



بیان نوروتروفین‌ها در سلول‌های بنیادی چربی در شرایط کشت آزمایشگاهی و پس از پیوند به موش مدل پارکینسونی

ابوطالب کوشا^{۱*} (MSc)، مریم حاجی قاسم‌کاشانی^{۲**} (PhD)، غلامحسین واعظی (PhD)^۱، ویدا حجتی (PhD)^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

^۲ گروه علوم سلولی - ملکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۶ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۲۸)

چکیده

زمینه: سلول‌های بنیادی بافت چربی (ASCs) در شرایط آزمایشگاهی، فاکتورهایی را در محیط کشت‌شان ترشح می‌کنند، که به آن محیط کاندیشنال (CM) می‌گویند. در این مطالعه بیان نوروتروفین‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی و پیوندی در موش‌های مدل پارکینسونی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر بیان ژن‌های نوروتروفین را در شرایط برون تنی و درون تنی مورد بررسی قرار داده است. شرایط برون تنی شامل ارزیابی بیان ژن‌های مذکور در محیط کاندیشنال حاصل از ۲۱ روز کشت سلول‌های بنیادی چربی (گروه کشت) و گروه پیوند که به زیر گروه‌های موش‌های مدل پارکینسونی دریافت کننده سلول‌های بنیادی چربی (گروه سلول)، دریافت کننده سلول و محیط کاندیشنال (گروه سلول + محیط کاندیشنال) تقسیم شدند. جهت کنترل پیوند، گروه‌های مدل پارکینسونی و شم: موش‌هایی که به آن‌ها به ترتیب 6-OHDA (نوروتوکسین) و نرمال سالین (حلال نوروتوکسین) به جای نوروتوکسین تزریق شده بود، نیز طراحی شد. تمام تزریقات در ناحیه جسم مخطط سمت راست، با استریوتاکس انجام شد. پس از ۸ هفته، نمونه‌ها جمع‌آوری شدند.

یافته‌ها: افزایش معنی‌دار بیان BDNF و NT3 در گروه‌های سلول + محیط کاندیشنال و سلول در مقایسه با گروه کشت مشاهده شد. بیان NT3 در گروه سلول و بیان NGF در گروه‌های کشت و سلول کاهش معنی‌داری را نسبت به سلول + محیط کاندیشنال نشان داد.

نتیجه‌گیری: ASCs زمانی که به همراه محیط کاندیشنال در محل آسیب پیوند زده می‌شوند، تحت تأثیر ریزمحیط قادرند سلول‌های آسیب دیده را در جهت بیان میزان بالای نوروتروفین‌ها القاء کنند. این سلول‌ها کاندید مناسبی جهت سلول درمانی خواهند بود.

واژگان کلیدی: نوروتروفین‌ها، سلول‌های بنیادی چربی، درون تنی، برون تنی

** دامغان، گروه علوم سلولی - ملکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

مقدمه

سلول‌های بنیادی و کاربرد درمانی

تاکنون تحقیقات گسترده‌ای مبنی بر پیوند سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو شده است (۱ و ۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) از مغز استخوان، بافت چربی، غضروف، تاندون، عضله اسکلتی، مغز، خون، بندناف، شبکیه، قرنیه چشم، پوست، لوله گوارش، کبد و پالپ دندان استخراج می‌شوند، از توانایی خود تکثیری و تمایز بالایی برخوردارند، به طوری که قادرند به رده‌های مزودرمی و غیرمزودرمی از جمله استئوسیت، آدیپوسیت، کندروسیت، نورون و اندوتلیوم تمایز یابند. این سلول‌ها به راحتی استخراج، کشت و تکثیر می‌شوند، در حالی که قابلیت تمایزشان را حفظ می‌کنند و بنابراین در مهندسی بافت، پزشکی ترمیمی کاربرد بسیار بالایی دارند (۳-۶). امروزه سلول درمانی به‌عنوان روشی مؤثر در درمان پارکینسون مطرح می‌شود (۷ و ۸) لیو (Liu) گزارش داد پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به موش‌های مدل پارکینسونی منجر به تراکم نورون‌های TH مثبت در جسم سیاه و زوائد عصبی در جسم مخطط شده و بهبود حرکتی حاصل می‌گردد (۹ و ۱۰). مطالعات نشان داده‌اند پیوند MSC‌های انسان در موش مدل پارکینسونی ایجاد شده با MPTP، نورون‌زایی در نواحی زیربطنی، جسم سیاه و تمایز پیش‌سازهای عصبی به نورون‌های دوپامینرژیک را افزایش می‌دهد (۱۱).

نقش درمانی نوروتروفین‌ها و محیط کاندیشنال

فاکتورهای رشد ترشح شده از MSC‌ها پس از پیوند، با تأثیر تروفیک بر نورون‌های دوپامینرژیک تخریب شده منجر به بهبودی مدل‌های حیوانی پارکینسون می‌گردد (۱۲). همچنین سلول‌های پیوند شده با ترشح

فاکتورهای آنژیوژنیک، عروق‌زایی را در محل آسیب تحریک می‌کنند که به دنبال آن نورون‌زایی نیز تحریک می‌گردد (۱۳). بقاء کم سلول‌های پیوند شده و عدم جوش خوردن آن‌ها در محل آسیب، همچنین ریسک بالای توموری شدن سلول‌های پیوندی و صرف زمان طولانی جهت آماده‌سازی و تکثیر سلول‌ها باعث شده توجه محققین به سکرتم که از ترشحات سلول‌ها در محیط کشت‌شان می‌باشد و محیط کاندیشنال نامیده می‌شود، معطوف گردد. محیط کاندیشنال حاوی آگوزوم‌هایی است که از سلول‌های بنیادی در شرایط کشت آزمایشگاهی به داخل محیط‌شان ترشح می‌شود (۱۴-۱۶). دانشمندان همچنین در حال بررسی کاربرد فاکتورهای رشد عصبی ترشح شده به وسیله سلول‌های بنیادی و نقش آن‌ها در درمان بیماری پارکینسون و دیگر بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی هستند (۱۷). گزارش شده که تزریق این فاکتورها به بقاء و حتی بازگرداندن عملکرد نورون‌ها، به‌خصوص نورون‌های دوپامینرژیک در مغز کمک کرده و همچنین می‌تواند منجر به بهبود اختلالات حرکتی گردد. فاکتورهای رشد عصبی یا نوروتروفین‌ها یک اصطلاح عمومی است که برای توصیف تعدادی از فاکتورهای نوروتروفیک افزایش دهنده بقای نورون‌ها، تمایز عصبی، القای تکثیر و مؤثر بر عملکرد سیناپس به کار برده می‌شود. نوروتروفین‌ها القاء کننده تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی به سلول‌های عصبی می‌باشند (۱۸ و ۱۹). BDNF در سلول‌های هیپوکمپ بیان شده و باعث بقای نورون‌ها می‌گردد. تحقیقات نشان داده میزان بیان ژن BDNF در هیپوکمپ بیماران آلزایمری و جسم سیاه مغز میانی بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد (۲۰). ژن NT3 در سلول‌های گرانولار و سلول‌های هرمی CA2 هیپوکمپ بیان می‌شود و

بیان ضعیفی در مناطق CA1 و CA3 دارد (۲۱ و ۲۲). با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانته NGF تزریق این ماده منجر به افزایش بقاء سلول‌های پیوند زده شده در محل آسیب می‌گردد و همچنین از نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در مقابل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۲۰ و ۲۳).

مطالعات نشان داده سلول‌های بنیادی چربی (ASCs) از مغز موش در برابر سمیت نوروتوکسین (6-OHDA) محافظت می‌کند، ولی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در آن ناشناخته است (۲۴)، محققین معتقدند فاکتورهای آزاد شده از این سلول‌ها در محافظت نورونی نقش دارند. در مطالعه‌ای نیز ثابت شده فاکتورهای آزاد شده از سلول‌های ASCs در محیط کشت از نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی و گرانولار مخچه در مقابل سمیت نوروتوکسین محافظت می‌کند. دانشمندان معتقدند فاکتورهای آزاد شده از سلول‌ها، رادیکال‌های آزاد را کاهش داده و بدین ترتیب از مرگ نورون‌ها می‌کاهند (۲۵ و ۲۶). در تحقیقی مشاهده شد که محیط کاندیشنال سلول‌های MSC که غنی از اگزوزوم‌هاست می‌تواند مانع از آپوپتوز نورون‌های دوپامینرژیک ناشی از نوروتوکسین 6-OHDA گردد و رشد زوائد نورون‌ها را تحریک می‌کند (۲۷). مانوز (Munoz) و همکاران، مشاهده کردند که پیوند MSC‌های انسانی در هیپوکمپ موش تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی اندوژن را تحریک می‌کند. مطالعات اخیر افزایش نورون‌زایی، بعد از پیوند داخل بطنی و داخل هیپوکمپی MSC‌ها را نشان دادند (۲۸). بعضی فاکتورهای ترشح شده از MSC‌ها شامل: BDNF، GDNF، CNTF و bFGF اثرات محافظت نورونی و نوروتروفیک بر نورون‌های دوپامینرژیک اعمال

می‌کنند. در مطالعه دیگر افزایش بیان GDNF در جسم سیاه موش‌های صحرایی پیوند شده مشاهده شد و محققان بر این باورند که تمایز MSC‌ها به سلول‌های گلیالی، ترشح GDNF را تقویت کرده که منجر به محافظت نورون‌های دوپامینرژیک شده است (۱۸ و ۲۹).

وی (Wei) و همکاران، گزارش دادند محیط کاندیشنال سلول‌های ASC نورون‌های گرانولار مخچه‌ای را از آپوپتوز القاء شده به وسیله محرومیت از سرم و پتاسیم محافظت می‌کند (۳۰). ونگ (Wang) و همکاران، برای اولین بار نشان دادند که محیط کاندیشنال حاصل از سلول‌های چربی قادر است به‌طور مستقیم مرگ نورونی ناشی از 6-OHDA را در *in vitro* متوقف کند و این مکانیسم محافظت نورونی با مهار تولید ROS و بلوکه کردن مرگ نورونی ناشی از ROS همراه است و پیشنهاد کردند محیط کاندیشنال با اثرات آنتی‌اکسیداتیو و محافظت نورونی می‌تواند در درمان بیماری پارکینسون و دیگر بیماری‌های نورودژنراتیو سودمند باشد (۳۱ و ۳۲). نوروتروفین‌ها در مدل‌های متفاوت آسیب دوپامینرژیک با امید یافتن راهی تازه برای محافظت نورونی یا ترمیم در بیماری پارکینسون استفاده شده‌اند.

هدف از این مطالعه

در این تحقیق میزان بیان ژن‌های نوروتروفیک در سلول‌های کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی و در محل آسیب موش‌های صحرایی مدل پارکینسونی پس از پیوند سلول به همراه ترشح‌اتش مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به روش تجربی- آزمایشگاهی بر روی ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۲۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور انجام گرفت. نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است. مطالعه پس از اخذ مجوز کتبی از کمیته اخلاق دانشگاه (کد اخلاق ۰۲۸. ۱۴۰۰).

IR.IAU.DAMGHAN.REC انجام شد، مراحل

انجام تحقیق به شرح زیر بود:

۱- تهیه موش‌های صحرایی آسیب دیده، با تزریق یک طرفه نوروٹوکسین 6-OHDA به میزان ۲۰ میکروگرم در جسم مخطط سمت راست (مختصات بر اساس اطلس پاکسینوس: قدامی- خلفی: ۱/۲- میلی‌متر، پشتی- شکمی: ۵- میلی‌متر و داخلی- خارجی: ۳/۹- میلی‌متر)، با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه صورت گرفت و به منظور تأیید مدل از ایمنوهیستوشیمی آنتی- تیروزین هیدروکسیلاز استفاده شد.

۲- استخراج و کشت ASCs: بافت چربی زیر جلدی بین دو کتف موش‌ها جدا شده و جهت استخراج مورد استفاده قرار گرفت. تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار قطعات بافت چربی پس از هضم مکانیکی با استفاده از تیغ اسکالپل، به قطعات کوچک‌تری تبدیل شده و هضم آنزیمی به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه توسط کلاژناز (۰/۲ درصد) در دمای ۳۷°C انجام شد. پس از سانتریفوژ (۱۵۶۷ دور در دقیقه، ۵ دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و ریختن محلول رویی، پلیت سلولی به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت و سرم انکوبه شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی تعویض شد. سلول‌های استرومایی با چسبیدن به کف فلاسک، باقی مانده و سلول‌های

خونی پس از شستشو حذف شدند. هنگامی که سلول‌ها ۸۰-۷۰ درصد فلاسک را پر کردند پاساژ داده شده و برای نشان‌دار کردن سلول‌های پاساژ سوم، ۴۸ ساعت قبل از انجام پیوند، پودر BrdU (Sigma)، (5'-Bromo- 2' Deoxyuridine) با غلظت ۱۰ میکرولیتر به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد، بدون اینکه تعویض محیط انجام شود تا به سلول‌ها اجازه داده شود ترشحات‌شان را وارد محیط کشت کنند. سپس تعداد 1×10^5 سلول نشان‌دار شده به همراه محیط کشت‌شان با کمک پمپ تزریق و استریوتاکس در محل آسیب پیوند زده شد.

به منظور جمع‌آوری محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی چربی، تعداد 5×10^5 سلول‌های پاساژ سوم به داخل یک فلاسک کشت انتقال داده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت زمانی که سلول‌ها به کف فلاسک کشت چسبیدند، محیط‌رویی کشت دور ریخته شد و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک دو مرتبه با PBS شستشو داده شدند. سپس حدود ۲-۱/۵ میلی‌لیتر محیط α -MEM تازه فاقد سرم روی سلول‌ها ریخته شد و مجدداً فلاسک‌ها انکوبه شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها را جمع‌آوری کرده و در لوله فالكون ریخته و به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، محیط رویی که همان محیط کاندیشنال بود در فریزر -70°C نگهداری شد.

۳- گروه‌های آزمایشی بر اساس بیان ژن‌های نوروتروفین در شرایط برون تنی و درون تنی طراحی شدند. شرایط برون تنی شامل ارزیابی بیان ژن‌های مذکور در محیط کاندیشنال حاصل از ۲۱ روز کشت سلول‌های بنیادی چربی (گروه کشت) و گروه پیوند که به زیر گروه‌های موش‌های نر نژاد ویستار مدل پارکینسونی دریافت کننده 1×10^5 سلول‌های بنیادی

قرار گرفتند. سپس به نمونه‌ها DAB اضافه شد و به دنبال آن آبیگری، شفاف‌سازی با گزین (xylene) به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. سپس لامل‌ها چسبانده شد و با میکروسکوپ (E600, Japan, Nikon Eclipse) بررسی شدند و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰X و دوربین دیجیتال (DXM 120, USA, Nikon) از مقاطع عکسبرداری شد.

۵- قربانی کردن حیوانات پس از ۸ هفته، خارج کردن مغزها از جمجمه و جدا کردن اجسام مخطط سمت راست به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های NGF, BDNF, NT3, NT4 و GDNF با روش RT-PCR با روش زیر:

- استخراج RNA: طبق پروتکل شرکت سیناژن انجام شد. کیفیت و کمیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر بررسی شد. سنتز cDNA مطابق با پروتکل شرکت Fermentas انجام شد.

- واکنش PCR: ابتدا ۲۵ میکرولیتر ماستر میکس (بافر تکثیر ۱x، MgCl₂ ۱/۵ میلی‌مولار مخلوط dNTP ۰/۲ میلی‌مولار، آنزیم DNA پلی‌مراز ۱۰۰ unit per µl reaction و آب مقطر استریل) تهیه شد و به آن cDNA و پرایمر اضافه گردید. سرانجام میکروتیوب در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شد و شرایط PCR مطابق برنامه زیر صورت گرفت:

Initial Denaturation: ۹۴ °C به مدت ۲ دقیقه؛
Denaturation: ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه؛
Annealing: ۳۰ ثانیه (این دما برای ژن‌های GAPDH: ۵۷ °C، BDNF: ۹۵ °C، NT3: ۵۶ °C و NGF: ۵۸ °C و Extension: ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه.
پس از اتمام ۳۰ سیکل آخرین مرحله Final Extension در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. دمای Annealing بر اساس Tm پرایمرها

چربی، یک هفته پس از تزریق نوروتوکسین به صورت موضعی در محل آسیب و با کمک استریوتاکس (گروه سلول)، دریافت کننده تعداد ۱×۱۰^۵ سلول مشابه گروه قبلی به همراه ۴ میکرولیتر محیط کشت حاوی ترشحات سلولی (گروه سلول + محیط کاندیشنال) تقسیم شدند. جهت کنترل پیوند، گروه‌های مدل پارکینسونی و شم: موش‌هایی که به آن‌ها به ترتیب 6-OHDA (نوروتوکسین) و نرمال سالین (حلال نوروتوکسین) به جای نوروتوکسین تزریق شده بود، نیز طراحی شد. تمام تزریقات به صورت یک طرفه در جسم مخطط سمت راست و با استفاده از استریوتاکس انجام شد.

۴- ایمنوهیستوشیمی آنتی- تیروزین هیدروکسیلاز (TH):

تعدادی از موش‌های گروه آسیب قربانی شده و به منظور تأیید تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه مغزی پس از تزریق نوروتوکسین، از روش ایمنوهیستوشیمی آنتی TH استفاده شد. سپس قالب‌های پارافینی تهیه شد. با توجه به اطللس پاکسینوس، جسم سیاه در محدوده ۴/۶-۶۸/۲۴ میلی‌متری پشت برگما قرار دارد، برش‌های کروئال با ضخامت ۵ میکرومتر از این مناطق جمع‌آوری شد و پس از پارافین‌زدایی و آبدهی، بازبایی آنتی‌ژن با استفاده از بافر سترات در دماهای ۷۲۰، ۳۶۰ و ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد دستگاه ماکروویوانجام شد و پس از شستشو با بافر (TBS یا PBS) حاوی تریتون ۰/۰۲۵ درصد، لام‌ها در محلول بلاک کننده سرم بز ۱۰ درصد تریتون قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض آنتی‌بادی اولیه ضد تیروزین هیدروکسیلاز (Anti Rabbit) و به دنبال آن آنتی‌بادی ثانویه TH، HRP، به مدت یکساعت

تعیین شد. استفاده از دستگاه نمایشگر ژل بررسی شدند. برای مشخص شدن تکثیر قطعه مورد نظر و بیان ژن، محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. تمامی ژل‌های آگارز تهیه شده با

جدول ۱) پرایمرهای استفاده شده در RT-PCR			
پرایمر	توالی	اندازه پرایمر (bp)	اندازه محصول (bp)
GAPDH-F	5'-TGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'	۲۱	۲۰۳
GAPDH-R	5'-CCCTGTTGCTGTAGGCGTATT-3'	۲۱	
NT3-F(31)	5'-AGGTCAGAATTCCAGCCGAT-3'	۲۰	۱۸۱
NT3-R	5'-GTTTCCTCCGTGATGTT-3'	۲۰	
BDNF-F(31)	5'-GCCCCAACGAAGAAAACCATA-3'	۲۰	۴۰۵
BDNF-R	5'-GATTGGGTAGTTTCGGCATTTG-3'	۲۰	
NGF-F(31)	5'-CCTCTTCGGACACTCTGGA-3'	۱۹	۱۶۴
NGF-R	5'-CGTGGCTGTGGTCTTATCT-3'	۱۹	

تجزیه و تحلیل آماری

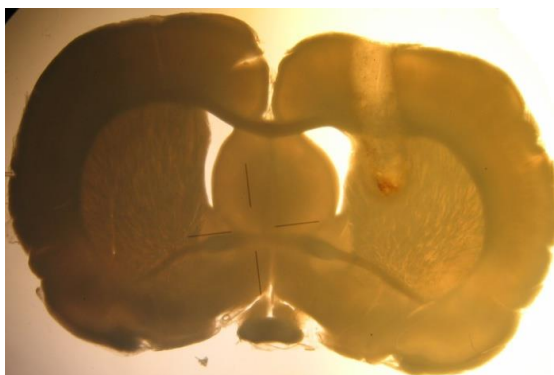
آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام شد. به منظور بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey و LSD استفاده شد. همچنین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با استفاده از Independent-sample T Test انجام شد. $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نهایتاً نمودارها با Excel ترسیم گردید.

یافته‌ها

بررسی ایمونوهیستوشیمی و تأیید محل تزریق

محل کانول تزریق و انتهای رنگی آن در شکل (۱) مشخص شده است، به طوری که منطقه رنگی دقیقاً در ناحیه جسم مخطط مشاهده می‌شود.

محل قرارگیری کانول تزریق

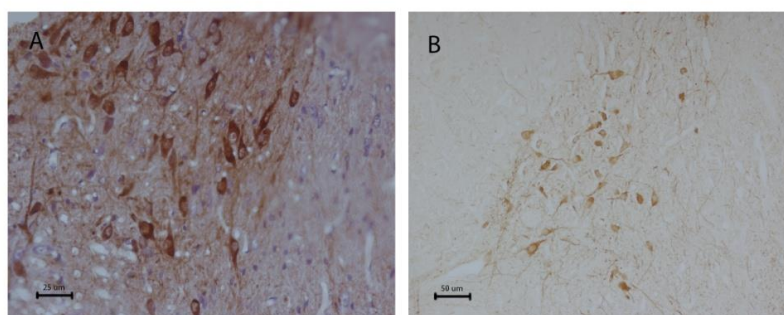


شکل ۱) محل قرارگیری کانول تزریق و انتهای رنگی آن که در ناحیه جسم مخطط مغز می‌باشد، در شکل نشان داده شده است.

Fig 1) The location of the injection cannula and its colored end within the brain striatum was shown in the figure

نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی آنتی تیروزین هیدروکسیلاز نشان داد که تراکم نورون‌های TH مثبت

(دوپامینرژیک) در منطقه جسم سیاه گروه مدل
پارکینسونی (شکل ۲B) در مقایسه با شم (شکل ۲A)
رنگ‌آمیزی آنتی تیروزین هیدروکسیلاز

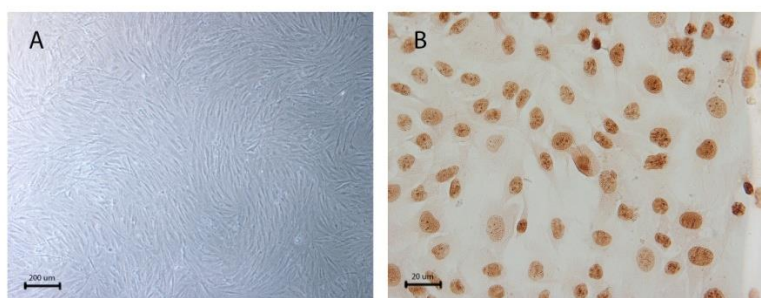


شکل ۲) ایمونوهیستوشیمی آنتی تیروزین هیدروکسیلاز ناحیه جسم سیاه مغز میانی موش‌ها پس از تزریق نوروتوکسین که تراکم نورون‌های TH مثبت در گروه‌های شم (A) و مدل پارکینسونی (B) نشان داده شده است.

Fig 2) Anti-tyrosine hydroxylase immunohistochemistry of rat midbrain substantia nigra after neurotoxin injection, showing the density of TH-positive neurons in the sham (A) and Parkinsonian model (B) groups

بررسی مورفولوژیکی سلول‌های ASCs با
میکروسکوپ اینورت
سلول‌های ASCs پاساژ سوم ظاهری دوکی شکل و
فیبروبلاستی را نشان دادند، از آنجا که این سلول‌ها
قابلیت چسبیدن به کف فلاسک کشت را داشتند، از
سلول‌های خونی به آسانی جدا می‌شدند (شکل ۳A) و
سلول‌های نشاندار شده با BrdU در شکل ۳B قابل
مشاهده است.

سلول‌های بنیادی چربی پاساژ سوم در شرایط کشت آزمایشگاهی و ایمونوسیتوشیمی سلول‌های نشاندار شده با BrdU

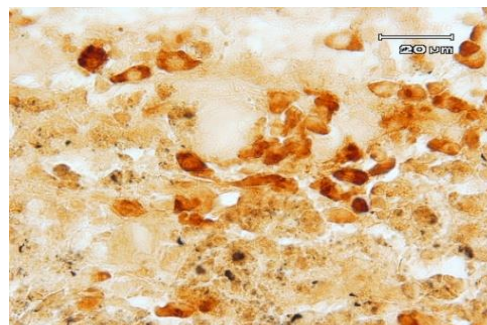


شکل ۳) (A) پاساژ سوم سلول‌های بنیادی چربی موش، که نمایی دوکی شکل و کشیده دارند و به کف فلاسک کشت می‌چسبند. (B) همان سلول‌ها مشاهده می‌شوند که قبل از پیوند با BrdU نشاندار شده‌اند.

Fig 3) (A): Adipose tissue stem cells at passage 3 with spindle-shaped and elongated morphology were adhered to the bottom of the culture flask. (B): The same cells were BrdU labeled prior to transplantation

در شکل (۴) نیز سلول‌های نشاندار شده مستقر در
محل آسیب، که با ایمونوهیستوشیمی آنتی BrdU
مشاهده می‌شوند.

سلول‌های BrdU مثبت پیوند شده در محل آسیب



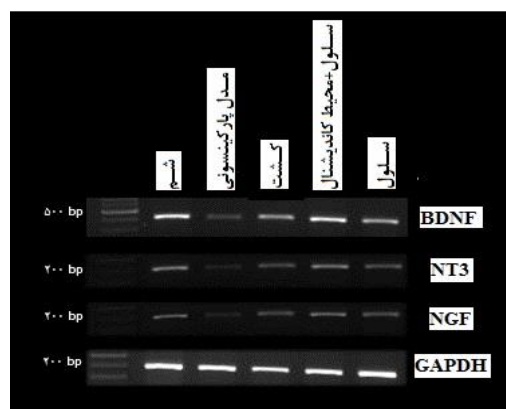
شکل (۴) سلول‌ها در محل پیوند مشاهده می‌شوند، که با هسته‌های BrdU مثبت که به رنگ قهوه‌ای تیره هستند در محل آسیب مستقر شده‌اند.

Fig 4) Homing of cells at the graft site were detected with dark brown BrdU-positive nuclei at the injury site

بررسی بیان ژن‌های نوروتروفیک با استفاده از تکنیک RT-PCR

ژل الکتروفورز مربوط به ژن‌های BDNF، NT3، NGF و GAPDH در شکل (۵) مشاهده می‌شود. داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA)، به همراه آزمون تکمیلی Tukey مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل (۶) مشاهده می‌شود، بیان ژن‌های BDNF، NT3 و NGF در گروه مدل پارکینسونی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با شم نشان داد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مدل پارکینسونی و

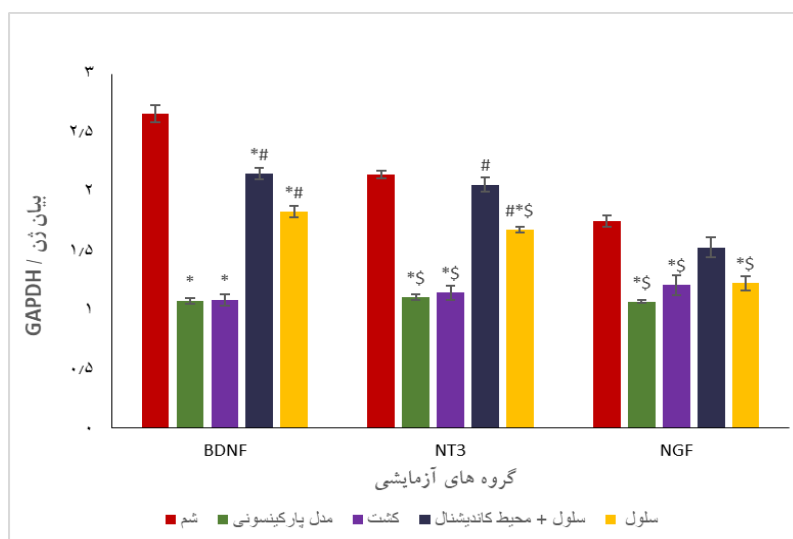
ژل الکتروفورز ژن‌های مورد آزمایش



شکل (۵) ژل الکتروفورز ژن‌های BDNF: 405 bp، NT3: 181 bp، NGF: 164 bp و GAPDH: 203 bp

Fig 5) The gel electrophoresis of BDNF: 405bp, NT3: 181bp, NGF: 164bp and GAPDH: 203bp

میزان بیان ژن‌های BDNF، NT3 و NGF در گروه‌های آزمایشی



شکل ۶) * معنی‌داری با شام، # معنی‌داری با گروه‌های مدل پارکینسونی و کشت، \$ معنی‌داری با سلول + محیط کاندیشنال

Fig 6) * significant versus sham; # significant versus Parkinsonian model and culture groups; \$ significant versus cell+conditioned medium group

شد (۳۳). برای اطمینان از صحت ایجاد آسیب، از تکنیک ایمنوهیستوشیمی آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز استفاده شد. نتایج نشان داد که در گروه مدل پارکینسونی تراکم نورون‌های دوپامینی که به TH پاسخ مثبت داده‌اند در ناحیه جسم سیاه مغز میانی نسبت به گروه شام کاهش یافته است. این نتیجه نشان‌دهنده تخریب نورون‌های دوپامینی در گروه مدل پارکینسونی پس از تزریق نوروتوکسین است. همچنین در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های نوروتروفیک BDNF، NGF و NT3 در جسم مخطط مغز تمامی گروه‌ها با روش RT-PCR بررسی گردید. کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های مذکور در گروه مدل پارکینسونی در مقایسه با شام، تأیید کننده صحت مدل آسیب بوده که در این تحقیق به کار برده شده بود. به طوری‌که این روش برای تهیه مدل آزمایشگاهی پارکینسون نیز کاربرد دارد. از آنجا که اختلاف معنی‌داری در بیان ژن‌های

گروه‌های آزمایشی شامل سلول: موش‌های مدل پارکینسونی، که به آن‌ها تعداد 1×10^5 سلول ASCs تزریق شد؛ سلول + محیط کاندیشنال: موش‌های مدل پارکینسونی، که به آن‌ها تعداد 1×10^5 سلول ASCs به همراه محیط کاندیشنال در محل آسیب تزریق شد؛ کشت: سلول‌های ASC که در محیط کشت حاوی سرم و شرایط آزمایشگاهی روتین کشت داده شدند؛ مدل پارکینسونی: حیواناتی که به آن‌ها نوروتوکسین به صورت یک طرفه در جسم مخطط سمت راست تزریق شد؛ شام: موش‌هایی که به آن‌ها نرمال سالین به جای نوروتوکسین در ناحیه جسم مخطط سمت راست تزریق شد.

بحث

در این مطالعه از تزریق یک طرفه نوروتوکسین 6-OHDA برای ایجاد آسیب در جسم مخطط استفاده

مذکور بین گروه‌های مدل پارکینسونی و کشت مشاهده نشد، می‌توان پی برد توانایی بیان ژن‌های نوروتروفیک در سلول‌های ASCs تحت شرایط کشت آزمایشگاهی مشابه سلول‌های آسیب دیده در مدل پارکینسونی است. افزایش معنی‌دار بیان ژن BDNF در گروه‌های سلول + محیط کاندیشنال و سلول در مقایسه با گروه کشت نشان داد، سلول‌های بنیادی در شرایط کشت آزمایشگاهی از توانایی بالایی در بیان ژن فوق برخوردار نبوده. زمانی که سلول‌ها به تنهایی و یا همراه با محیط کاندیشنال در محل آسیب مستقر می‌شوند، تحت تأثیر ریزمحیط ناحیه آسیب قادرند سلول‌ها را در جهت بیان ژن BDNF تحریک کنند. مطالعات اخیر شواهدی مبنی بر محافظت نورون‌ها در برابر عوامل آسیب‌زا از طریق BDNF درون‌زاد را گزارش داده‌اند (۳۴).

در برخی از گزارش‌ها آمده پس تجویز فاکتور رشد عصبی مغزی (BDNF) برون‌زا، فاکتور مذکور قادر به عبور از سد خونی - مغزی نبوده و منجر به تحریک نورون‌زایی و به دنبال آن بهبود عملکرد در بیماری‌های نورودژنراتیو نمی‌شود (۳۵).

نتایج RT-PCR در این تحقیق نشان داد، موش‌هایی که به آن‌ها سلول به تنهایی و یا سلول + محیط کاندیشنال پیوند زده شده بود، افزایش معنی‌داری در بیان ژن NT3 در محل آسیب در مقایسه با گروه‌های مدل پارکینسونی و کشت نشان دادند. در حالی که در گروه کشت کاهش معنی‌داری در بیان ژن مذکور در مقایسه با گروه‌های تیمار مشاهده شد، بنابراین سلول به تنهایی و یا همراه با ترشح‌اتش در محل آسیب قادر به افزایش بیان ژن NT3 شده است. از طرفی نیز کاهش معنی‌دار ژن فوق در گروه سلول نسبت به گروه سلول + محیط کاندیشنال مؤید آنست که سلول‌های بنیادی به همراه ترشح‌اتش که حاوی فاکتورهای نوروتروفیک است پس از پیوند

توانایی تحریک سلول‌ها را در محل آسیب داشته و تولید فاکتورهای نوروتروفیک را القاء می‌کند و بدین ترتیب در مقایسه با زمانی که سلول‌های بنیادی به تنهایی پیوند زده می‌شوند، نقش مؤثری در محافظت نورون‌های آسیب دیده دارد. نتایج نشان داد، سلول‌های بنیادی چربی در شرایط کشت آزمایشگاهی از چنین قابلیت برخوردار نبودند و پس از پیوند و قرار گرفتن در معرض ریزمحیط حاوی فاکتورهای انتهایی، از توانایی بیان ژن‌های نوروتروفیک برخوردار شدند. گزارش شده NT3 بقاء نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی را در موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد (۱۹ و ۳۶).

در این مطالعه بیان ژن NGF در گروه‌های کشت و سلول کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه سلول + محیط کاندیشنال نشان داد. همچنین بین گروه‌های کشت و سلول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین سلول به همراه محیط کاندیشنال که حاوی فاکتورهای ترشحی سلول بوده در محل آسیب منجر به افزایش بیان ژن NGF شده است و از آنجا که این گروه با شم اختلاف معنی‌داری را نشان نداده بود، با تحریک بیان ژن مذکور و به دنبال آن ترشح NGF در محل آسیب باعث تسریع روند بهبودی گردیده است. فاکتورهای نوروتروفیک نیمه عمر کوتاهی دارند که کاربرد درمانی آن‌ها را محدود می‌کند. از طرفی، وزن مولکولی نسبتاً زیاد این مولکول‌ها نیز مانع عبور آن‌ها از سد خونی مغزی می‌شود (۲۳، ۳۷ و ۳۸).

این مقاله تحت حمایت مالی هیچ سازمان یا مؤسسه‌ای نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری

تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی چربی به سلول‌های عصبی در شرایط کشت آزمایشگاهی

سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه ابوطالب کوشا برای اخذ درجه دکتری در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشگاه آزاد اسلامی دامغان می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان از کلیه افرادی که در این پژوهش همکاری کردند و دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی دامغان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

و سپس پیوند این سلول‌ها شده است. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد، سلول‌ها در شرایط *In vitro* از توانایی بیان ژن‌های نوروتروفیک برخوردار می‌باشند، ولی زمانی که به همراه ترشحات‌شان (محیط کاندیشنال) در محل آسیب تزریق شوند، تحت تأثیر ریزمحیط ناحیه قادرند سلول‌های آسیب دیده را در جهت بیان ژن‌های نوروتروفیک BDNF، NT3 و NGF القاء کنند. بدین جهت این سلول‌ها کاندید مناسبی جهت سلول درمانی خواهند بود، که امید تازه‌ای را برای ترمیم بافت‌های عصبی مرکزی آسیب‌دیده فراهم می‌کنند.

References:

- 1.Chan TM, Chen JY, Ho LI, et al. ADSC therapy in neurodegenerative disorders. *Cell Transplant* 2014; 23(4-5): 549-57. doi: [10.3727/096368914X678445](https://doi.org/10.3727/096368914X678445)
- 2.Chen L, Qiu R, Xu Q. Mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14(1): 969-75. doi: [10.1166/jnn.2014.9126](https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9126)
- 3.Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 68. doi: [10.1186/s13287-019-1165-5](https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5)
- 4.Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park H-S, et al. Stem cell therapy: From idea to clinical practice. *Int J Mol Sci* 2022; 23(5): 2850. doi: [10.3390/ijms23052850](https://doi.org/10.3390/ijms23052850)
- 5.Zhang J, Liu Y, Chen Y, et al. Adipose-derived stem cells: current applications and future directions in the regeneration of multiple tissues. *Stem Cells Int* 2020; 2020: 8810813. doi: [10.1155/2020/8810813](https://doi.org/10.1155/2020/8810813)
- 6.Glavaski-Joksimovic A, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2013; 247: 25-38. doi: [10.1016/j.expneurol.2013.03.016](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.03.016)
- 7.Elsworth JD. Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *J Neural Transm (Vienna)* 2020; 127(5): 785-791. doi: [10.1007/s00702-020-02167-1](https://doi.org/10.1007/s00702-020-02167-1)
- 8.Barbuti PA, Barker RA, Brundin P, et al. Recent Advances in the Development of Stem Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Transplant Therapies for Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2021; 36(8): 1772-1780. doi: [10.1002/mds.28628](https://doi.org/10.1002/mds.28628)
- 9.Liu Z, Cheung H-H. Stem cell-based therapies for Parkinson disease. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21): 8060. doi: [10.3390/ijms21218060](https://doi.org/10.3390/ijms21218060)
- 10.Panicker N, Dawson VL, Dawson TM. The cell biology of Parkinson's disease. *J Cell Biol* 2021; 220(4): e202012095. doi: [10.1083/jcb.202012095](https://doi.org/10.1083/jcb.202012095)
- 11.Mustapha M, Mat Taib CN. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies. *Bosn J Basic Med Sci* 2021; 21(4): 422-433. doi: [10.17305/bjbm.2020.5181](https://doi.org/10.17305/bjbm.2020.5181)
- 12.Mendes-Pinheiro B, Anjo SI, Manadas B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells' secretome exerts neuroprotective effects in a Parkinson's disease rat model. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 294. doi: [10.3389/fbioe.2019.00294](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00294)
- 13.Torrente Y, Polli E. Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Cell Transplant* 2008; 17(10-11): 1103-13. doi: [10.3727/096368908787236576](https://doi.org/10.3727/096368908787236576)
- 14.L PK, Kandoi S, Misra R, et al. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev* 2019; 46: 1-9. doi: [10.1016/j.cytogfr.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002)
- 15.Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 965849. doi: [10.1155/2014/965849](https://doi.org/10.1155/2014/965849)
- 16.Gunawardena TNA, Rahman MT, Abdullah BJJ, et al. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2019; 13(4): 569-86. doi: [10.1002/term.2806](https://doi.org/10.1002/term.2806)

17. Xu R, Wu J, Lang L, et al. Implantation of glial cell line-derived neurotrophic factor-expressing adipose tissue-derived stromal cells in a rat Parkinson's disease model. *Neurol Res* 2020; 42(8): 712-20. doi:<https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1783473>
18. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 2013; 138(2): 155-75. doi: [10.1016/j.pharmthera.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004)
19. Ruozzi B, Belletti D, Bondioli L, et al. Neurotrophic factors and neurodegenerative diseases: a delivery issue. *Int Rev Neurobiol* 2012; 102: 207-47. doi: [10.1016/B978-0-12-386986-9.00009-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386986-9.00009-0)
20. Ibrahim AM, Chauhan L, Bhardwaj A, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurodegenerative Disorders. *BioMed* 2022;10(5):1143. doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051143>
21. Binder DK. Neurotrophins in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 2007; 163: 371-97. doi: [10.1016/S0079-6123\(07\)63022-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63022-2)
22. Tome D, Fonseca CP, Campos FL, et al. Role of Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease. *Curr Pharm Des* 2017; 23(5): 809-838. doi: [10.2174/1381612822666161208120422](https://doi.org/10.2174/1381612822666161208120422)
23. Collier TJ, Sortwell CE. Therapeutic potential of nerve growth factors in Parkinson's disease. *Drugs Aging* 1999; 14(4): 261-87. doi: [10.2165/00002512-199914040-00003](https://doi.org/10.2165/00002512-199914040-00003)
24. Mahendru D, Jain A, Bansal S, et al. Neuroprotective effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell secretome in 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *Regen Med* 2021; 16(10): 915-30. doi: [10.2217/rme-2021-0018](https://doi.org/10.2217/rme-2021-0018)
25. Kim HJ, Lee JH, Kim SH. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *J Neurotrauma* 2010; 27(1): 131-8. doi: [10.1089/neu.2008.0818](https://doi.org/10.1089/neu.2008.0818)
26. Trzyna A, Banaś-Ząbczyk A. Adipose-derived stem cells secretome and its potential application in "stem cell-free therapy". *Biomolecules* 2021;11(6):878. doi: [10.3390/biom11060878](https://doi.org/10.3390/biom11060878)
27. Nakhaeifard M, Kashani MHG, Goudarzi I, et al. Conditioned medium protects dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *Cell J* 2018; 20(3): 348-354. doi: [10.22074/cellj.2018.5343](https://doi.org/10.22074/cellj.2018.5343)
28. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(50): 18171-6. doi: [10.1073/pnas.0508945102](https://doi.org/10.1073/pnas.0508945102)
29. Hoban DB, Howard L, Dowd E. GDNF-secreting mesenchymal stem cells provide localized neuroprotection in an inflammation-driven rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2015; 303: 402-11. doi: [10.1016/j.neuroscience.2015.07.014](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.014)
30. Wei X, Du Z, Zhao L, et al. IFATS collection: the conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem cells* 2009; 27(2): 478-88. doi: [10.1634/stemcells.2008-0333](https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0333)
31. Gu H, Wang J, Du N, et al. Adipose stromal cells-conditioned medium blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and reactive oxygen species. *Neurosci Lett* 2013; 544: 15-9. doi: [10.1016/j.neulet.2013.02.057](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.057)
32. Noverina R, Widawati W, Ayuningtyas W, et al. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clin Nutr Expert* 2019; 24: 34-44. URI:<http://repository.maranatha.edu/id/eprint/27381>
33. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 2002; 24(4): 308-18. doi: [10.1002/bies.10067](https://doi.org/10.1002/bies.10067)
34. Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, et al. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(11): 1220-8. doi: [10.1097/00004647-199911000-00006](https://doi.org/10.1097/00004647-199911000-00006)
35. Molinari C, Morsanuto V, Ruga S, et al. The Role of BDNF on Aging-Modulation Markers. *Brain Sci* 2020; 10(5): 285. doi: [10.3390/brainsci10050285](https://doi.org/10.3390/brainsci10050285)
36. Bondarenko O, Saarma M. Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: Clinical Trials, Open Challenges and Nanoparticle-Mediated Delivery to the Brain. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 682597. doi: [10.3389/fncel.2021.682597](https://doi.org/10.3389/fncel.2021.682597)
37. Möller JC, Sautter J, Kupsch A. Potential of neurotrophic factors in therapy of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1996; 48: 103-12. doi: [10.1007/978-3-7091-7494-4_10](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7494-4_10)
38. Zare MA, Baghaban Eslaminejad MR, Hosseini A. Study of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord vein wall and determining the process of differentiation to cartilage and bone. *Iran South Med J* 2015; 17(6): 1135-1142. http://ismj.bpums.ac.ir/browse.php?a_id=629&sid=1&slc_lang=en&ppup=

Original Article

Expression of Neurotrophins in Adipose-derived Stem Cells during *in vitro* Culture and Posttransplantation in Parkinsonian Rat Model

A. Kousha (MSc)^{1*}, M. Haji Ghasem Kashani (PhD)^{2**}, Gh. Vaezi (PhD)¹,
V. Hojati (PhD)¹

¹ Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

² Department of Cellular and Molecular, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

(Received 28 Jul, 2022

Accepted 19 Sep, 2022)

Abstract

Background: Adipose tissue stem cells (ASCs) cause faster repair of damaged tissue posttransplantation by releasing growth factors in neurodegenerative diseases. ASCs secrete factors in the culture medium called conditioned medium (CM) *in vitro*. This study investigated the expression of neurotrophin genes *in vitro* culture and transplant of ASCs in Parkinsonian rats.

Materials and Methods: In this study, expression of neurotrophin genes was investigated *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* means evaluating expression of genes in the conditioned medium from 21-day culture of ASCs (culture group) and the transplantation group, which were divided into subgroups of Parkinsonian rat model receiving ASCs (Cell group), and another group receiving cells and conditioned medium (Cell + Conditioned Medium group). The sham groups were designed with Parkinsonian model and sham animals injected respectively with 6-OHDA (neurotoxin) and normal saline (neurotoxin solvent) instead of neurotoxin. All the injections were performed stereotactically into the right striatum. After eight weeks of treatment, the transplantation areas were isolated and stored at -70 °C. Then, the expression of neurotrophin (BDNF, NT3 and NGF) mRNAs was analyzed.

Results: BDNF and NT3 mRNA expression levels were significantly higher in the cells+conditioned medium and cell, as compared with the culture group. A significant decrease in NT3 gene expression in cell group was observed compared to that of cell group + conditional medium. NGF expression of the culture and cell groups showed a significant decrease compared to the cell+conditional medium group.

Conclusion: *In vitro* cultured ASCs cannot significantly induce expression of neurotrophin genes, but when the cells are transplanted along with secretions (conditional medium) at the site of injury, the microenvironment of the transplantation site can induce higher expressions of neurotrophins. These cells will be good candidates for cell therapy.

Keywords: Neurotrophins, Adipose-derived stem cells, In vivo, In vitro

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Kousha A, Haji Ghasem Kashani M, Vaezi Gh, Hojati V. Expression of Neurotrophins in Adipose-derived Stem Cells during *in vitro* Culture and Posttransplantation in Parkinsonian Rat Model. Iran South Med J 2022; 25(3): 227-239

**Address for correspondence: Department of Cellular and Molecular, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
E.mail: kashani@du.ac.ir

*ORCID: 0000-0001-9935-1465

**ORCID: 0000-0001-8889-6427