند. برای نشاندار شدن به مدت ۱۴ ساعت در معرض برومودیوکسی یوریدین (Brdu: Bromodeoxyuridine) واقع شده و پس از ارزیابی آنها به روش ایمونوسیتوشیمی و اطمینان از نشاندار شدن به‌وسیله Brdu، سلولها را به کمک مخلوط EDTA-TRYPSIN از کف دیشها جدا کرده و سوسپانسیونی از آنها در محیط کشت DMEM با غلظت ۱۰ در میلی‌لیتر تهیه شد. این سلولها برای تشکیل اجسام شبه رویانی (Embryoid bodies) به پتری دیشهای باکتریولوژیک منتقل شدند. پس از گذشت دو روز محیط کشت اجسام شبه رویانی که فاقد ۲-مرکاپتواتانول و LIF بود با محیط کشت مشابهی تعویض شد. بعد از گذشت چهار روز، سلولها را در محیط کشت و با دور ۱۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ کرده و به‌جای محیط کشت، به سلولها PBS استریل اضافه شد. بعد از اینکه سلولها با بافر فسفات استریل شستشو داده شدند؛ مجدداً با دور قبلی به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند و بافر فسفات روی سلولها دور ریخته شد. سپس به سلولها یا اجسام شبه رویانی مخلوط EDTA-TRYPSIN اضافه شد. پس از آن سلولها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در مرحله بعدی برای جدا شدن بهتر سلولها از همدیگر، آنها را به آرامی به‌وسیله پیپت‌های پاستور استریلی که قطر آنها نسبت به اندازه معمولی کمتر بود پیپتاژ کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. بعد از آن مخلوط EDTA-TRYPSIN را با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت جایگزین کرده و در نهایت قبل از پیوند سلولها، میزان زنده بودن آنها به کمک تریپان بلو مشخص شد به‌طوری که نتایج نمایانگر زنده بودن حدود ۹۵ درصد از سلولها بود. تعداد مورد نیاز از سلولها برای عمل پیوند استفاده شد. برای پیوند سلولها از روشی مشابه تزریق نوروتوکسین استفاده شد. در گروه دوم تمام مراحل آماده‌سازی سلولها برای پیوند مشابه گروه اول بود با این تفاوت که در هنگام تهیه اجسام شبه رویانی از سلولهای بنیادی، در ۴۸ ساعت اول از محیط کشتی حاوی اسید رتینوییک با غلظت 5×10^{-7} مولار و پتری دیشهای باکتریولوژیک استفاده شد (پروتکل $2^{+}/2^{-}$). در گروه سوم؛ موشها که سلولهای بنیادی رویانی ترانسفکت (Transfect) شده با ژن BDNF[1] را به‌صورت پیوند دریافت کردند. بعداز ذوب کردن سلولهای بنیادی و پاساژ آنها به مدت دو هفته، با استفاده از الکتروپوریشن حامل پلاسمیدی pcDNA3-hBDNF v5 به داخل آنها ترانسفکت شد و پس از گرفتن بیان دایم ژن BDNF از سلولها این سلولها برای تشکیل

۱. نتایج این بخش از مطالعه برای انتشار به مجله پاخته ارسال شده است.

اجسام شبیه رویانی به پتری دیشهای باکتریولوژیک منتقل شده و مراحل لازم برای آماده‌سازی عمل پیوند را مانند سلولهای گروه اول متحمل شدند. در هر سه گروه، سلولها قبل از مراحل انتقال به پتری دیشهای باکتریولوژیک با استفاده از Brdu نشاندار شدند. تعداد سلولهای پیوند شده در هر کدام از سه گروه مذکور ۱×۱۰^{۵} سلول در ۵ میکرولیتر بود. به مغز موشهای گروه چهارم فقط محیط کشت پیوند زده شد. به‌منظور جلوگیری از دفع پیوند، سیستم ایمنی موشها در هر چهار گروه از طریق تزریق داخل صفاقی داروی سیکلوسپورین A[1] با غلظت ۱۵mg/kg سرکوب شد [۲۰]. تزریق این دارو با غلظت دو برابر، یکروز قبل از عمل پیوند شروع شده و بعد از پیوند به‌صورت روزانه با غلظت ۱۵mg/kg ادامه یافت [۲۰].

نشاندار کردن سلولها با استفاده از Brdu و ردیابی آن به‌وسیله ایمونوهیستوشیمی

برای نشاندار کردن سلولهای بنیادی، به محیط کشت سلولها Brdu با غلظت ۱۰ μg/ml اضافه شد و سلولها در فاز تکثیری به مدت ۱۴ ساعت در معرض آن قرار گرفتند. هنگام ساب‌کالچر (Subculture) سلولها به‌منظور بررسی ایمونوسیتوشیمی سلولها و تشخیص وجود Brdu در هسته آنها، در کف پتری دیشها لاملهای آغشته به ژلاتین ۱ درصد را جاگذاری نموده و بعد از گذشت ۱۴ ساعت لاملها به استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس از اسید کلریدریک 2N به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره کردن DNA هسته سلولها و در معرض قرار گرفتن آنتی‌ژن Brdu استفاده شد. بعد از اعمال اسید کلریدریک به سلولها، از بافر بورات ۰/۱M (pH=۸/۵) به مدت ۲×۱۰ دقیقه برای شستشوی سلولها و خنثی کردن اسید کلریدریک استفاده شد. بعد از این مرحله سلولها سه بار با PBS، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. نشانگر ثانویه کونژوگه به پراکسیداز Brdu که در PBS حاوی ۱ درصد BSA رقیق شده بود با غلظت ۱:۱۵۰ به سلولها اعمال شده و برای جلوگیری از بخار شدن حلال نشانگر و خشک شدن سلولها لامل روی پتری دیشهای کوچکی که داخل پتری دیشهای بزرگتر جاگذاری شده و در کف پتری دیشهای بزرگ هم مقداری PBS ریخته شده بود، جاگذاری شدند. سپس پتری دیشهای مذکور به مدت ۲ ساعت در محیط ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از این مرحله سلولها سه بار با PBS، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شده و به مدت نیم ساعت با محلول سوبسترای DAB در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت سلولها را با آب مقطر شستشو داده و پس از آبگیری با اتانولهای ۹۰، ۸۰، ۷۰ هر کدام به مدت ۲ دقیقه و اتانول مطلق [Merck] و انکوباسیون در زایلن [Merck] هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، لاملها را با چسب انتالن [Merck] به لام چسبانده و لامهای آماده شده با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

ایجاد مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش صحرایی با استفاده از 60H-Dopmaine

پژوهش حاضر روی ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد Sprague Dawley به وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام شد. موشها با دریافت مخلوطی از کتامین ۶۰mg/kg و گزیلازین ۳mg/kg به‌صورت داخل صفاقی بیهوش شده و تزریق استریوتاکسیک نوروتوکسین به داخل جسم مخطط چپ موشها انجام شد. مختصات محل تزریق نسبت به خط بین گوشی (interauricular) به‌صورت ۹/۲ میلی‌متر قدامی، ۳ میلی‌متر جانبی و ۴/۵ میلی‌متر شکمی (از سطح دوراماتر) بود. همچنین میله دندانی استریوتاکس ۳/۳ میلی‌متر زیرسطح افق تنظیم شده بود [۲۶]. پس از پیداکردن نقطه‌ای از جمجمه با مشخصات ذکر شده و سوراخ کردن آن با مته، ناحیه مورد نظر کانول‌گذاری شده و تزریق نوروتوکسین توسط سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری انجام گرفت. به داخل جسم مخطط سمت چپ هر حیوان ۵ میکرولیتر از محلول سالین ۰/۹ درصد که حاوی ۱۲/۵ میکروگرم نوروتوکسین 6-OHDA و اسید آسکوربیک ۰/۲ درصد بود، تزریق شد. تزریق با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه انجام شد و سوزن تزریق ۵ الی ۱۰ دقیقه بعد از پایان تزریق، از محل تزریق خارج شد. دو هفته بعد، موشها تحت ارزیابی رفتاری قرار گرفته و تعداد چرخشهای کاملی که در اثر تزریق

1. Cyclosporine A(Sandimmun Neoral)

داروی آپومورفین ۲/۵mg/kg به آنها القا شده بود در طول یک ساعت شمارش و ثبت شد تا در نهایت مورد استفاده آماری قرار گیرد [۲۷].

تثبیت و آماده‌سازی ناحیه پیوند برای انجام ارزیابیهای بافتی و ایمونوهیستوشیمی

۱۵ روز بعد از عمل پیوند سلولها، حیوانات به‌وسیله تزریق مخلوط کتامین و گزیلازین بیهوش شده و پس از برداشتن پوست ناحیه قدامی و برش جدار قدامی قفسه‌سینه آنها، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین حاوی هپارین ۰/۱ درصد و پس از آن ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول پارافرمالدیید ۴ درصد (حل شده در PBS) به شکل داخل قلبی (بطن چپ) به موشها تزریق شد. پس از تزریق مایع تثبیت کننده به سیستم عروقی، سریعاً مغز موشها از جمجمه خارج شده و به مدت ۳۴ ساعت در محلول تثبیت کننده فوق‌الذکر برای انجام مرحله ثبوت ثانویه[1] منتقل شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت مغز موشها را در محلول ساکارز ۲۰ درصد (حل شده در PBS) قرار داده و پس از قالب گرفتن نمونه‌ها در چسب مخصوص دستگاه فریز میکروتوم، به کمک دستگاه از مغز موشها برشهای ۲۰ تا ۳۰ میکرومتری تهیه نموده و برای انجام بررسیهای ایمونوهیستوشیمی و رنگ‌آمیزیهای بافتی استفاده شد (گاهی بلافاصله پس از خارج ساختن مغز، آن را مستقیماً در داخل چسب مخصوص قرار داده و با استفاده از دمای نیتروژن مایع قالب‌گیری شد). بعضی از برشها بعد از انتقال روی اسلاید، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده در مراحل بعدی نگهداری شدند.

برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای تهیه برشهای نازک و مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، ابتدا با استفاده از محلول پارافرمالدیید ۴ درصد و گلوتارآلدیید ۰/۵ درصد با روشی مشابه روش مذکور در قبل، به طریقه پرفیوژن مغز موشها تثبیت شد. پس از خارج ساختن مغز از جمجمه، بلافاصله با استفاده از پنسهای ظریف و تیغ بیستوری کاملاً تیز، بخشهای قبل و بعد از ناحیه پیوند را (با زدن برشهای کرونال) برای آشکار ساختن محل پیوند جدا نموده و سپس از محل پیوند سلولها ۴ الی ۵ نمونه برداشته شد. لازم به ذکر است که معمولاً رنگ محل پیوند سلولها قهوه‌ای کمرنگ به نظر می‌رسید. نمونه‌هایی که اندازه هر کدام از آنها حدود یک میلی‌متر بود به گلوتار آلدیید ۲/۵ درصد تهیه شده با بافر فسفات منتقل شدند و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس از محلول یک درصد تتراکسید اسمیوم به مدت ۲ ساعت برای ثبوت ثانویه نمونه‌ها استفاده شد و در نهایت مراحل لازم برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن انجام شد.

تشخیص ایمونوهیستوشیمی سلولهای نشاندار شده با Brdu بعد از پیوند به مغز

برای تشخیص ایمونوهیستوشیمی هسته سلولهای نشاندار شده با Brdu، ابتدا برای در معرض قرار دادن آنتی‌ژن، DNA سلولها دناتوره شد. بدین منظور برشهای مغزی ۳۰ میکرومتری ابتدا در محلول فورمامید ۵۰ درصد (تهیه شده در بافر ۲×SS[2]) و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. این بافر ترکیبی از کلرید سدیم ۰/۳M و سیترات سدیم ۰/۰۳M است. پس از آن برشها به مدت ۳۰ دقیقه به محلول ۲N اسید کلریدریک در دمای ۳۷ درجه منتقل شدند. در نهایت به‌منظور خنثی کردن اسید کلریدریک برشها به مدت ده دقیقه در بافر بورات ۰/۱M (pH=۸/۵) گذاشته شدند. سپس برشها را با محلول پراکسید هیدروژن ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تیمار کرده و پس از شستشو با PBS و انکوباسیون برشها در بافر بلاک‌کننده (محلول ۱۰ درصد سرم بز) برشها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه در معرض نشانگر کونژوگه به پراکسیداز Brdu (Chemicon co.) ۱:۱۰۰ قرار گرفتند. اسلایدها ۱۰×۲ دقیقه با PBS شسته شده و به مدت نیم ساعت با محلول سوبسترای DAB (محلول DAB ۰/۱ درصد + ۰/۰۲ درصد H_2O_2 در PBS یا TBS[3]) در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از ۲ بار شستشو برشها با آب مقطر، آب‌گیری با اتانولهای ۹۰، ۸۰ و ۷۰ هر کدام به مدت ۲ دقیقه و اتانول مطلق [Merck] و انکوباسیون در زایلن [Merck] هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، روی

1. Post fixation
2. Post fixation
3. Tris-buffered saline

برشها چسبانده شد انتالن [Merck] ریخته و به آرامی بر لام، لامل چسبانده شد. لامهای آماده شده با میکروسکوپ نوری مطالعه و عکس‌برداری قرار شدند.

ارزیابی رفتاری

بررسی رفتار چرخشی موشها توسط داروی آپومورفین هیدروکلراید (Sigma) با غلظت ۲/۵ mg/kg، دو هفته بعد از تزریق نوروتوکسین و ۸ هفته بعد از پیوند سلولها انجام شد. برای اندازه‌گیری تعداد دفعات چرخش از یک روش استاندارد (۳) استفاده شد. به این ترتیب که موشها ۱۰ دقیقه قبل از شروع ارزیابی برای سازگاری پیدا کردن با محفظه استوانه‌ای به داخل محفظه منتقل شدند. قطر استوانه ۳۳ سانتی‌متر، ارتفاع آن ۳۵ سانتی‌متر و سطح داخلی آن مدرج بود. چند دقیقه بعد از تزریق دارو، موشها در برای عکس سمت ضایعه شروع به چرخش کرده و تعداد چرخشهای کامل (۳۶۰ درجه) آنها به مدت یک ساعت توسط شمارش‌گر دستی شمارش شدند. از آزمونهای ویلکاکسون (Wilcoxon) و گروسکال والیسی (Kruskal wallis) برای مقایسه چرخشهای قبل و بعد از پیوند سلولها استفاده شد.

یافته‌ها

ارزیابی سلولی

در این تحقیق قبل از عمل پیوند سلولها، از برای نشاندار شدن آنها استفاده شد تا بعد از عمل پیوند هم قابل ردیابی باشند. پس از گذشت ۱۴ ساعت از اضافه کردن Brdu به محیط کشت سلولها، ارزیابی ایمونوسیتوشیمی به روش مستقیم با استفاده از نشانگر بر علیه Brdu که کونژوگه به HRP بود به‌عمل آمد. هسته سلولهایی که با Brdu نشاندار شده بودند بعد از اعمال سوبسترای DAB به آنها، قهوه‌ای رنگ شده و بسته به اینکه هسته سلولها در چه مرحله‌ای از تقسیم واقع شده باشد الگوی خاصی از رنگ‌آمیزی را از خود نشان دادند؛ به‌طوری که سلولها در مراحل مختلف تقسیم میتوز مشاهده شدند (شکل ۱، A). به این ترتیب این سلولها نشاندار شده و برای استفاده در ادامه پژوهش تکثیر شدند.

ارزیابی بافتی

عمل پیوند سلولها روی موشهای پارکینسونی انجام گرفت که به‌وسیله داروی سیکلوسپورین A سیستم ایمنی آنها سرکوب شده بود. در روز پانزدهم بعد از پیوند، در گروههای اول و دوم، به‌منظور بررسی تغییرات ساختاری سلولهای پیوند شده به جسم مخطط موشهای صحرایی پارکینسونی، از میکروسکوپهای نوری و الکترونی استفاده شد. به این منظور از رنگ‌آمیزی عمومی H&E و رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله که رنگ‌آمیزی اختصاصی سولهای عصبی است برای تأیید ماهیت سلولهای عصبی تمایز یافته از سلولهای پیوند شده، استفاده شد. در ارتباط با ارزیابیهای انجام شده به‌وسیله میکروسکوپ نوری، برشهای بافتی مورد مطالعه از نوع برشهای انجمادی بود. از آنجایی که در هنگام تهیه برشهای انجمادی، هم تهیه برشها و هم نگهداری آنها با مشکلاتی همراه است. انتخاب ناحیه‌ای از مغز برای جمع‌آوری برشها به‌گونه‌ای که این برشها حاوی سلولهای پیوند شده باشند، ضروری به نظر رسید. به این منظور بعد از عمل تثبیت و خارج ساختن مغز از جمجمه، ناحیه قرارگیری کانول را با مقدار بسیار کمی رنگ کرزیل ویوله (قدرت نفوذپذیری این رنگ بسیار زیاد بوده و بایستی از تزریق زیاد و عمقی آن خودداری شود) مشخص کرده تا بعد از منجمد کردن مغز، طی فرآیند برش‌گیری تشخیص این ناحیه راحت‌تر باشد. بعد از انجام این مرحله، در هنگام برش‌گیری، برشها را از حدود یک میلی‌متر قبل از محل قراگیری رنگ تا یک میلی‌لیتر بعد از محل قرارگیری به شکل برشهای سری تهیه و جمع‌آوری نموده و برای انجام رنگ‌آمیزیهای بافتی و ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. در رنگ‌آمیزیهای H&E و رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله که مخصوص اجسام نیسل است، سلولهای پیوند شده در ناحیه‌ای واقع می‌شوند که نسبت به سلولهای میزبان یا سلولهای جسم مخطط در اطراف، از تراکم سلولی بالایی برخوردار هستند. میزان رنگ‌پذیری بالای سلولهای پیوند شده در رنگ‌آمیزی مخصوص اجسام نیسل، بیانگر این است که سلولهای پیوند شده ویژگی عصبی پیدا کرده‌اند (شکل B و ۲A). اگرچه ناحیه جداکننده سلولهای پیوند شده و بافت میزبان از وضوح بالایی برخوردار است اما نشانه‌ای از تشکیل بافت

گلیوزی که سلولهای پیوند شده را از بافت میزبان جداکند دیده نشد و به نظر می‌رسید که سلولهای پیوند شده به سلولهای عصبی تمایز یافته و با سلولهای بافت میزبان سازگاری پیدا کرده‌اند (شکل B و ۲A). همچنین به روش مشابهی نمونه‌های لازم برای آماده‌سازی برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن تهیه شدند. به این ترتیب که بعد از مشخص کردن ناحیه تزریق با استفاده از رنگ، به کمک یک تیغ جراحی تیز و برش دادن قبل و بعد از ناحیه رنگ شده، از هر مغز ۴ الی ۵ نمونه حدوداً نیم میلی‌متری از محل پیوند برداشته شد. لازم به ذکر است که معمولاً رنگ ناحیه قرارگیری سلولهای پیوند شده با نواحی اطراف متفاوت بوده، ضمن اینکه نواحی مختلفی از مغز موش مانند جسم مخطط، جسم پینه‌ای و گاهی بطنهای طرفی مغز قابل تشخیص هستند، که از این نشانه‌ها برای یافتن بهتر محل پیوند استفاده شد. همچنین از آنجایی که نمونه‌های مورد مطالعه در میکروسکوپ الکترونی بسیار کوچک بوده و این احتمال می‌رفت که به دلایل مختلف نمونه برداشته شده مناسب نباشند؛ از هر ناحیه ۴ الی ۵ نمونه برداشته شده و مراحل لازم برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن روی آن انجام گرفت. مشاهدات انجام شده نشان داد که محل پیوند سلولها از تراکم سلولی بالایی برخوردار بوده و در بعضی از نمونه‌ها که احتمالاً از حاشیه محل پیوند تهیه شده بود، اختلاف بین تراکم سلولی سلولهای‌دهنده و بافت میزبان کاملاً مشخص بود. از نظر فراساختاری اکثر سلولها سلولها ویژگی سلولهای نسبتاً فعال را داشتند، به‌طوری که هسته آنها تقریباً کروی بوده و بیشترین بخش آن یوکروماتین بود. سیتوپلاسم سلولها حاوی پلی‌زومهای فراوان، یا شبکه اندوپلاسمیک خشن نسبتاً وسیع و گاهی میتوکندری بودند (شکل ۳A). همچنین در حدفاصل سلولها در بخشهای مختلف ناحیه پیوند، گاهی سلولهایی شبیه به سلولهای الیگودندروسیت مشاهده شد. در اطراف این سلولها، مقاطع عرضی از رشته‌های عصبی دیده شد که به‌وسیله غلاف میلین در برگرفته شده بودند (شکل ۳B). این سلولها دارای هسته نسبتاً کوچکی با دو بخش یوکروماتین و هتروکروماتین بودند. نتایج ارزیابیهای بافتی در دو گروه مذکور از نظر کیفی با هم مشابه بود با این تفاوت که در مقاطع بررسی شده سلولهایی با مشخصات احتمالی الیگودندروستی فقط در گروه دوم یعنی گروهی که سلولهای درمان شده با اسید رتینوییک به آنها پیوند زده شده بود مشاهده شد.

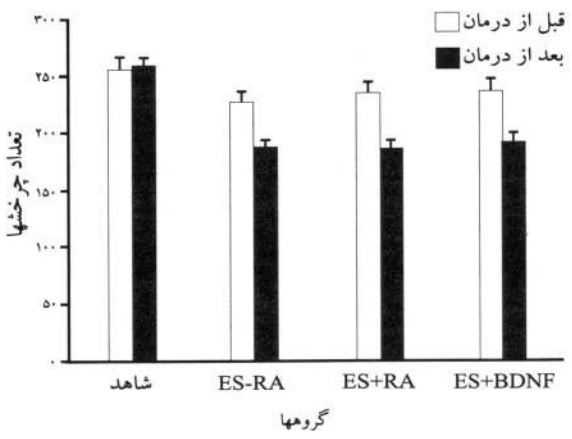
در این پژوهش ارزیابی ایمونوهیستوشیمی برای ردیابی سلولهای پیوند شده و بررسی سرنوشت آنها از نظر تمایز به سلولهای دوپامینرژیک در گروههای اول و دوم انجام گرفت. به این منظور از نشانگر ضدتیروزین هیدروکسیلاز استفاده شد. تیروزین هیدروکسیلاز آنزیمی است که برای سنتز دوپامین در سلولهای دوپامینرژیک ضروری بوده و یکی از شاخصهای مهم ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص سلولهای دوپامینرژیک است. در تجربی واکنش سلولهای پیوند شده نسبت به نشانگر مذکور بالا بوده اما به‌دلیل تراکم بالای سلولی تخمین درصد سلولهایی دوپامینرژیک مثبت مشکل بود (شکل ۴A). عدم رسوب رنگ در شاهد که از آنتی‌بادی اولیه استفاده نشده‌بود نشان‌دهنده صحت انجام واکنش ایمونوهیستوشیمی بود (شکل ۴B).

در روز پنجم بررسی، ایمونوهیستوشیمی به روش مستقیم با استفاده از نشانگر ضد Brdu برای ردیابی سلولهای پیوند شده انجام شد که واکنش هسته بعضی از سلولها نسبت به این نشانگر مثبت بود. با افزودن سوبسترای DAB، آنزیم HRP کونژوگه شده به آنتی‌بادی ثانویه DAB آن را تبدیل به محصولی می‌کند که رنگ آن قهوه‌ای است. بنابراین پس از انجام ایمونوهیستوشیمی، نقاط قهوه‌ای در سلول نشان‌دهنده محل استقرار بروموداوکسی یوریدین در درون سلول (هسته سلول) است (شکل ۱B). در همین روز در گروهی که سلولهای درمان نشده با اسید رتینوییک را دریافت کرده بودند، واکنش تعدادی از سلولها در محل پیوند، نسبت به ایمونوهیستوشیمی به روش غیرمستقیم برای ردیابی آنتی‌ژن SSEA1 که یکی از آنتی‌ژنهای موجود روی غشای سلولهای بنیادی رویانی است، مثبت بود. نظر به اینکه آنتی‌ژن مذکور در غشای سلولهای بنیادی رویانی موش واقع می‌شود مشاهده نقاط قهوه‌ای رنگ در غشای بعضی از سلولها (شکل ۵A) در ناحیه پیوند، بیانگر واکنش مثبت این سلولها به آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن مذکور است. تمامی مراحل مذکور در مورد نمونه‌های شاهد منفی هم به انجام رسید و نتایج

آنها منفی بود به این معنی که هیچ‌گونه رسوب رنگی که نشانه مثبت بودن واکنش ایمونوهیستوشیمی باشد دیده نشد، وجود یک پس زمینه کمرنگ در شاهد منفی نشان‌دهنده این بود که پراکسیداز سلولی به‌خوبی مهار نشده است (شکل 5B).

ارزیابی رفتاری

در این پژوهش به‌منظور ارزیابی رفتاری موشهای پارکینسونی پیوند شده با سلولهای بنیادی رویانی، تعداد چرخشهای القا شده به کمک آپومورفین در حیوانات ضایعه دیده با نوروتوکسین 6-OHDA، طی مدت زمان ۶۰ دقیقه تحت شمارش قرار گرفت. تعداد چرخشهای ثبت شده در گروههای کنترل و آزمایش قبل از عمل و ۸ هفته بعد از عمل به‌صورت آماری و با استفاده از آزمونهای ویلکاکسون و کروسکال والیس بررسی و مقایسه شد. در مقایسه بین گروههای مختلف از نظر تعداد چرخشهای القا شده در مرحله قبل از عمل، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج بررسیهای آماری انجام شده نشان داد که در هفته هشتم بعد از عمل تعداد چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین در هر سه گروه تجربی نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنی‌داری ($p<0.05$) کاهش می‌یابد. کاهش تعداد چرخشها در گروهی از موشها که سلولهای حامل ژن را دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود اما نسبت به سایر گروههای تجربی، اگرچه وجود داشت اما معنی‌دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱. ارزیابی رفتار موشهای پارکینسونی قبل و بعد از عمل پیوند سلولهای بنیادی رویانی.

با توجه به نمودار یک در گروه کنترل تعداد چرخشهای ثبت شده قبل و بعد از عمل پیوند تقریباً مشابه بوده و اختلاف آنها از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>0.05$). در گروه ES-RA، سلولها به شکل درمان نشده با رتینوییک اسید به جسم مخطط موشهای پارکینسونی پیوند شدند و تفاوت چرخشهای ثبت شده قبل و بعد از عمل پیوند سلولها از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$). در گروه ES+RA، سلولها به شکل درمان شده با رتینوییک اسید به جسم مخطط موشهای پارکینسونی پیوند شدند و تفاوت چرخشهای ثبت شده قبل و بعد از عمل پیوند سلولها از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$). در گروه ES+BDNF، در این گروه سلولهای بنیادی رویانی بعد از ترانسفکشن پایدار با ژن BDNF به شکل درمان نشده با رتینوییک اسید به جسم مخطط موشهای پارکینسونی پیوند شدند تفاوت چرخشهای ثبت شده قبل و بعد از عمل پیوند سلولها از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$).

بحث

پیوند سلولهای بنیادی رویانی به مغز موشهای پارکینسونی

نتایج ارزیابیهای بافتی انجام شده به‌وسیله میکروسکوپهای نوری و الکترونی، ارزیابیهای ایمونوهیستوشیمی و بررسیهای رفتاری انجام شده در این پژوهش نشان داد که نورونهای شبه دوپامینرژیکی قادرند در محل پیوند سلولهای بنیادی رویانی درمان شده و درمان نشده با اسید رتینوییک تکوین پیدا کرده و احتمالاً از طریق عصب‌دهی مجدد بافت میزبان به بهبود رفتاری موشهای پارکینسونی کمک کنند. نتایج مشاهدات انجام شده با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل ویوله که ویژه سلولهای عصبی بوده و برای تشخیص اجسام نیسل به‌کار می‌رود بیانگر این است که سلولهای پیوند شده قادرند به سلولهای عصبی تمایز پیدا کنند. این سلولها در محل پیوند از تراکم بالایی برخوردار بوده و محدوده آنها با بافت میزبان تا روز پانزدهم که این ارزیابی صورت گرفت، فاقد هر گونه بافت گلیوز جداکننده بوده و به نظر می‌رسید که سلولها با سلولهای بافت میزبان سازگاری پیدا کرده و در ارتباط عملی واقع شده‌اند. نتایج

مشابهی توسط ترینسی Terrence و همکاران گزارش شده است [۲۱]. محققین مذکور با پیوند دودمانهای مختلف سلولهای بنیادی رویانی درمان شده و درمان نشده با اسید رتینوییک به مغز موشهای پارکینسونی نشان دادند که در محل پیوند این سلولها ناحیه متراکمی از سلولهای عصبی در رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله تشکیل شده و ارزیابیهای ایمونوهیستوشیمی به‌عمل آمده نیز نشان داد که درصد بالایی از سلولهای عصبی در محل پیوند از نوع دوپامینرژیک هستند. این محققین هیچ‌گونه ارزیابی رفتاری برای تشخیص اینکه سلولهای دوپامینرژیک تکوین یافته به بهبود رفتاری موشها هم کمک می‌کنند یا خیر، انجام ندادند. آنها سلولها را با دو غلظت مختلف ۱×۱۰^{۵} و ۳×۱۰^{۵} سلول به جسم مخطط موشهای پارکینسونی پیوند زدند و اظهار داشتند که در هر دو گروه به‌طور متوسط در هر کدام از نواحی پیوند حدود ۱۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ سلول با ویژگی سلولهای دوپامینرژیک تشکیل شده و آکسون بعضی از سلولها، در هر دو گروه به داخل بخش خاکستری جسم مخطط و به عبارت دیگر بافت میزبان کشیده می‌شوند. این نحوه از ارتباط مشابه عصب‌گیری دوپامینرژیک جسم مخطط در حالت طبیعی است [۲۱]. همچنین این آرایش به‌خصوص از ارتباط عصبی در مورد نورونهای دوپامینرژیک حاصل از پیوند بافت مزانسفالیک جنینی هم دیده شده است. در حالی که نورونهای غیردوپامینرژیک در محل پیوند رفتار مشابهی از خود نشان نداده‌اند [۲۱]. نتایج ارزیابیهای ایمونوهیستوشیمی به‌عمل آمده در این پژوهش نشان داد که در هر دو گروه در روز پانزدهم سلولهای شبیه دوپامینرژیک در محل پیوند مشاهده شده که این علاوه بر تأیید نتایج ترنسی (Terrence) و همکاران، نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط بی‌جورکلند (Bjorklund) و همکاران انجام شده است را نیز تأیید می‌کند [۲۰]. این گروه از محققین، از سلولهای بنیادی رویانی EBهایی را تهیه نموده و به مدت ۴ روز در محیط کشت فاقد اسید رتینوییک کشت دادند سپس این توده‌های سلولی را تریپسینه کرده و در مقادیر ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ سلول به جسم مخطط موشهای صحرایی پارکینسونی شده پیوند زدند. آنها مشاهده کردند که درصد بالایی از این سلولها به سلولهای دوپامینرژیک مزانسفالیک تمایز پیدا کرده و ارزیابیهای رفتاری هم، عملکردی بودن این سلولها را تأیید کرد. همچنین مشاهدات این محققین نشان داد که سلولهای بنیادی رویانی به تدریج بیان آنتی‌ژنهای اختصاصی شبیه SSEA-1 را در محل پیوند از دست داده و بیان آنتی‌ژنهای اختصاصی دوپامینرژیک را کسب می‌کنند [۲۰]. در این پژوهش نیز در روز پنجم، در گروه اول مطالعه که شرایط آن مشابه کار محققین مذکور بود از نشانگر ضد SSEA-1 استفاده شد و نتایج آن نشان داد که بعضی از سلولها در محل پیوند، این آنتی‌ژن را بیان می‌کنند.

در این پژوهش از Brdu برای نشاندار کردن سلولها استفاده شد. این ماده مشابه تیمیدین بوده و بعد از اضافه شدن آن به محیط کشت سلولها، همانند تیمیدین هنگام تکثیر سلولها و ساخت و ساز DNA وارد ساختمان کروموزومها شده و ردیابی آن با کمک نشانگر بر علیه بروموددئوکسی یوریدین و انجام ایمونوهسیتوشیمی امکان‌پذیر است. به این منظور Brdu در فاز تکثیری سلولها (هنگامی که حدوداً ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک به‌وسیله سلولهای در حال تقسیم پر شده بود) به محیط کشت سلولها اضافه شد. پس از گذشت ۱۴ ساعت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی به روش مستقیم با استفاده از نشانگر بر علیه Brdu که کونژوگه به HRP بود انجام شد. از آنجایی که سلولهای بنیادی رویانی از قدرت تکثیر بالایی برخوردار هستند طبیعی که در ارزیابی *in vitro* در فاز تکثیری، سلولها در مراحل مختلف تقسیم میتوز مشاهده شوند و بنابراین الگوی خاصی از رنگ‌آمیزی را از خود نشان دهند. همچنین در ارزیابی *in vivo* در نمونه‌ای که در روز پنجم به‌منظور ردیابی بیان آنتی‌ژن SSEA1 استفاده شد؛ نتیجه بررسی ایمونوسیتوشیمی برای ردیابی سلولها به کمک نشانگر ضد Brdu مثبت بود. بنابراین این نتیجه نشان داد که سلولهای مورد بررسی در محل پیوند، همان سلولهای بنیادی رویانی نشاندار شده‌ای است که به مغز موشها پیوند شده بود.

بی‌جورکلند (Bjorklund) و همکاران دوز پایینی از سلولهای بنیادی رویانی را برای پیوند استفاده کردند. توجیه آنها برای این انتخاب، نتایج پژوهشهایی بود که نشان می‌داد پیوند تعداد زیادی سلول بنیادی رویانی به یک ناحیه از بدن منجر به تشکیل

سلولهای مشتق از هر سه لایه جنینی می‌شود. فرضیه آنها این بود که کاهش تعداد سیگنالهای سلولی که به‌وسیله لایه‌های سه‌گانه جنین تولید می‌شود و همچنین کاهش میزان ارتباطات سلولی منجر به ایجاد شرایطی می‌شود که تحت این شرایط تمایز نورونی تسهیل می‌شود. علت عدم انتخاب دوز پایین در این مطالعه این بود که معمولاً ژن درمانی به‌صورت پیوند سلولهای حامل ژن - که بخشی از این پژوهش نیز بود - با دوزی بسیار بالاتر از دوز مذکور صورت می‌گیرد [۲۸ و ۲۹]. اخیراً نیز تروپپ (Tropepe) و همکاران نشان داده‌اند که در استفاده از غلظت پایین سلولهای بنیادی رویانی، نسبت به تراکم سلولی بالا، باعث تولید نورون بیشتری می‌شود [۳۰]. اگرچه بی‌جورکلند (Bjorklund) و همکاران توانستند با استفاده از دوز پایین سلولی نتایج بافتی و رفتاری خوبی را کسب کنند. اما از تعداد ۲۵ موش صحرایی که سلولهای بنیادی رویانی را به‌صورت پیوند دریافت کردند، ۵ سر آنها قبل از اینکه آخرین ارزیابی رفتاری را کامل کنند تلف شدند که ترنسی (Terrence) و همکاران، اگرچه به غیریکنواخت بودن تجمعات سلولی عصبی در محل پیوند سلولهای بنیادی رویانی اشاره کردند اما به تشکیل تومور و اینکه احتمالاً بعضی از موشها در اثر تشکیل تومور تلف شده باشند اشاره‌ای نکردند. در تحقیقات این گروه تعداد تقریبی سلولهای دوپامینرژیک در هر دو گروه مورد مطالعه، یکسان بود (حدود ۱۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ سلول بود). این در حالی است که نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ منتشر شده است [۲۱] نیز نشان داده است که پیوند حدود ۱۰۰۰۰ سلول دو پامینرژیک تمایز یافته از سلولهای بنیادی رویانی به روش آزمایشگاهی قادر است منجر به بهبود رفتاری موشهای پارکینسونی شده که این اثر از هفته دوم به بعد با کاهش چرخشهای رفتاری القا شده توسط آپومورفین قابل تشخیص است. در پژوهش حاضر نیز تعداد سلولهای پیوند شده در هر سه گروه حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول بود از آنجایی که نتایج ترنسی (Terrence) و همکاران تشکیل حدود ۱۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ سلول دوپامینرژیک را در محل پیوند تعداد ۱۰۰۰۰۰ از سلولهای بنیادی رویانی نشان می‌دهد، نتایج پژوهش حاضر با تحقیقات قبلی نه تنها منافاتی ندارد بلکه به گونه‌ای به تکمیل نتایج آنها کمک می‌کند. در ارتباط با تشکیل تومور که یکی از مشکلات موجود بر سر راه به‌کارگیری سلولهای بنیادی رویانی است در تحقیق حاضر حدود ۱۱ درصد از موشهایی که پیوند سلولی دریافت کرده بودند تلف شدند. به‌طوری که دو سر از موشها در گروههای اول و دوم به ترتیب در روزهای ۱۹ و ۳۰ بعد از پیوند سلولها مردند و در یکی از آنها (گروه دوم، روز ۳۰) قبل از مرگ حرکات پیچشی خاصی در سمت مخالف ضایعه حیوان مشاهده شد اما هیچ‌گونه بررسی بافتی به‌منظور تشخیص تومور صورت نگرفت.

یکی دیگر از نتایج حایز اهمیت این پژوهش، مشاهده سلولهایی با ویژگی الیگودندروسیتی در محل پیوند سلولها در گروه درمان شده با اسید رتینوییک بود. اگرچه تعداد این سلولها بسیار کم بود اما وجود این سلولها می‌تواند نشانگر این باشد که سلولهای بنیادی رویانی قادرند از طریق تمایز به سلولهای الیگودندروسیت و میلین‌سازی برای ترمیم بافت عصبی آسیب دیده مورد استفاده قرار گیرند. این نتیجه گزارش جان (John) و همکاران را تأیید می‌کند [۳۱] که با استفاده از پروتکل $^{+}$EB4$^{=}$/4هایی را تهیه نموده و بعد از مختصری تریپسینه کردن آنها را به مدل آزمایشگاهی ضایعات نخاعی در موشهای صحرایی پیوند زدند. ارزیابیهای به‌عمل آمده در هفته‌های دوم تا پنجم نشان داد که موشهای مذکور بهبود یافته و سلولهای پیوند شده به سلولهای مختلفی از جمله الیگودندروسیت، آستروسیت و نرون تمایز یافته‌اند. این سلولهای تمایز یافته قادرند به ناحیه‌ای حدود ۸ میلی‌متر خارج‌تر از محل ضایعه مهاجرت کنند. در همین ارتباط الیور (Oliver) و همکاران نیز سلولهای بنیادی رویانی را به روش آزمایشگاهی به سلولهای پیش‌ساز گلیال و سپس سلولهای گلیال تمایز دادند که حدود ۳۸ درصد آنها الیگودندروسیت بود [۳۲]، سپس سلولهای مذکور را به یک مدل آزمایشگاهی بیماری PMD[1] پیوند زدند. موشهای صحرایی که از بیماری مذکور رنج می‌برند همانند بیماری PMD در انسان، موتاسیونهایی را در یک ژن وابسته به کروموزوم X با خود حمل می‌کنند که این ژن PLP[2]

1. Pelizaeus-Merzbacher disease
2. Myelin proteolipid protein

راکد می‌کند. این محققین دو هفته بعد از عمل پیوند سلولها به طناب خلفی نخاع مشاهده کردند که الیگودندروسیتهای پیوند شده قادرند از طریق تشکیل غلافهای متعدد میلین در روند میلین‌سازی بافت میزبان شرکت کرده و حتی سلولهای مولد میلین در برای‌های عرضی و طولی به نواحی خارج از ناحیه پیوند هم کشیده می‌شوند [۳۱]. استینیس (Staines) و همکاران نیز سلولهای P19 را به مدت ۳ روز در محیط کشت حاوی اسید رتینوییک کشت داده و سپس به جسم مخطط پیوند زدند. آنها گزارش کردند که دو هفته بعد از پیوند سلولهای P19 به سلولهای الیگودندروسیتی تبدیل می‌شوند که قادرند تا فاصله یک میلی‌متری از محل پیوند رشته‌های عصبی میزبان را میلینه کنند [۳۳]. از آنجایی که در گروه دوم از سلولها قبل از پیوند با استفاده از اسید رتینوییک درمان شده بودند، و از طرف دیگر تأثیر اسید رتینوییک بر تمایز آزمایشگاهی سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای عصبی و گلیال از جمله الیگودندروسیت گزارش شده است، ممکن است علت مشاهده سلولهایی با ویژگی الیگودندروسیت در گروه دوم مربوط به تأثیر اسید رتینوییک باشد.

ارزیابیهای رفتاری این پژوهش شامل ثبت چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین قبل و ۸ هفته بعد از عمل پیوند سلولها بود. این دارو به شکل آگونیست دوپامین عمل کرده و قادر است همانند دوپامین به گیرنده‌های دوپامینی متصل شود. هنگام ایجاد مدل آزمایشگاهی پارکینسون به کمک نوروتوکسین 6-OHDA پایانه‌های آکسونی مسیر نیگرواستریاتال که مابین جسم سیاه و جسم مخطط برقرار هستند توسط رادیکال آزاد OH آسیب دیده و روند آزادسازی دوپامین مختل می‌شود در چنین شرایطی تعداد گیرنده‌های دوپامینی جسم مخطط به شکل جبرانی افزایش یافته و بنابراین آپومورفین تزریق شده به‌عنوان یک داروی آگونیست دوپامین، قادر است به گیرنده‌های افزایش یافته متصل شود و باعث افزایش واکنش جسم مخطط در سمت ضایعه و در نهایت چرخش حیوان به سمت عکس ضایعه شود [۳]. مکانیسمی که از طریق آن سلولهای بنیادی رویانی پیوند شده منجر به کاهش تعداد تعداد چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین می‌شوند دقیقاً مشخص نیست اما ممکن است که این سلولها تحت تأثیر فاکتورهای القایی موجود در جسم مخطط به سلولهای دوپامینرژیک تمایز پیدا کرده و به واسطه دوپامین ترشح شده از این سلولها بیان گیرنده‌های دوپامینی به تدریج کاهش پیدا کند[1] و بنابراین تعداد چرخشهای القا شده ناشی از تزریق آپومورفین نیز کاهش پیدا می‌کند این مکانیسم توسط Fumihiko و همکاران پیشنهاد شده است [۲۹]، این محققین با استفاده از یک روش پنج مرحله‌ای توانستند سلولهای بنیادی رویانی را به سلولهای دوپامینرژیک تمایز دهند، سپس با استفاده از روش RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی ماهیت دوپامینرژیک سلولهای مذکور را تأیید کردند و سلولها را با دو غلظت مختلف به مغز موشهای پارکینسونی پیوند زدند. این گروه نیز از آپومورفین برای ارزیابی رفتاری موشها استفاده کردند. در مطالعه آنها کاهش چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین در هفته‌های دوم تا دوازدهم ثبت شد مقایسه تعداد چرخشهای ثبت شده در هفته‌های مختلف با همدیگر و با قبل از عمل نشان داد که در هر دو گروه از هفته دوم بعد از عمل پیوند تعداد چرخشها به‌صورت معنی‌دار شروع به کاهش نموده و به تدریج تا هفته دوازدهم بر میزان کاهش چرخشهای القا شده افزوده می‌شود. کاهش چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین در گروهی که سلولهای بیشتری را دریافت کرده بود بیشتر بود. همچنین پارک (Park) و همکاران با انتقال cDNA کدکننده آنزیم TH به سلولهای بنیادی رویانی انسانی توانستند سلولهایی را مهندسی کنند که این سلولها قادر به ترشح L-Dopa بودند و پیوند آنها به مغز موشهای پارکینسونی باعث بهبود رفتاری موشها شد. این محققین نشان دادند که کاهش چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین از هفته دوم بعد از عمل مشاهده شده و تا هفته ششم بعد از عمل هم سلولها در محل پیوند زنده مانده و در واکنش ایمونوهیستوشیمی بیان آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز آنها مثبت است [۳۴]. در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که دودمان سلولی بنیادی رویانی CCE به هر دو شکل درمان شده و درمان نشده با اسید رتینوییک قادر است بعد از پیوند به جسم مخطط موشهای صحرایی پارکینسونی به سلولهای عصبی و به‌ویژه سلولهای دوپامینرژیک تبدیل شده،

1. Down regulation

به‌طوری که بعد از ۲ ماه از نظر رفتاری منجر به کاهش چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین می‌شود. در هر دو گروه بعد از گذشت دو هفته سلولهای پیوند شده دارای فرا ساختار سلولهای فعال بوده، اما سلولهایی با ویژگی الیگودندروسیت فقط در گروه درمان شده با اسید رتینوییک مشاهده شد و به‌دلیل اینکه شرایط سلولهای گروه سوم مشابه سلولهای گروه اول است نتایج بررسیهای بافتی و ایمونوهیستوشیمی می‌تواند به این گروه هم قابل تعیم باشد.

یکی دیگر از اهداف اصلی این پژوهش ارزیابی توانایی سلولهای بنیادی رویانی به‌عنوان سلولهای حامل ژن BDNF برای پیوند به مغز موشهای پارکینسونی و نیز ارزیابی توانایی ژن مذکور در کمک به بهبود موشهای پارکینسونی بود. پس از انجام آزمایشهای مکرر و استفاده از ژن GFP شرایط مناسبی برای ترانسفکشن سلولها تشخیص داده شد سپس سلولها با پلاسمید pcDNA3-hBDNF-v5 که حامل ژن BDNF بود با موفقیت ترانسفکت شدند (اطلاعات نشان داده نشده است) و پس از گرفتن کلونیهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک G418 و استخراج RNA از آنها، بیان ژن BDNF به‌وسیله پرایمری که کارآیی آن در پژوهشی که همزمان با پژوهش حاضر انجام شده بود [۳۵] و از طریق استفاده از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت به اثبات رسیده بود، تأیید شد (اطلاعات نشان داده نشده است). اگرچه پس از انتقال محصول PCR بر روی ژل باند مربوط به BDNF به وضوح مشاهده شد، اما هیچ‌گونه ارزیابی کمی به‌منظور تعیین میزان BDNF ترشح شده به‌وسیله سلولها انجام نگرفت. سلولهای ترانسفکت شده مراحل لازم را مشابه گروه اول پژوهش برای پیوند متحمل شده و سپس به مغز موشها پیوند زده شدند. از آنجایی که بررسیهای بافتی و ایمونوهیستوشیمی انجام شده در این پژوهش فقط جذبه کیفی داشت و از طرفی مراحل آماده‌سازی سلولهای گروه سوم برای پیوند مشابه گروه اول بود، با این تفاوت که سلولهای گروه سوم حامل ژن بودند، در این گروه از پژوهش فقط ارزیابی رفتاری صورت گرفت که نتایج آن نشان داد در این گروه نیز همانند دو گروه دیگر پژوهش، بهبود رفتاری در موشها حاصل می‌شود و اختلاف مابین این گروه و شاهد معنی‌دار است اما آنچه که قابل توجه است این است که اگرچه کاهش چرخشهای القایی توسط آپومورفین در این گروه بیشتر از سایر گروهها بود اما اختلاف بین این گروه با دو گروه دیگر معنی‌دار نبود.

نتایج مطالعه یوشی‌موتو (Yoshimoto) و همکاران نشان داد که پیوند آستروسیتهای ترانسفکت شده با ژن BDNF به مغز موشهای صحرایی پارکینسونی به بهبود علایم بیماری کمک می‌کند. آنها فرضیات مختلفی را برای توجیه نقش BDNF در مطالعه‌شان ارایه کردند. مطابق یکی از فرضیات، بهبودی حاصل شده می‌تواند مربوط به افزایش انتقال دوپامین از سلولهای دوپامینرژیک باقی مانده به جسم مخطط باشد که این افزایش انتقال نتیجه تأثیر BDNF مترشحه از آستروسیتها می‌باشد [۲۸]. نتایج چندین مطالعه انجام شده قبلی نیز این فرضیه را تأیید می‌کرد. یکی از این نتایج، مشاهدات مربوط به بیان گیرنده trKB در نورونهای دوپامینرژیک نیگرواستریاتال است [۳۷ و ۳۶]. این گیرنده تیروزین کیناز، گیرنده اختصاصی BDNF است [۲۸]. نتیجه قابل استناد دیگر برای اثبات فرضیه مذکور این است که بعد از تزریق BDNF به داخل جسم مخطط، این فاکتور رشد به طریقه رتروگرید به سلولهای دوپامینرژیک جسم سیاه منتقل می‌شود [۳۸]. با این وجود، گزارش شده است که تزریق BDNF به داخل جسم سیاه یا نواحی بالاتر از آن باعث افزایش میزان دوپامین موجود در جسم مخطط نمی‌شود [۳۹]، در گزارش دیگر BDNF می‌تواند از یک طرف باعث افزایش ترشح دوپامین و از طرف دیگر از طریق افزایش تمایل سلولها به برداشت دوپامین[a] باعث افزایش میزان استفاده از دوپامین شود، بدون اینکه بر میزان ثابت دوپامین موجود در جسم مخطط تأثیر بگذارد [۲۸]. همچنین گزارش شده است که BDNF باعث افزایش متابولیتهای دوپامین در in vivo می‌شود [۳۹]. یوشی‌موتو (Yoshimot) و همکاران همچنین بعد از بررسی فرضیات مذکور احتمال دادند که BDNF مترشحه از آستروسیتها ممکن است از طریق پایانه‌های آکسونی باقی مانده به شکل رتروگرید به نورونهای دوپامین جسم سیاه منتقل شده و از طریق مکانیسمهایی که تاکنون ماهیت آنها به خوبی مشخص نشده است باعث افزایش عملکرد نورونهای دوپامینی

a. High-afinity dopamine uptake

شود. نتایج مطالعه دیگری که به اثبات فرضیه آنها کمک می‌کرد نتایج مطالعه‌ای بود که مطابق آن تزریق BDNF به ناحیه مزانسفال موشهای صحرایی به‌طور طولانی مدت منجر به بهبود رفتار چرخشی موشها شده بود [۴۰]. در این پژوهش برای ایجاد مدل آزمایشگاهی پارکینسون از ۱۲/۵ میکروگرم نوروتوکسین استفاده شد که با استفاده از آن حدود ۷۷-۵۳ درصد از سلولهای دوپامینرژیک جسم سیاه از دست می‌رود [۴۱]. در حالی که دوز مورد استفاده در تحقیق یوشی‌موتو (Yoshimoto) و همکاران ۳/۵ میکروگرم بود. بنابراین میزان از دست رفتن سلولهای دوپامینرژیک در مطالعه آنها بسیار کمتر بوده و احتمالاً تأثیر BDNF به میزان بالاتری قابل اندازه‌گیری بوده است. توجه به این نکته ضروری است که در مطالعه آنها فقط چرخشهای رفتاری القا شده با استفاده از آمفتامین کاهش پیدا کرد و چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین کاهش پیدا نکرد که از این نظر نتایج آنها مشابه نتایج به‌دست آمده در این پژوهش است. تعداد سلولهای حامل ژن پیوند شده در این پژوهش مشابه پژوهش مذکور بود. مقایسه نتایج این پژوهش با پژوهش مذکور نشان می‌دهد که احتمالاً تأثیر BDNF بر روی بهبود نورونهای دوپامینرژیک به شکل in vivo در حدی نیست که چرخشهای القا شده به‌وسیله آپومورفین را کاهش دهد و بنابراین اثر آن با انجام ارزیابی رفتاری به کمک آپومورفین قابل اندازه‌گیری نیست. آنچه راجع به تأثیر BDNF گفته شد مفروض بر این است که سلولهای بنیادی رویانی ترانسفکت شده با ژن BDNF که در این پژوهش آماده شده و مورد استفاده قرار گرفتند قادر بوده‌اند هم در حالت in vitro و هم بعد از پیوند به مغز (in vivo) به مقدار کافی BDNF ترشح کنند. از آنجایی که هیچ‌گونه ارزیابی کمی قبل یا بعد از پیوند سلولهای حامل ژن به مغز انجام نگرفت نمی‌توان مطمئن بود که سلولهای حامل ژن آماده شده در این پژوهش حایز ویژگیهای مفروض فوق بوده‌اند. این احتمال که بعضی از سلولهای بنیادی رویانی به دلایل نامشخص بیان ترانس ژن را از دست بدهند وجود دارد و در حقیقت این مسئله یکی از مشکلات موجود در تهیه سلولهای حامل ژن پایدار از سلولهای بنیادی رویانی است [۴۲]. DNA یی که به روش میکرو اینجکشن یا ترانسفکشن (Transfection) به داخل سلولهای پستانداران منتقل می‌شود، معمولاً به گونه‌ای به ژنوم سلولهای میزبان وارد می‌شود که ژن در بعضی سلولها یا بافتهای ترانسفرم شده بیان می‌شود و در بعضی از سلولها یا بافتهای ترانسفرم شده بیان نمی‌شود (مدل موزاییک) [۴۲]. مشکل عدم بیان ژن یا سکوت ژنی (Gene silencing) در سلولهایی با ویژگی سلولهای بنیادی به شکل بارزتری دیده می‌شود [۴۲]. در ناحیه‌ای که این پدیده رخ می‌دهد DNA معمولاً به میزان بالایی متیله[1] شده و گاهی به‌کارگیری عواملی که منجر به دمتیلاسیون می‌شود باعث القای بیان ترانسژن در اقلیتی از سلولها می‌شود. با وجود این، درحال حاضر حدس بر این است که متیلاسیون یک پدیده ثانویه به غیرفعال شدن ژنهای ترانس ژن بوده و به جای اینکه منجر به شروع فرایند غیرفعال شدن ژنها شود، باعث حفظ آنها می‌شود [۴۲]. در راستای مطالعات انجام شده به‌منظور رفع مشکل مذکور، نتایج مطالعات نشان داده است که ترانس ژنهای محتوی اینترون (Intron) نسبت به ترانس ژنهای فاقد اینترون (Intronless) به میزان خیلی زیادی منجر به افزایش کارآیی بیان ترانس ژن در سلولها و حیوانات ترانس ژنیک می‌شود [۴۲]. بنابراین این احتمال وجود دارد که پدیده مذکور در سلولهای مورد استفاده در پژوهش حاضر نیز رخ داده و بر اثر یا آثار احتمالی BDNF در این تحقیق مؤثر بوده باشد.

نتایج بررسیهای مختلف بافتی، سلولی و مولکولی انجام شده در این پژوهش نشان داد که دودمان سلولی رویانی CCE دارای کارآیی لازم برای انجام تحقیقات درمانی، خصوصاً در زمینه بررسی پتانسیل درمانی سلولهای ES در درمان بیماریهای تخریبی سیستم عصبی از طریق روشهایی چون سلول درمانی وژن درمانی است.

تقدیر و تشکر

در این تحقیق از کمکها و مساعدتهای اساتید و دانشجویان محترم گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس و نیز جناب آقای دکتر مهرداد روغنی و سرکار خانم هاشمی بهره‌مند شدیم که بدین وسیله از ایشان قدردانی می‌شود.

1. Methylation

References

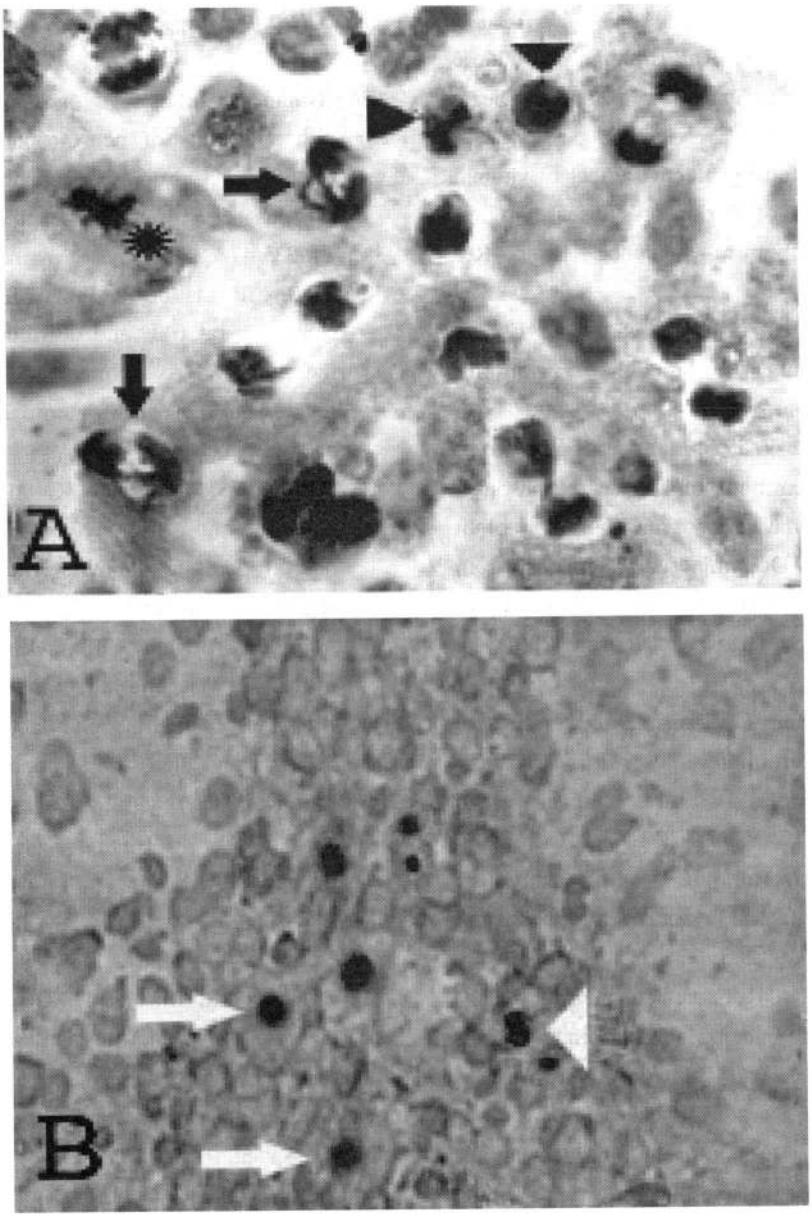
1. **Evans MJ, K, ufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
2. **Martin, GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl Acad Sci USA 1981; 78(12): 7634-8.
3. **Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP.** Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7844-8.
4. **Odorico JS, Kufman DS, Thomson JA,** Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 2001; 19: 193-204.
5. **Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Fogh J.** Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. Lab Inves 1984; 50: 147-62.
6. **Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD.** Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl. Acad Sci USA 1998; 95: 13726-31.
7. **Bain G, Kitchenes D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI.** Embyrionic stem cells expres neuronal properties in vitro. Dev Biol 1995; 163: 342-57.
8. **Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, dehay C, Savatier P, Samarut J.** In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci 1995; 108: 3181-8.
9. **Strubig C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM.** differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. Mech Dev 1995; 53: 275-87.
10. **Klug MG, Soonpa MH, Koh GY, Field LJ.** Genetically selected cardiomyocytes from differentiation embryonic stem cells from stable intracardiac graft. J. Clin Invest 1996; 98: 216-24.
11. **Soria B, Roche E, Berna G, Leon-quinto T, Reige JA, Martin F.** Insulin secreting cells derived form embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin induced diabetic mice. Diabetes 2000; 49: 157-62.
12. **Wiles S, MV, Keller G.** Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem(ES) cells in culture. Development 1991; 111: 259-67.
13. **Keller GM.** In vitro differentiation of embryonic stem cells. Curropin Cell Biol 1995; 7: 862-9.
14. **Kehat I, Kenyagin-karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Liven E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstin L.** Human embryonic can differentiation into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 2001; 108: 407-14.
15. **Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorechki KL, Tzukerman M.** Insulin production by human embryonic stem cells. Diabete 2001; 50: 1691-7.
16. **Schuldiner M, Einges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N.** Induced neuronal differentiation from human embryonic stem cells. Brain Res 2001; 913: 201-5.
17. **Arenas E.** Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. Brain Research Bulltin 2002; 57(6): 759-808.
18. **Joseph J, Eduardo T.** Parkinson's disease and movement disorders, fourth edition. Linppicott Williams&Wlikins. 2002, pp: 116-663.
19. **Studer L, Tabar V, Mckay RDG.** Transplantation of expanded mesencephalic precursor leads to recovery in parkinsonian rats. Nat Neurosci 1998, 1: 290-5.
20. **Bjorklund LM, Sanchez S, et al.** Embryonic cells develop in to functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 2344-9.
21. **Terrence D, Jonathan.** Blastula-Stage Stem cells Can Differentiate into Dopaminergic and serotonergic Neurons after Transplantation. Expm Neurol 1998; 149: 28-41.
22. **Christian A, Eva S.** Nestin-Specific Green Fluorescent Protein Expression in Embryonic Stem Cell Neural Precursor Cells Used for Transplantatin, Stem Cells 2001; 19: 419-24.
23. **Reubinoff B, Pavel I.** Neural progenitors from Human embryonic Stem Cells. Nature 2002; 19: 1134-40.
24. **Shin-Ichi N, Satomi N.** Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic. lineag Deve 1998; 125: 1747-57.
25. **Xian HQ, McNichols E, St Clair A, Gottlieb DI.** A subset of ES-cell-derived neural cells marked by gene

اپی‌تلیوم عصبی. پایان‌نامه دکتری، تهران ۱۳۸۳، دانشگاه تربیت مدرس، داشکده پزشکی

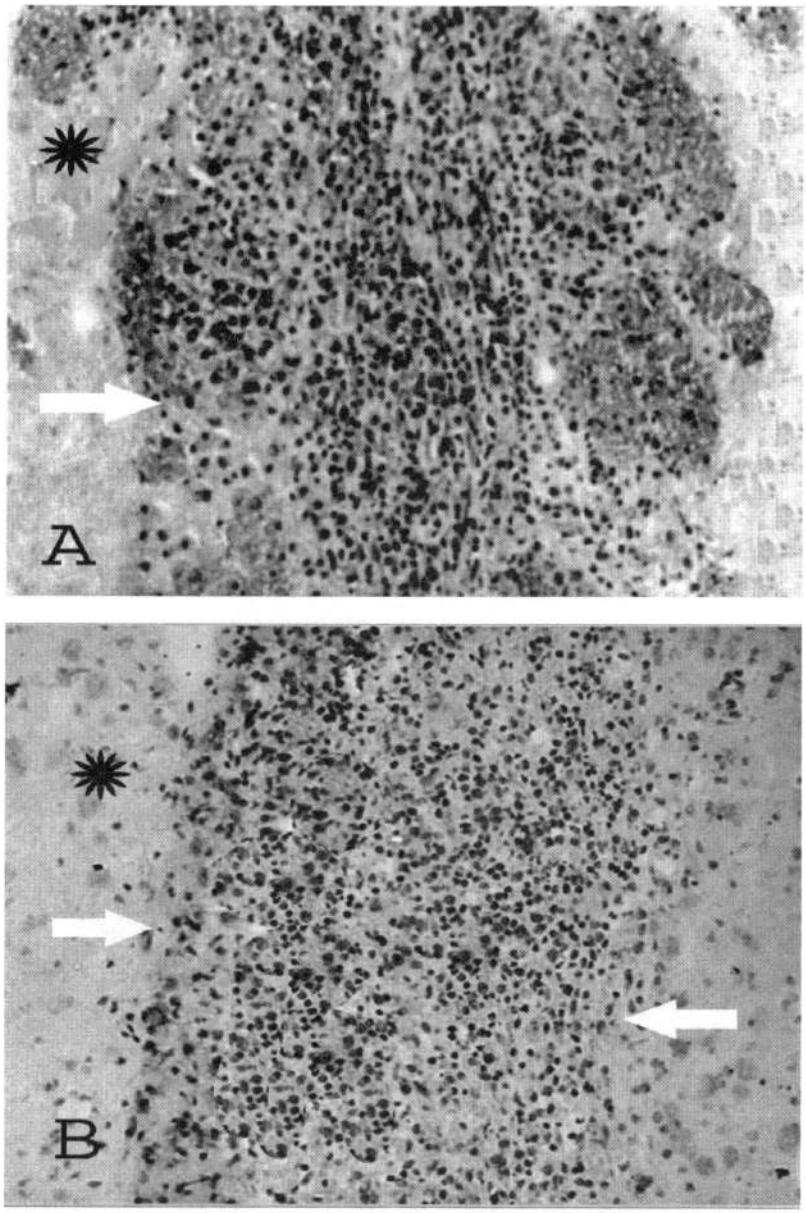
36. **Hyman C, Juhasz M, Jackson C.** Overlapping and distinct actions of neurotrophins BDNF, NT-3 and NT4/5 on Cultured dopaminergic and GABAergic neurons of ventral mesencephalon. J Neurosci 1994; 14: 335-47.
37. **Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H.** Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous syatem. J Neurosci 1992; 51: 513-32.
38. **Wiegand S, Anderson K, Alexander C.** Receptor binding and axonal transport of 125labelled neurotrophins in the basal ganglia and related brain regions. Mov Disord 1992; 7: 63.
39. **Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenson S, Miller G, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman CN.** Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 11347-51.
40. **Shults CW, Matthews RT, Altar CA, Hill LR, Langlais PJ.** A singlr ontramesencephalic injection of BDNF induces persistent rotational asymmetry in rats. Exp Neurol 1994; 125: 183-94.
41. **Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O.** Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. Cell Transplant 1996; 140: 1-13.
42. **McBurney MW, Yang X, Jardin K,** Enhanved transgene expression in embryonal carcinoma stem cells: transcription through introns and exons increases gene copy numbers and forestalls silencing. Stem Cell 2003; 288: 313-23.

targeting. Stem Cells 2003; 21(1): 41-9.
26. **Paxinos G. Watson C.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, CA, 1986.
27. **Mehrdad R, Gila B.** Neuroprotective effect of vitamin E on the early model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. Brain Res 2001; 892: 211-7.
28. **Yoshimoto Y.** Astrocytes retrivirally with BDNF elicit behavioral improvements in rat model of Parkinson;s disease. Brain Res 1995; 691: 25-36.
29. **Fumihiko N, Masahide Y.** Potential use of Embryonic Stem Cell for the Treatment of Mouse parkinsonian Models: Improved Behavior by Transplantation of In Vitro Differentiated Dopaminergic Neurons from Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2003, 21: 171-80.
30. **Tropepe V, Histoshi S, Sirard C.** Neuron, 2001; 30: 65-78.
31. **Jhon WM, Xiang-zhong L.** Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate, and promote recovery in injured rat spinal cord. Nature Medicine 1999; 5(12): 1410-2.
32. **Oliver B, Kimberly N, Randall D,** Embryonic stem cell derived glial percursors: a source of myelinating transplants. Scinenc 1999; 285: 754-6.
33. **Staines WA, Craig J.** Retinoic Acid treated P19 Embryonal carcinoma cells Differentiated into oligodendrocgtes capable of Myelination. Neuroscience 1996; 71(3): 845-53
34. **Park S, Eun Y, Gwang S.** Genetically modified human embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease. Neurosci Lett 2003; 353: 91-4.

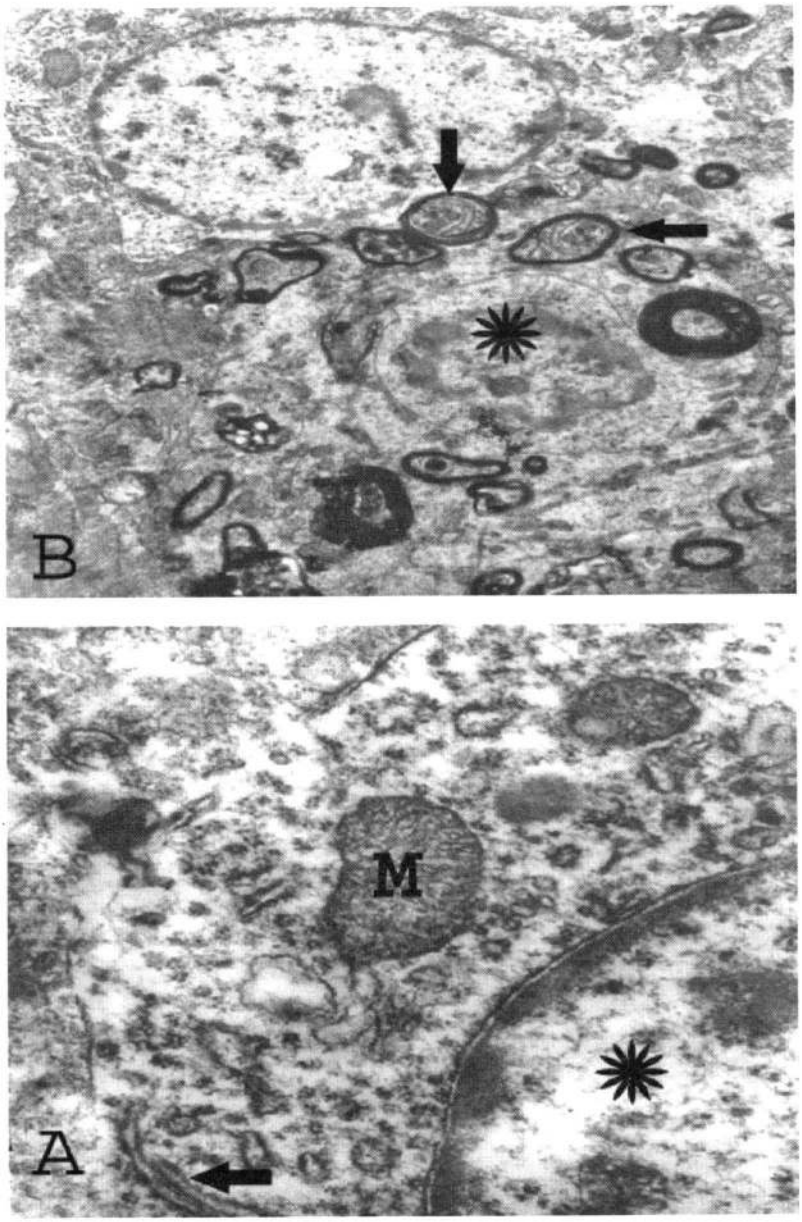
۳۵. **اسماعیلی فریبا.** ارزیابی القای بیان ژن فاکتورهای نوروتروفیک توسط دپرنیل در سلولهای بنیادی رویانی پس از تمایز این سلولها



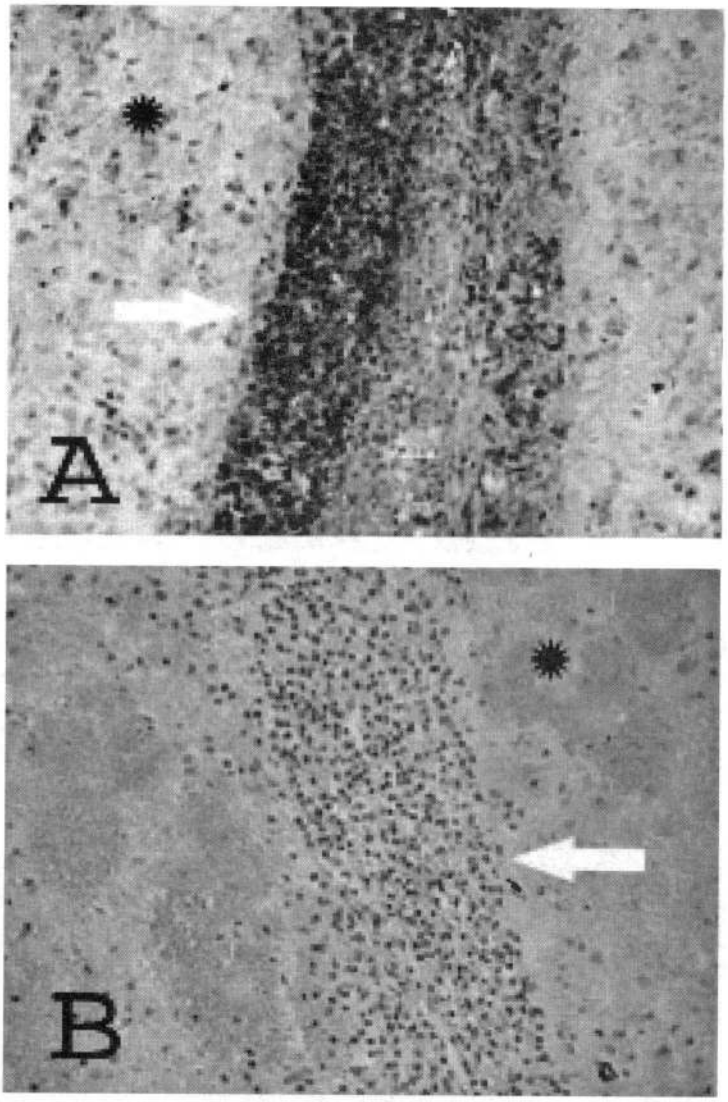
شکل ۱. تصاویر سلولهای نشاندار شده با بروموداوکسی یوریدین (Brdu). بزرگنمایی: ۲۰۰ ×، A: ۱۴ ساعت بعد از اضافه کردن بروموداوکسی یوریدین به محیط کشت سلولهای بنیادی رویانی، انجام ایمونوسیتوشیمی به روش مستقیم نشاندار شدن هسته سلولها را تأیید کرد. هسته سلولها در مراحل مختلف تقسیم میتوزی پروفاز (ستاره)، متافاز (پیکان) و آنافاز (نوک پیکان)، دیده می‌شوند. B: در ایمونوهیستوشیمی هسته بعضی از سلولها در ناحیه پیوند (پیکان و نوک پیکان) به آنتی‌بادی ضد بروموداوکسی یوریدین و کونژوگه به پراکسیداز واکنش نشان دادند نوک پیکان به سلولهایی اشاره می‌کند که احتمالاً نتیجه تقسیم میتوز می‌باشند.



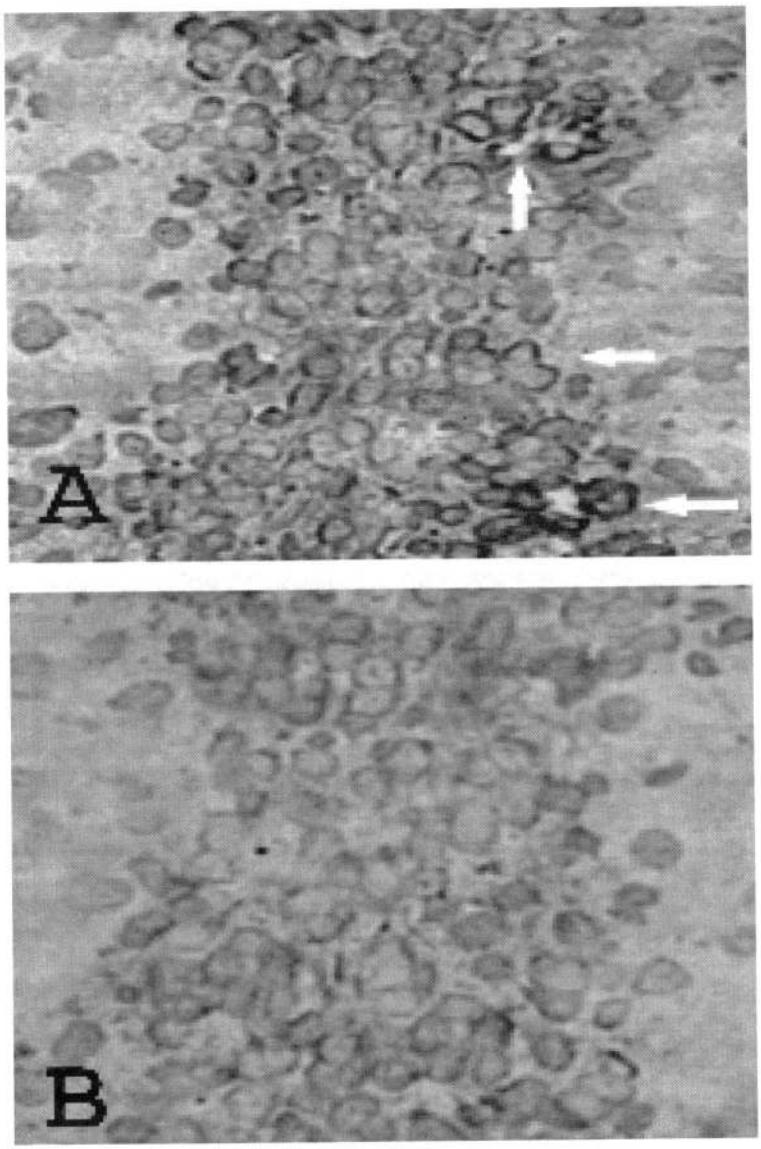
شکل ۲. تصاویر سلولهای پیوند شده به جسم مخطط موشهای صحرایی (روز پانزدهم). بزرگنمایی: ۲۰۰ ×، A: در رنگ‌آمیزی H&E سلولهای پیوند شده یک ناحیه با تراکم سلولی بالا را تشکیل می‌دهند. پیکان به حد فاصل بین سلولهای پیوند شده و بافت میزبان (ستاره) اشاره می‌کند. B: رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله ماهیت عصبی سلولها را در ناحیه پیوند تأیید می‌کند. پیکان به حاشیه سلولها در ناحیه پیوند اشاره می‌کند. در حدفاصل سلولهای پیوند شده و بافت میزبان (ستاره) هیچ‌گونه نشانه‌ای از بافت اسکار دیده نمی‌شود و به نظر می‌رسد که سلولهای عصبی تمایز یافته از سلولهای بنیادی رویانی با بافت عصبی میزبان سازگاری پیدا کرده‌اند.



شکل ۳. میکروگراف الکترونی تهیه شده از سلولهای ناحیه پیوند در روز پانزدهم. A : فراساختار غالب سلولها را در ناحیه پیوند نشان می‌دهد که شامل شبکه آندوپلاسمیک خشن فراوان (پیکان)، پلی‌زومهای زیاد (نوک پیکان)، بالا بودن بخش یوکروماتین هسته (ستاره) و دو یا چند میتوکندری (M) می‌باشد (روز پانزدهم، بزرگنمایی: ۲۰۰۰۰×). B : تصویر مربوط به یکی از سلولهای شبه الیگودندروسیت است که در لابلای سلولهای پیوند شده مشاهده شد. هسته این سلول (ستاره) به‌وسیله زوائد عصبی میلین‌داری (پیکان) احاطه شده است که به نظر می‌رسد میلین آنها به واسطه سلول مذکور ایجاد شده است. در مجاور سلول مذکور سلول دیگری با هسته حاوی یوکروماتین بالا مشاهده می‌شود. (روز پانزدهم، بزرگنمایی: ۴۴۰۰ ×)



شکل ۴. تصاویر مربوط به ایمونوهیستوشیمی سلولهای ناحیه پیوند با استفاده از آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز (TH) (روز پانزدهم).
بزرگنمایی: ۲۰۰ ×، A : واکنش سلولهای ناحیه پیوند به آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز را نشان می‌دهد. قهوه‌ای رنگ بودن سلولها که در اثر اتصال آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به پراکسیداز و واکنش سوبسترای DAB ایجاد شده است نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش سلولهای ناحیه پیوند به آنتی‌بادی تیروزین هیدروکسیلاز است. B : تصویر نمونه کنترل منفی است. به‌دلیل عدم استفاده از آنتی‌بادی اولیه هیچ‌گونه رسوب رنگ DAB مشاهده نمی‌شود که این دال بر منفی بودن واکنش است (بزرگنمایی ۲۰۰ ×). در هر دو نمونه آزمایش منفی از رنگ هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته سلولها استفاده شده است.



شکل ۵. تصاویر مربوط به ایمونوهیستوشیمی سلولهای ناحیه پیوند با استفاده از آنتی‌بادی SSEA1 (روز پنجم). (بزرگنمایی ۲۰۰ ×)، A : قهوه‌ای رنگ بودن غشاء بعضی از سلولها (پیکان) که در اثر اتصال آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به پراکسیداز و واکنش سوبسترای DAB ایجاد شده است نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش سلولهای ناحیه پیوند به آنتی‌بادی SSEA1 است. B : تصویر نمونه کنترل منفی است که به‌دلیل عدم استفاده از آنتی‌بادی اولیه هیچ‌گونه رسوب رنگ DAB در آن مشاهده نمی‌شود که این دال بر منفی بودن واکنش است. رنگ‌پذیری نمونه به مقدار کم بیانگر این است که پراکسیداز داخلی سلولها به خوبی مهار نشده است.