

اثر ضد آپوپتوزی گرلین در سلول‌های بنیادی استرومایی مشتق از مغز استخوان موش صحرائی تیمار شده با پراکسید هیدروژن

دکتر علیرضا عبدانی پور^۱، بهناز شاهسوندی^۲، مسعود دادخواه^۳، دکتر محسن علیپور^۳، دکتر هادی فیضی^۴

نویسنده‌ی مسئول: گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

hfeizik@zums.ac.ir

دریافت: ۹۵/۹/۹ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز شکلی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است و استرس اکسیداتیو یکی از عوامل شناخته شده‌ای است که منجر به آپوپتوز می‌گردد. گرلین یک پپتید ۲۸ اسیدآمینهای است که شواهدی دال بر اثرات آنتی آپوپتوتیک آن وجود دارد هدف از این مطالعه بررسی اثر گرلین بر بقا و میزان آپوپتوز سلول‌های استرومایی مغز استخوان در محیط کشت است.

روش بررسی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) در سه گروه کنترل، تحت تأثیر پراکسید هیدروژن با و بدون تیمار با دوزهای مختلف گرلین (۱-۱۰-۱۰۰ میکرومولار) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت داده شدند. به منظور یافتن بهترین دوز و زمان تأثیر گرلین بر تکثیر این سلول‌ها با روش MTT میزان بقای سلول‌ها تعیین گردید. میزان آپوپتوز در سلول‌ها با استفاده از روش تانل بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از کشت BMSCs نشان داد که این سلول‌ها دارای ظاهری فیبروبلاستی با قابلیت اتصال به ظروف کشت و توانایی تقسیم بسیار بالا هستند. تیمار با گرلین سبب افزایش تکثیر و بقای سلول‌ها هم در شرایط عادی و هم در سلول‌های تحت استرس ناشی از H_2O_2 گردید. بهترین دوز و زمان تأثیر گرلین بر تکثیر سلول‌ها در دوز ۱۰۰ میکرومولار و زمان ۴۸ ساعت بود. همچنین تیمار با گرلین با این دوز، میزان آپوپتوز در سلول‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: به‌کارگیری هورمون گرلین باعث افزایش فعالیت تکثیری سلول‌های BMSC و افزایش بقا و کاهش میزان آپوپتوز در سلول‌های BMSC می‌شود.

واژگان کلیدی: گرلین، سلول‌های استرومایی مغز استخوان، آپوپتوز

مقدمه

آپوپتوز شکلی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که در صورت وجود محرک لازم، دسته‌ای از آنزیم‌های پروآپوپتوتیک، عمدتاً از خانواده‌ی سیستئین پروتئازها مثل کاسپاز، فعال شده و موجب آسیب سلولی و در نهایت مرگ آن سلول می‌گردد (۱ و ۲). آپوپتوز می‌تواند از طریق محرک داخلی و خارجی راه‌اندازی شود. در آپوپتوزیس داخلی

۱- دکترای تخصصی علوم تشریح، استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استاد گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۴- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

دست آمده که در آن‌ها افزودن گرلین به محیط کشت کاردیومیوسیت‌ها و نوروها سبب کاهش اثرات تخریبی عامل آسیب‌رسان شده است (۲۴-۲۰). با توجه به نقش محافظتی که برای گرلین ذکر گردید و نظر به اینکه این پپتید ترکیبی اندوژن است که اثرات جانبی آن نیز می‌تواند حداقل باشد، هدف از این مطالعه بررسی اثر گرلین بر بقا و میزان آپوپتوز سلول‌های BMSC در محیط کشت است تا در صورت یافتن نتایج مثبت، در بهبود فرایند سلول درمانی مورد توجه واقع شود.

روش بررسی

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی BMSC: موش صحرایی بالغ ۱۲ هفته‌ای نژاد Sprague Dawley توسط کلروفورم کشته شد سپس استخوان‌های تیبا و فمور از بدن حیوان جدا شد. عضلات چسبیده به استخوان جداشدنی و استخوان‌ها در داخل پتری دیش حاوی فسفات بافر سالین و آنتی بیوتیک قرار گرفتند. پتری دیش داخل ظرف محتوی یخ قرار گرفت و به زیر هود منتقل شد. دو سر استخوان توسط وسایل استریل شده که از قبل در زیر هود قرار داده شده بودند قطع شدند و به وسیله سرنگ ۵ سی‌سی حاوی محیط کشت DMEM و FBS ۲۰ درصد محتویات داخل کانال استخوان‌ها به داخل فلاسک مخصوص کشت تخلیه شد. فلاسک حاوی سلول در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد و رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵ درصد قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض شدند. بعد از ۲ الی ۳ روز سلول‌ها بر اثر تکثیر کف فلاسک را پر کردند و در این هنگام پاساژ اول برای کشت سلول انجام شد که در طی این عمل با استفاده از محلول تریپسین/EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. در این مطالعه پاساژ سلولی تا ۴ مرحله تکرار شد. جهت اثبات مزانشیمی بودن این سلول‌ها، مارکر CD90 بررسی گردید.

(میتوکندریال)، محرک مسبب مرگ سلول می‌تواند شامل آسیب سلولی یا اختلال عملکرد ایجاد شده توسط استرس، اشعه UV، فعالیت انکوژنیک و تماس با توکسین‌ها باشد. آپوپتوزیس خارجی از طریق باند شدن لیگاندهای خارج سلولی در رسپتورهای بین غشایی ویژه که از اعضای خانواده رسپتور فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور هستند انجام می‌شود (۳). استرس اکسیداتیو یکی دیگر از عوامل شناخته شده‌ای است که منجر به آپوپتوز می‌گردد (۴). پراکسید هیدروژن که به‌طور طبیعی در متابولیسم هوازی در داخل سلول تولید می‌شود، به‌عنوان یکی از عوامل ردوکس و استرس اکسیداتیو شناسایی شده است (۵و۶). درعین حال مشخص شده که عبور H_2O_2 از غشای سلولی توسط آکوپورین‌ها به ویژه پروکسی پورین‌ها صورت می‌گیرد (۷). سلول‌های استرومایی مغزاستخوان (BMSC) دارای خاصیت خود تجدیدی بوده و توانایی تمایز به انواع متعددی از سلول‌ها نظیر آدیپوسیت، استئوسیت، کاردیومیوسیت و نوروها را دارند (۸و۹). کارایی این سلول‌ها در بهبود خون‌سازی، بازسازی استخوان و درمان بیماری‌های مفصلی، درمان آسیب‌های نورودژنراتیو ناشی از سکت‌های مغزی، نارسایی کبد، آسیب‌های پانکراس و کاهش نواحی تخریب شده میوکارد به دنبال سکت‌های قلبی به‌خوبی نشان داده شده است (۱۰-۱۳). به‌این ترتیب، سلول‌های بنیادی استرومایی به‌عنوان یک منبع مناسب برای استراتژی‌های سلول و ژن‌درمانی محسوب می‌شوند (۱۴). با توجه به پتانسیل درمانی، کشت و تکثیر مناسب این سلول‌ها و به حداقل رساندن فرایندهای منجر به آپوپتوز در آن‌ها، مسئله‌ای است که همچنان به آن پرداخته می‌شود (۱۵).

گرلین پپتید ۲۸ اسیدآمین‌ه‌ای است که اولین بار از معده انسان و نیز موش به‌عنوان ترشح‌کننده هورمون رشد جدا شد (۱۶). مطالعات گذشته نشان داده که گرلین نقش موثری در تکثیر انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های بنیادی دارد (۱۷-۱۹). همچنین یافته‌هایی دال بر اثرات آنتی آپوپتوتیک گرلین به

تیمار سلول‌های بنیادی با گرلین: سلول‌ها با پتید گرلین تیمار شدند این پتید ابتدا در آب مقطر حل گردید؛ و غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آن تهیه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض این غلظت‌های مختلف گرلین قرار گرفتند و برای تعیین بهترین دوز و بهترین زمان اثر گرلین بر تکثیر سلول‌ها آزمون MTT انجام گردید.

بررسی رشد و درصد حیات توسط آزمون MTT: میزان رشد و حیات سلول‌های BMSCs در پاساژهای مختلف (تا ۱۰ پاساژ سلولی) با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز احیا و شکسته شده و کریستال‌های آبی رنگ نامحلول تشکیل می‌گردد. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (BioTek) خوانده و بررسی می‌شود. در این روش در هر پاساژ سلولی در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حدود ۵۰۰۰ هزار سلول برای مدت ۳ روز در انکوباتور با شرایط استاندارد کشت (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO₂ ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۲۰ میکرو لیتر MTT (Sigma) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با شرایط استاندارد قرار گرفت. طی این مدت مایع رویی چاهک دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (Merk) به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

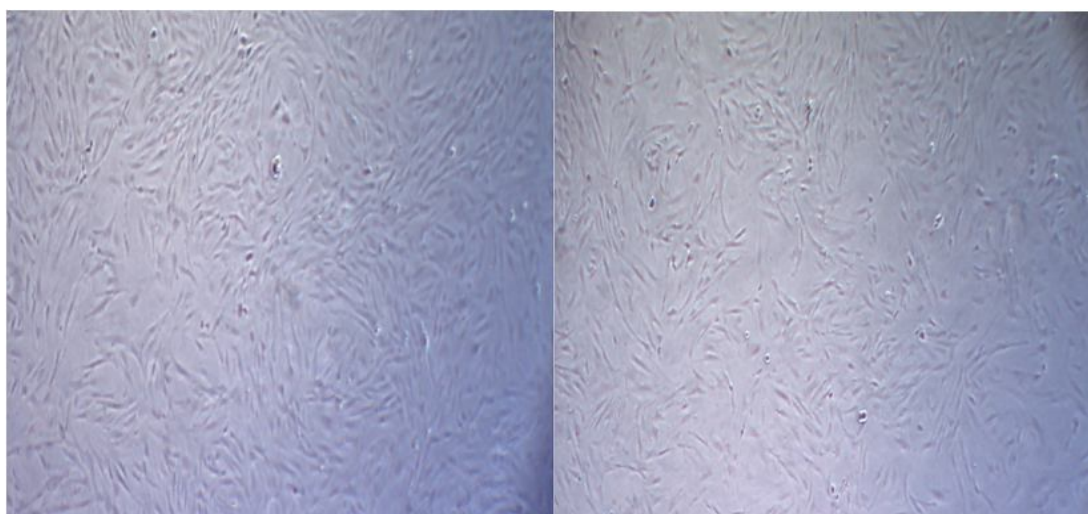
بررسی آپوپتوز با استفاده از روش TUNEL: تکنیک تشخیصی آپوپتوز بر اساس دستورالعمل کیت تانل (Roche, Germany) انجام پذیرفت. به طور خلاصه، محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی پس از تیمار ۴۸ ساعته در چهار گروه اشاره شده در مطالب قبلی تخلیه شد و پس از ۳ بار شستشو با PBS به وسیله محلول پارافرمالدهید

۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت گردید. سپس محلول Blocking ($3\text{H}_2\text{O}_2$ درصد در متانول) به مدت ۱۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه گردید و پس از شستشو با PBS در محلول Permeabilisation (تریتون ۰/۱ درصد در PBS ۰/۱ درصد) قرار داده شد. پس از خشک کردن اطراف نمونه ۵۰ میکرو لیتر محلول Reactionmixture به سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و جعبه‌ی مرطوب قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر محلول Converter-POD اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت بررسی در میکروسکوپ نوری ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتر محلول DAB-substrate اضافه شده و ۲۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس با PBS شسته شده و ۲۰ میکرو لیتر DAB-Chromogen اضافه گردید. پس از شستشوی دوباره با PBS و مانت کردن به وسیله PBS و گلیسرول، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید.

آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام گردید و تمامی داده‌ها به صورت Mean $\pm$ SEM ارائه شد. پس از مشخص شدن توزیع نرمال داده‌ها، مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY انجام شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ < P در نظر گرفته شد. در ضمن تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار گردید.

یافته‌ها

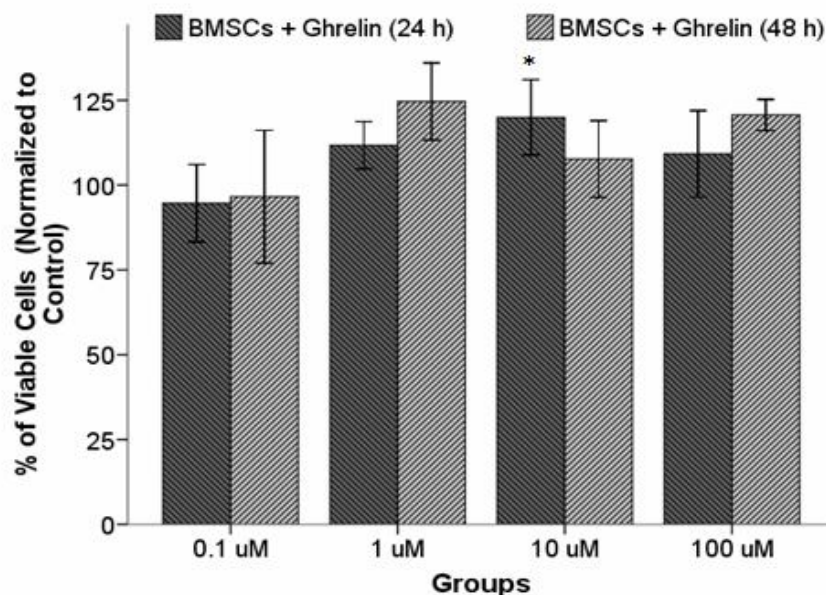
کشت سلول‌های BMSCs: نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها دارای ظاهری فیرو بلاستی با قابلیت اتصال به ظروف کشت و توانایی تقسیم می‌باشند. زمان اتصال سلول‌های استرومایی مغز استخوان به ظروف کشت در حدود ۶ الی ۱۲ ساعت دیده شد (شکل ۱).



شکل ۱؛ پاساژ اول (سمت راست) - پاساژ سوم (سمت چپ) - بزرگنمایی $200\times$

نتایج آزمون MTT: نتایج آزمون MTT نشان‌دهنده‌ی افزایش تکثیر سلول‌های BMSC در گروه تیمار شده با گرلین نسبت به گروه کنترل بود (نمودار ۱). سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار گرلین در زمان ۲۴ ساعت بالاترین میانگین رشد را نشان داد ($119/96 \pm 5/54$)، که نسبت به گروه

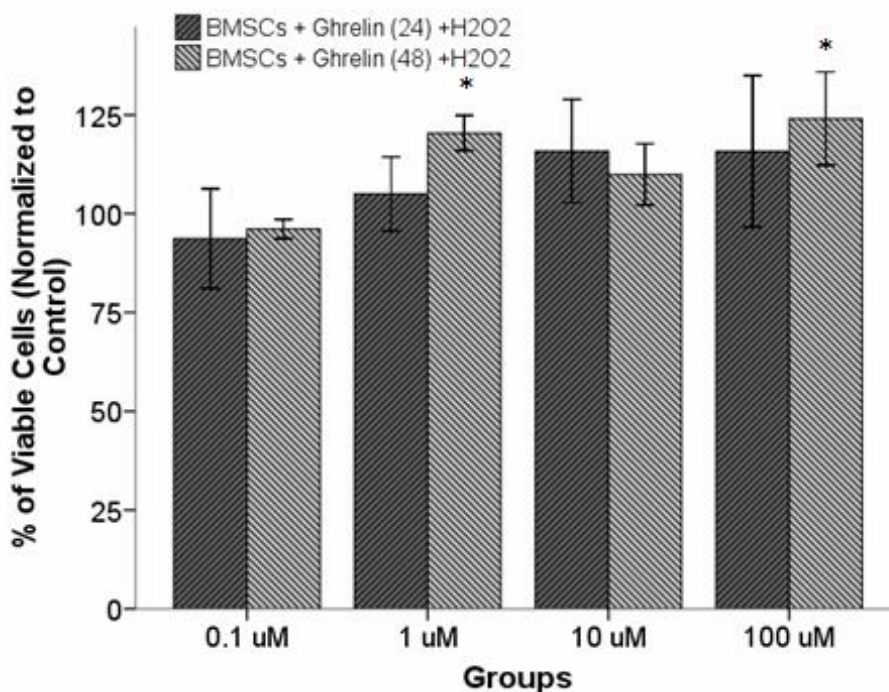
۰/۱ میکرومولار گرلین ($94/98 \pm 5/70$)، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/05$). نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که افزایش سرعت تکثیر در سلول‌های استرومایی به غلظت گرلین موجود در محیط کشت بستگی دارد.



نمودار ۱؛ تاثیر غلظت‌های مختلف گرلین بر تکثیر و بقای سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی
* نشان‌دهنده ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه ۰/۱ میکرومولار گرلین

نسبت به گروه‌های ۰/۱ و ۱ و ۱۰ به ترتیب $(96/11 \pm 1/20)$ ، $(120/38 \pm 2/22)$ ، $(109/93 \pm 3/87)$ به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($P < 0/05$).

تاثیر گرلین بر میزان بقای سلول‌های BMSC در شرایط استرس ناشی از H_2O_2 در نمودار ۲ نشان داده شده است. زیست پذیری گروهی از سلول‌ها که گرلین ۱۰۰ میکرومولار را به مدت ۴۸ ساعت دریافت کردند $(124/05 \pm 5/90)$.



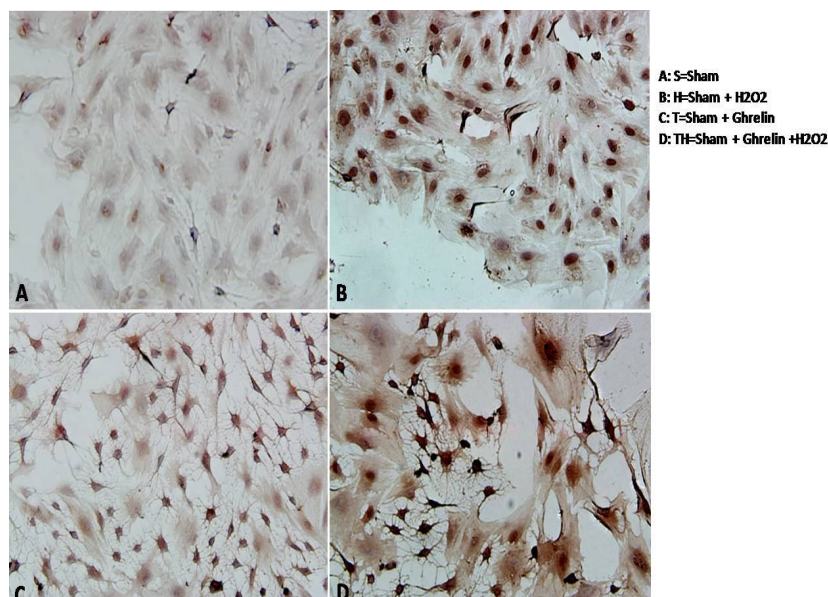
نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف گرلین بر تکثیر و بقای سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی

در شرایط استرس ناشی از H_2O_2

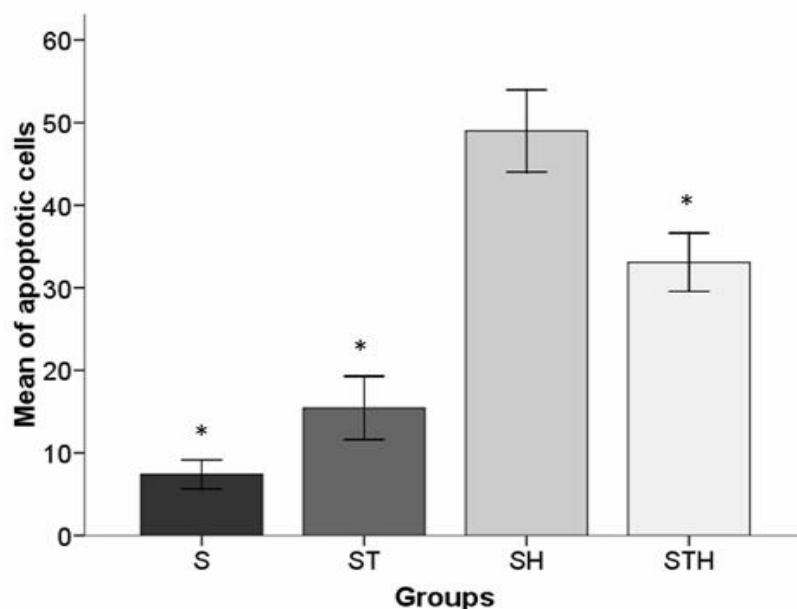
* نشان‌دهنده ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه ۰/۱ میکرومولار گرلین

نسبت به گروهی که در شرایط آسیب اکسیداتیو بوده و گرلین دریافت نکرده است میزان آپوپتوز کمتر بوده و نیز در گروه کنترل نسبت به گروهی که فقط با دوز ۱۰۰ میکرومول گرلین تیمار شده بودند، میزان آپوپتوز بیشتر بوده است ($P < 0/05$) (شکل ۲ و نمودار ۳).

تعیین میزان آپوپتوز در گروه‌های مورد مطالعه در شرایط استرس اکسیداتیو: پس از بررسی سلول‌ها توسط روش تانل، نتایج حاصل شده بدین صورت بود که میانگین میزان آپوپتوز در گروه سلولی که تحت شرایط استرس اکسیداتیو H_2O_2 (۱۲۵ میکرومولار) بوده و گرلین با دوز ۱۰۰ میکرومولار دریافت کرده‌اند در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری



شکل ۲: سلول‌های بنیادی مغز استخوانی موش صحرایی رنگ‌آمیزی شده توسط روش تانل (A) گروه کنترل سلول‌های بنیادی مغز استخوانی موش صحرایی (B) گروه سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی که تحت تاثیر آسیب اکسیداتیو با $125H_2O_2$ میکرومولار قرار گرفته است. (C) سلول‌هایی که با گرلین ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده‌اند. (D) سلول‌هایی که در معرض استرس اکسیداتیو با $125H_2O_2$ میکرومولار بوده و به مدت ۴۸ ساعت نیز گرلین ۱۰۰ میکرومولار دریافت کرده است. هسته‌های قهوه‌ای رنگ سلول‌ها تانل مثبت بوده که نشانگر رنگ گرفتن کروماتین هسته سلولی آپتوز شده است. (بزرگنمایی $\times 200$)



نمودار ۳: بررسی میانگین میزان آپتوز در گروه‌های مورد مطالعه (S): گروه شم (ST): گروه شم که با گرلین ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده است. (SH): گروه شم که با $125H_2O_2$ میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شده‌اند. (STH): گروهی که با گرلین ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده و ۳۰ دقیقه با $125H_2O_2$ میکرومولار در معرض استرس اکسیداتیو قرار گرفته‌اند. ستون‌ها نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف از میانگین می‌باشند. * گروه ST و S با گروه SH مقایسه شده‌اند ($P < 0.05$)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن گرلین با دوز ۱۰۰ میکرومولار به محیط کشت سلول‌های BMSC تیمار شده با پراکسید هیدروژن به مدت ۴۸ ساعت، میزان بقای این سلول‌ها را افزایش داده و درعین حال درصد مرگ سلولی را نیز تقلیل داده است. این یافته‌ها با آنچه محققین پیش‌تر گزارش کرده‌اند همخوانی دارد. در سال ۲۰۰۴ نانزر و همکارانش نشان دادند که گرلین از طریق فعال کردن مسیر MAPK سبب تکثیر سلول‌های سوماتوتروف هیپوفیزی می‌شود (۱۷). همچنین یو و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که تیمار با گرلین، میزان تکثیر سلول‌های IEC-6 روده‌ای را از همان مسیر پیام‌رسانی افزایش می‌دهد (۱۸). در سال ۲۰۱۴ لی و همکارانش عنوان داشتند که گرلین از طریق فعال کردن پروتئین کیناز C و PI3-Kinase سبب افزایش تکثیر لنفوسیت‌های T می‌گردد (۱۹). در مطالعه‌ای توسط Dong و گروهش در سال ۲۰۱۵، مشخص گردید که گرلین ($10^{-8} \mu\text{M}$) میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی را که به داخل بافت ایسکمیک قلب تزریق می‌شدند را افزایش می‌دهد (۲۵). علاوه بر این اثرات میتوژنیک که در مورد گرلین گزارش شده، نقش ضد آپوپتوزی این پپتید نیز مورد بررسی قرار گرفته است که موید نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشند. در سال ۲۰۰۲، بالدانزی و همکارانش نشان دادند که تیمار با گرلین، مرگ کاردیومیوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند (۲۱). در مطالعه‌ای توسط هوانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹، گزارش شد که گرلین با مهار مولکول‌های پروآپوپتوتیک مسیر میتوکندریایی، منجر به اثرات نوروپروتکتیومی گردد (۲۲). در سال ۲۰۱۲ توسط یانگ و گروهش مطالعه‌ای صورت گرفت که در آن تیمار با گرلین آپوپتوز ناشی از آنژیوتنسین ۲ را در کاردیومیوسیت‌ها کاهش داد (۲۳). ما نیز پیش از این در

مطالعه‌ای *in vivo*، تاثیر ضد آپوپتوزی گرلین را در بافت کلیه موش صحرایی نشان دادیم (۲۶). اما علی‌رغم این گروه از تحقیقات که حاکی از اثرات ضد آپوپتوزی گرلین است، نتایج متناقض دیگری نیز در گذشته گزارش شده که یا این نقش را قائل نیستند، یا نوعی نقش تنظیم‌کنندگی برای این پپتید ارائه دادند و یا حتی میزان مرگ سلولی را افزایش می‌داد. البته نوع نتایج به دوز درمانی گرلین، مدت تیمار و نوع بافت مورد استفاده بستگی داشته است. خردمند و همکاران در ۲۰۱۲ گزارش کردند که گرلین در مورد آپوپتوز اسپرماتوزوئیدها نقش تنظیم‌کنندگی داشته، به نحوی که در تومور این سلول‌ها و نه در سلول‌های سالم سبب افزایش آپوپتوز می‌گردد (۲۷). در سال ۲۰۱۳ نیز بونفیلی و همکاران نشان دادند که گرلین میزان آپوپتوز را در رده سلول‌های سرطانی کولون افزایش می‌دهد (۲۸). علی پرستی و همکاران در سال ۲۰۱۵ اظهار داشتند که گرلین نسبت *bax/bcl-2* و در نتیجه آپوپتوز را در بافت قلب حیوانات نگهداری شده در هیپوکسی مزمن را افزایش می‌دهد (۲۹). و در نهایت اینکه در سال ۲۰۱۶ در مطالعه لای و همکاران آمده که گرلین تاثیری بر میزان آپوپتوز نوتروفیل‌های انسانی ندارد (۳۰). البته در مطالعه‌ی حاضر نیز، در گروهی که سلول‌های BMSC نرمال با گرلین ۱۰۰ میکرومولار تحت تیمار قرار گرفتند، اثرات توکسیک مشاهده گردید. این نتیجه که می‌تواند ناشی از محیط کشت عاری از سرم و یا مقدار دوز گرلین باشد، به بررسی بیشتر نیاز دارد. در سال ۲۰۱۰ علیپور و همکارانش گزارش کردند که تزریق روزانه گرلین منجر به ایجاد پلی سیستمی شدید در موش‌های صحرایی می‌گردد (۳۱). سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک و اجدادشان در مغز استخوان توسط سلول‌های مزانشیمی احاطه شده‌اند و این سلول‌ها فاکتورهای رشد مؤثر در خون‌سازی را تولید می‌کنند. در واقع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به‌عنوان یک‌لایه

به استفاده درمانی از این پپتید در محیط کشت ترغیب نماید.

تشکر و قدردانی

یافته‌های این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجویان گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده‌ی پزشکی زنجان، آقای مسعود دادخواه و خانم بهناز شاهشوندی با کد A-10-914-1 و با کد اخلاق ZUMS.REC.1394.164 می‌باشد. بر خود لازم می‌دانیم تا از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان به لحاظ حمایت مادی و معنوی، صمیمانه قدردانی نمائیم.

References

- 1- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.
- 2- Spencer SL, Sorger PK. Measuring and modeling apoptosis in single cells. center for cell decision processes, department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115; USA.
- 3- Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:405-13.
- 4- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1986; 25: 1058-71.
- 5- Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal.* 2015; 13: 39.
- 6- Clement MV, Ponton A, Pervaiz S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and

تغذیه‌کننده برای سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک هستند (۳۲-۳۵). به این ترتیب، اینکه گرلین بتواند مستقیماً و یا با واسطه BMSC ها روی خون‌سازی اثر بگذارد، خود می‌تواندفاق جدیدی را باز نماید.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، تیمار سلول‌های BMSC با گرلین به گونه‌ای وابسته به دوز، هم‌زیست پذیری این سلول‌ها را افزایش می‌دهد و هم آن‌ها را در برابر آسیب استرس اکسیداتیو محافظت می‌نماید. این یافته‌ها می‌تواند محققین را

- reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett.* 1998; 440: 13-8.
- 7- Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 15681-86.
 - 8- Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; 174: 249-82.
 - 9- Zhang F, Wang C, Jing S, et al. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 expresses in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stimulates their proliferation. *Exp Cell Res.* 2013; 319: 1054-1059.
 - 10- Farrell MJ, Fisher MB, Huang AH, Shin JI, Farrell KM, Mauck RL. Functional properties of bone marrow-derived MSC-based engineered cartilage are unstable with very long-term in vitro culture. *J Biomech.* 2014; 47: 2173-82.

- 11- Xu YQ, Liu ZC. Therapeutic potential of adult bonemarrow stem cells in liver disease and delivery approaches. *Stem Cell Rev.* 2008; 4: 101-12.
- 12- Pirzad Jahromi G, Shabanzadeh Pirsaraei A, Sadr SS, et al. Multipotent bone marrow stromal cell therapy promotes endogenous cell proliferation following ischemic stroke. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015; 42: 1158-67.
- 13- CF Peng, XX Tian, J Deng, et al. ASSA14-03-23 CREG over-expression in BMSC protect against myocardial infarction via VHL/HIF-1 α /VEGF pathway mediated vascularisation. *Heart* 2015; 101: A16.
- 14- Wang S. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.* 2012; 5.
- 15- Zhang F, Ren T, WU J. TGF- β 1 induces apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of mitochondrial reactive oxygen species production. *Exp Ther Med.* 2015; 10: 1224-28.
- 16- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is agrowth-hormone-releasingacylated peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402: 656-60.
- 17- Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, et al. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151: 233-40.
- 18- Yu H, Xu G, Fan X. The effect of ghrelin on cell proliferation in small intestinal IEC-6 cells. *Biomed Pharmacother.* 2013; 67: 235-9.
- 19- Lee JH, Patel K, Tae HJ, et al. Ghrelin augments murine T-cell proliferation by activation of the phosphatidylinositol-3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling pathways. *FEBS Lett.* 2014; 588: 4708-19.
- 20- Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation.* 2001; 104: 1430-5.
- 21- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol.* 2002; 159: 1029-37.
- 22- Hwang S, Moon M, Kim S, Hwang L, Ahn KJ, Park S. Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *Endocr J.* 2009; 56: 609-17.
- 23- Yang C, Wang Y, Liu H, et al. Ghrelin protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012; 59: 465-71.
- 24- Liang QH, LiuY, Wu SS, Cui RR, YuanLQ, Liao EY. Ghrelin inhibits the apoptosis of MC3T3-E1 cells through ERK and AKT signaling pathway. *Toxicol Apply Pharmacol.* 2013; 272: 591-597.

- 25- Han D, Huang W, Ma S, et al. Ghrelin improves functional survival of engrafted adipose-derived mesenchymal stem cells in ischemic heart through PI3K/Akt Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 858349.
- 26- Almasi S, Shahsavandi B, Aliparasti MR, Alipour MR, Rahnama B, Feizi H. The anti-apoptotic effect of ghrelin in the renal tissue of chronic hypoxic rats. *Physiol Pharmacol*. 2015; 19: 114-20.
- 27- Kheradmand A, Dezfoulan O, Alirezaei M, Rasoulia B. Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 419: 299-304.
- 28- Bonfili L, Cuccioloni M, Cecarini V, et al. Ghrelin induces apoptosis in colon adenocarcinoma cells via proteasome inhibition and autophagy induction. *Apoptosis*. 2013; 18: 1188-200.
- 29- Aliparasti MR, Alipour MR, Almasi S, Feizi H. Ghrelin administration increases the bax/bcl-2 gene expression ratio in the heart of chronic hypoxic rats. *Adv Pharm Bull*. 2015; 5: 195-99.
- 30- Li B, Zeng M, Zheng H, et al. Effects of ghrelin on the apoptosis of human neutrophils in vitro. *Int J Mol Med*. 2016; 38: 794-802.
- 31- Alipour MR, Feizi H, Mohaddes G, Keyhanmanesh R, Khamnei S, Ansarin K, Ebrahimi H: Effect of exogenous ghrelin on body weight and hematocrit of male adult rats in chronic Hypoxia. *Int J Endocrinol Metab*. 2010; 8: 201-205.
- 32- Cherry YR, Toki J, Asou H, et al. Production of hematopoietic stem cell-chemotactic factor by bone marrow stromal cells. *Blood*. 1994; 83: 964-71.
- 33- Guerriero A, Worfard L, Holland HK, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood*. 1997; 90: 3444-55.
- 34- Mehrasa R, Vaziri H, Oodi A, et al. Mesenchymal Stem cells as a feeder layer can prevent apoptosis of expanded hematopoietic stem cells derived from cord blood. *Int J Mol cell Med*. 2014; 3: 1-10.
- 35- Dasilva CL, Goncalves R, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-porada G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol*. 2005; 33: 828-35.

The Antiapoptotic Effect of Ghrelin in the H₂O₂ Treated Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells of Rat

Abdanipour AR¹, Shahsavandi B², Dadkhah M², Alipour M², Feizi H²

¹Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

²Dept. of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

Corresponding Author: Feizi H, Dept. of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

E-mail: hfeizik@zums.ac.ir

Received: 29 Nov 2016 **Accepted:** 20 Feb 2017

Background and Objective: Apoptosis is a form of programmed cell death and oxidative stress is one of the factors that lead to apoptosis. Ghrelin is a 28 amino acid peptide and its antiapoptotic effects have been shown previously. The aim of this study was to evaluate the effect of ghrelin on cell survival and apoptosis of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs).

Materials and Methods: BMSCs were cultured as control and H₂O₂ treated groups with and without different doses of ghrelin (0.1-1-10-100 μ M) for 24 and 48 hours. To find out the best dose and time of effect for ghrelin, MTT was used to determine cell survival. BMSC apoptosis rate was detected using the TUNEL technique.

Results: Cultured BMSCs showed that the cells are fibroblastic in appearance and adherent to culture dishes as well as being capable of having a very high proliferation rate. Ghrelin treatment increased proliferation and cell survival in both normal and H₂O₂ exposed BMSCs. The best dose and time that ghrelin could affect cell proliferation was 100 μ M and 48 hours respectively. Treatment with ghrelin significantly reduced apoptosis in BMSCs in this dose and time.

Conclusion: Ghrelin treatment causes an increase in BMSCs proliferation and reduction of H₂O₂ induced apoptosis in these cells.

Keywords: Apoptosis, Ghrelin, H₂O₂, BMSC, Rat