

توانمندسازی برون تنی سلول‌های عصبی و گلیالی

موش سوری در استروئیدسازی به دنبال فعال‌سازی

مسیر SHH و تیمار توأم با پرگنولون

زهرا ارسلانی^۱، آرش اسفند^۲، ایزدپناه قیطاسی^۳، فاطمه بیژنی^۴، کوروش نگین تاجی^۵، مهرزاد جعفری برمک^۶، امیر قنبری^{۷*}

^۱کمیتة تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۲مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: استروئیدسازی در بعضی از بافت‌های غیرجنسی نظیر سیستم عصبی گزارش گردیده است و در فعالیت‌های طبیعی، تکامل و عملکرد سیستم عصبی مؤثر می‌باشد. توانمند نمودن سلول‌های پارانشیم مغز و شناسایی مسیرهای سیگنالی دخیل در استروئیدسازی می‌تواند کاهش سنتز استروئیدها در سنن بالتر را جبران نماید. بنابراین هدف از این مطالعه تعیین و توانمندسازی برون تنی سلول‌های عصبی و گلیالی موش سوری در استروئیدسازی به دنبال فعال‌سازی مسیر SHH و تیمار توأم با پرگنولون بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۰ انجام شد، ابتدا سلول‌های بنیادی عصبی (گلیال) از کورتکس جنین ۱۴ روزه موش سوری حامله به روش استاندارد تهیه و گسترده گردید. زنده مانی سلول‌های بنیادی عصبی پس از تیمار با پرگنولون ۵ میکرومولار به همراه غلظت‌های مختلف پیومورفامین (۲۰ و ۱۰، ۵، ۲، ۱) میکرومولار و Gant61 به روش MTT انجام شد. سپس سلول‌ها در محیط تمایزی قرار گرفته و پس از تیمار با غلظت‌های مختلف وانکوباسیون ۵ روزه محیط رویی سلول‌ها در محیط کشت سلول‌ها برداشته شد و به روش الیزا و HPLC مقدار تستوسترون و استروژن اندازه گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین داده‌های حاصل از زنده مانی گروه‌ها نشان از افزایش زنده مانی به دنبال تیمار با پیومورفامین (۱۱۴/۳) در مقایسه با گروه Gant61 (۶۳/۶۷) داشت ($p < 0.001$). میانگین داده‌های هورمون پروژسترون در محیط رویی سلول‌های گلیالی عصبی نشان داد که گروه‌های پیومورفامین (۲۸۷/۲) در مقایسه با گروه‌های کنترل (۸۸/۲۸) و Gant61 (۴۰/۵) افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). همچنین میانگین داده‌های هورمون تستوسترون نشان می‌دهد گروه‌های پیومورفامین (۷۳۰/۸) در هر دو روش الیزا و HPLC افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (۱۵۳/۸) و Gant61 (۵۲/۹۲) داشته است ($p < 0.001$). همچنین میانگین داده‌ها در گروه پرگنولون (۲۳۶/۵) در مقایسه با گروه Gant61 (۴۰/۵) افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$). آنالیز میانگین داده‌های استروژن در روش HPLC نشان می‌دهد که افزایش معنی‌داری در گروه‌های پیومورفامین (۳۳۱/۲) در مقایسه با گروه کنترل (۱۱۴/۸) و Gant61 (۴۲/۱۱) در تولید استروژن وجود دارد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: داده‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که القای مسیر SHH به وسیله پیومورفامین موجب افزایش تولید هورمون‌های استروئیدی (استروژن - پروستروژن و تستوسترون) به وسیله سلول‌های تمایزی گلیالی - عصبی می‌شود که مهار این مسیر نتایج برعکس را به دنبال داشته است. بنابراین از داده‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که القا مسیر SHH می‌تواند موجب تولید استروئیدها گردد.

واژه‌های کلیدی: استروئید، مسیر سیگنالی SHH، سلول‌های عصبی، گلیالی، پیومورفامین، موش سوری

*نویسنده مسئول: امیر قنبری، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی

Email: amirghanbari52@yahoo.com

مقدمه

شواهد زیادی از سنتز استروئید موضعی در اندام‌های غیر از غدد جنسی و آدرنال وجود دارند. استروئیدها در مغز مهره داران مختلف از جمله؛ ماهی، دوزیستان، پرندگان، جوندگان و انسان‌ها به صورت محلی تولید می‌شوند. هورمون‌های استروئیدی، نقش‌های فیزیولوژی مهمی دارند و اثرات چند گانه روی بعضی از اندام‌های هدف مثل غدد جنسی، کبد و سیستم عصبی دارند که این هورمون‌ها در سیستم عصبی نورواستروئید شناخته می‌شوند. نورواستروئیدها می‌توانند در سیستم عصبی مرکزی تولید شوند و همچنین از کلسترول و یا از متابولیسم واسطه‌های استروئیدی که در محیط تولید شده‌اند سنتز می‌شوند^(۱). نورون‌ها در مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی استروئیدها را سنتز می‌کنند و برای عملکردهای پیچیده مانند رفتار، محافظت از عصب و شناخت به ویژه در هیپوکامپ مهم است. سلول‌های گلیال مغز می‌تواند در بدن نورواستروئیدها را سنتز کند. شناسایی مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی می‌تواند در ساخت نورواستروئیدها مؤثر باشد. در نتیجه، بسیار مهم است که مسیر سیگنالی و مکانیسم دخیل در بیوسنتز و تنظیم نورواستروئیدها را شناسایی و با استفاده از تحریک این مسیرها استروئیدسازی را فعال کنیم. در این فرآیند تبدیل کلسترول به پرگنولون به وسیله سیتوکروم P450^(۱) در میتوکندری انجام می‌شود^(۲). وجود سیتوکروم P450scc اولین بار در مغز موش و انسان تشخیص

داده شد که این فعالیت در سلول‌های گلیال حایز اهمیت می‌باشد. پرگنولون به وسیله آنزیم ۳- بتا هیدرکسی استروئید دهیدروژناز در میتوکندری و سیتوپلاسم به پروژسترون تبدیل می‌شود. پروژسترون و استروژن، معمولاً به عنوان هورمون‌های جنسی زنانه نامیده می‌شوند و همچنین می‌توانند به عنوان تنظیم کننده‌های مهم عملکردهای عصبی و حیاتی نورون‌ها در سیستم عصبی زن و مرد عمل کنند. برای مثال، نشان داده شده است که پروژسترون نقش مهمی در زنده ماندن و شکل‌پذیری سلول‌های عصبی دارد و همچنین در تشکیل غلاف میلین نقش دارد، که باعث عایق‌بندی و محافظت از آکسون‌ها می‌شود. برای اهداف بالینی، اهمیت شناسایی مسیر سیگنالینگ و داروها و موادی که بر این مسیرها اثر می‌گذارند حایز اهمیت است. به دلیل محدودیت کار با بافت‌های انسان استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی حیوانات آزمایشگاهی و انسان با توانایی تمایز به نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها رایج بوده و می‌تواند در کاهش سوگیری و کم کردن گزینه‌های مداخله‌ای در پژوهش‌ها مؤثر می‌باشد^(۳ و ۲).^۱ با تمایز این سلول‌ها می‌توان نورون‌ها و گلیالها را ایجاد کرد و به دنبال آن می‌توان مسیر سیگنالینگ درون سلولی سلول‌های نورونی و یا گلیالی تمایز یافته را با مواد مصنوعی تحریک و یا مهار کرده و نقش این مسیرها

1-P450scc

را در نورواستروئیدسازی مشخص کرد و از این خاصیت برای تهیه مواد بیولوژیک استفاده نمود(۴).

پژوهش‌های گذشته نشان دادند که مسیر سیگنالی SHH^(۱) تنظیم کننده مهم الگوی جنینی، بازسازی بافت، تجدید سلول‌های بنیادی و رشد سرطان است و همچنین در استروئیدسازی دخیل است. این مسیر را می‌توان با موادی نظیر پیورمورفامین^(۲) فعال نموده و با GANT61 مهار کرد(۴).

پیورمورفامین^(۲) از پورین مشتق شده و آگونیست گیرنده SMO^(۳) که یک ترکیب حیاتی مسیر سیگنالی SHH است را هدف قرار می‌دهد(۵). شولتز و همکاران نشان دادند که پیورمورفامین تمایز استئوبلاست را از سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی القا می‌کند و پیش‌ساز استئوبلاست‌ها ایجاد می‌شود(۶). علاوه بر این، پیورمورفامین، بقای سلولی را در سلول‌های HT22 در پاسخ به یک اکسید کننده افزایش می‌دهد(۷). پیورمورفامین همچنین در فعال‌سازی سیستم ضدالتهابی آندروژنی درون سیستم عصبی مرکزی نقش مهمی دارد(۸). اخیراً کشف شده است که پیورمورفامین از نورون‌های قشری محافظت می‌کند و نقص‌های عصبی بعد از سکته مغزی ایسکمیک در موش‌های صحرایی را برمی‌گرداند(۹). پیورمورفامین نیز نقش محافظتی سلول‌های عصبی علیه آسیب ناشی از خون‌ریزی زیر عنکبوتیه در موش‌های صحرایی عمل می‌کند(۱۰).

GANT61 یک بازدارنده انتخابی فعال‌سازی انکوژنیک با واسطه GLI1 و GLI2 است. پژوهش‌های پیش‌بالینی برای بسیاری از انواع سرطان از جمله؛ رابدومیوسارکوم، نوروبلاستوما، لوسمی و همچنین سرطان‌های روده بزرگ، پانکراس، دهانه رحم، پوست، ریه، سر و گردن و معده انجام شده است(۱۱). اگرچه نتایج امیدوارکننده قابل توجهی گزارش شده است، اثر بیولوژیکی GANT61 در HCC، به ویژه سلول‌های HCC تمایز نیافته، مشخص نشده است. پژوهش‌ها اثر ضد توموری GANT61 را در سلول‌های HCC تمایز نیافته و که بیان بیشتری از فاکتورهای رونویسی GLI را نسبت به سلول‌های HCC خوب تمایز یافته نشان می‌دهند. داده‌های اولیه شده محققان نشان می‌دهد که GANT61 به طور قابل توجهی تکثیر سلولی و زنده ماندن را پس از درمان دارویی کاهش می‌دهد. فنوتیپ‌های بدخیم، مانند تشکیل کره و مهاجرت، با کاهش بیان ژن‌های مربوط به انتقال اپیتلیال و مزانشیمی(EMT) به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. همچنین بیان ژن GLI تا حدی به وسیله سیگنال‌های غیر متعارف، از جمله؛ مسیر SHH, IHH, DHH در این سلول‌ها تنظیم می‌شود. داده‌ها نشان می‌دهد که استفاده از یک بازدارنده مستقیم رونویسی GLI ممکن است برای درمان هپاتوسلولار کارسینوما تمایز نیافته مفید باشد(۱۲).

حال با توجه به پژوهش‌های محققان، مسیر سیگنالی SHH در تنظیم الگوی رشد و فعالیت‌های

1-Sonic Hedgehog(SHH)

2-Purmorphamine

3-Smoothened (SMO)

متابولیسم سلول‌های بنیادی جنینی نقش بسزای ایفاء می‌نماید و از طرفی داروهای شیمیایی مختلف می‌توانند با مهار یا فعال نمودن این مسیر سیگنالی سبب ناهنجاری یا تغییرات عمده در تنظیم الگوی این روندها در دوران رشد را سبب شوند. فلذا استفاده از مسیرهای سیگنالی درون سلولی می‌تواند در تولید مواد بیوژنیک و هورمونی دخیل باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین و توانمندسازی برون تنی سلول‌های عصبی و گلیالی موش سوری در استروئیدسازی به دنبال فعال‌سازی مسیر SHH و تیمار توأم با پرگنولون بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، که در سال ۱۴۰۰ انجام شد، ابتدا موش‌های حامله ۱۴ روزه با مخلوط ۳-۴ درصد گاز ایزوفلورن و اکسیژن بی‌هوش شدند و بعد از ایجاد جا به جایی در مهره‌های گردنی موش مادر، جنین موش‌ها خارج گردید. جنین موش‌ها به آرامی با HEM^(۱) استریل، سرد و شستشو شدند تا آلودگی‌های نظیر خون و مو برداشته شود. سپس در زیر میکروسکوپ استریو جنین‌ها را از درون رحم جدا و سر جنین موش‌ها را جدا نمودیم و پس از در آوردن مغز جنین‌ها ناحیه برجستگی گانگلیونی جانبی^(۲) را تشریح نمودیم و آن را به قطعات کوچک تبدیل نموده و بر اساس پروتکل کشت سلول‌های

بنیادی عصبی در محیط کشت مناسب حاوی گلوتامکس، پنستروپ و DMEM^(۳) حاوی فاکتور رشد اپیدرمال^(۴) و در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد به مدت ۵ روز انکوبه شدند. در این مدت نوروسفرها شکل گرفتند. سپس نوروسفرهای نسل اول با پاساژ سلولی ازدیاد شد و برای اثبات تمایز به گلیال و نورون به مدت ۵ روز در محیط تمایزی انکوبه و ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی توبولین GFAP و انجام و مشخصاً نورون و گلیالی بودن آنها تأیید شد (شکل ۱). در نهایت سلول‌های بنیادی منتج از نوروسفرها ابتدا در چاهک‌های مختلف محیط تمایزی به سلول‌های نورونی و گلیالی تمایز داده شدند و آزمایش‌های مورد نظر پس از تیمار این سلول‌ها به روش‌های زیر انجام گرفت.^۲

حدود بیست هزار سلول به پلیت ۲۴ خانه منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و به روش تصادفی ساده به گروه‌های مختلف تقسیم شدند؛ گروه کنترل، گروه‌های پیومورفامین و Gant61 با غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰) میکرومولار و پرگنولون ۵ میکرومولار می‌باشند. همه چاهک‌ها به غیر از گروه کنترل با پرگنولون ۵ میکرومولار تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت از

1-Minimum Essential Medium Eagle (MEM) HEPES Modification

2- Ganglionic Eminence Lateral

3- Epidermal Growth Factor

انکوباسیون و خارج کردن محیط روی سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از اضافه نمودن محلول MTT ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان استحصال می‌شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر DMSO خالص جایگزین محیط انکوبه شده با MTT گردید و به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار گرفتند. در نهایت میزان رنگ بنفش به وجود آمده نشان دهنده توان زیستی سلول‌های تیمار شده می‌باشد. جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر مورد سنجش قرار گرفت. اثر هر غلظت دارو به صورت سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد بقاء سلول‌ها محاسبه شد (شکل ۲).

در ادامه گروه‌های دیگری از سلول‌های گلیالی به پلیت ۱۲ خانه منتقل شدند. ۲۴ ساعت به سلول‌ها اجازه داده شد تا به کف پلیت بچسبند و سپس به روش تصادفی ساده به گروه‌های مختلف تقسیم شدند. به غیر از گروه کنترل همه چاهک‌ها با پرگنولون ۵ میکرومولار تیمار گردید و در ادامه سلول‌های گروه‌های آزمایش نیز با غلظت‌های (۵ و ۱۰) میکرومولار پیورمورفامین و Gant 61 تیمار شدند و به مدت ۵ روز برای ارزیابی توان آنها در استروئیدسازی انکوبه گردید. بعد از زمان‌های مورد نظر بر اساس پروتکل زیر مراحل کار انجام گرفت.

پس از تیمار و انکوباسیون سلولی محیط روی سلول‌ها از هر چاهک به طور جداگانه برداشته شد و

برای بررسی میزان استروئیدهای پروژسترون و استروژن و تستوسترون به روش زیر مورد استفاده قرار گرفت.

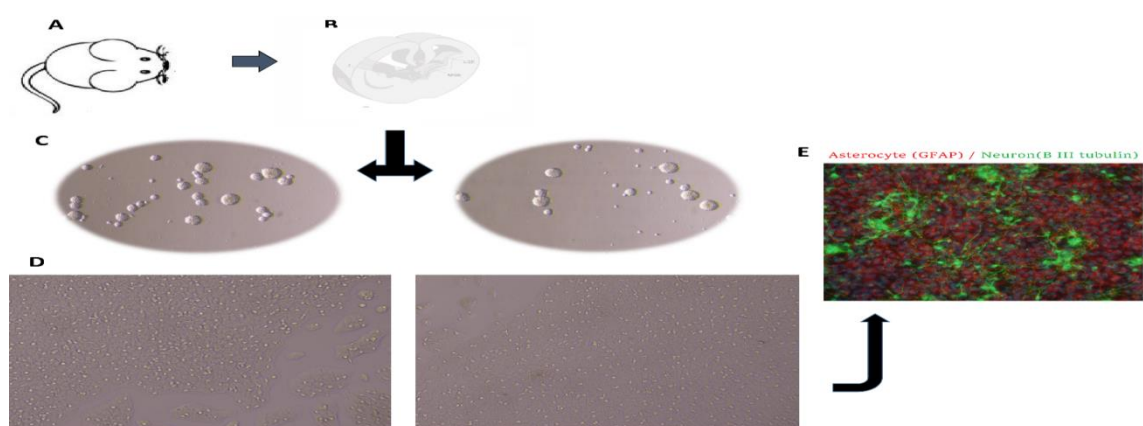
برای محاسبه غلظت مجهول هورمون‌ها، نمودار کالیبراسیون غلظت‌های مشخصی از ماده استاندارد در مقایسه با مساحت منحنی استاندارد رسم و با تزریق نمونه‌های مجهول به دستگاه داشتن سیگنال (مساحت منحنی ماده مجهول) غلظت ماده مجهول به دست می‌آید. که از سیستم کروماتوگرافی شرکت کناور که مجهز به دتکتور UV-VIS 2550 و ستون Zorbax SB-C18 (ابعاد میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتری) برای آنالیز هورمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا نمونه‌های استاندارد در غلظت‌های مشخص به دستگاه کروماتوگرافی تزریق و سیگنال کروماتوگرافی در برابر غلظت هورمون‌ها رسم گردید. سپس نمونه‌های مجهول با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ده دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفتند و بعد از عبور از فیلتر سرسرنگی به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شدند. از طریق منحنی کالیبراسیون ماده استاندارد مقدار هورمون با استفاده از سیگنال کروماتوگرافی محاسبه و غلظت هر هورمون به دست می‌آید (شکل ۴ و ۳). برای تعیین دقت و تکرارپذیری روش، غلظت‌های استاندارد از هر هورمون در حلال مناسب در طی سه روز مختلف، هر بار یک سری تهیه شدند و بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها و تزریق به HPLC، مساحت سطح زیر منحنی هورمون‌ها محاسبه شد و با توجه به منحنی استاندارد سطح زیر پیک هورمون‌ها به غلظت تبدیل شد. در

۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام استروئیدهای کونژوگه به هر کدام از چاهکها اضافه و دوباره به وسیله نوار چسب پوشانده و به مدت ۱ ساعت دیگر در دمای اتاق انکوبه شد. آسپیراسیون و شستشوی چاهکها بدین طریق که ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به هر کدام از چاهکها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و دور از تابش نور قرار داده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به هر کدام از چاهکها اضافه شد. جذب نوری هر کدام از پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. پس از اتمام کار تحقیقاتی ظروف کشت سلولی بر اساس پروتکل آزمایشگاه کشت سلولی به وسیله اتوکلاو امحاء گردیدند.

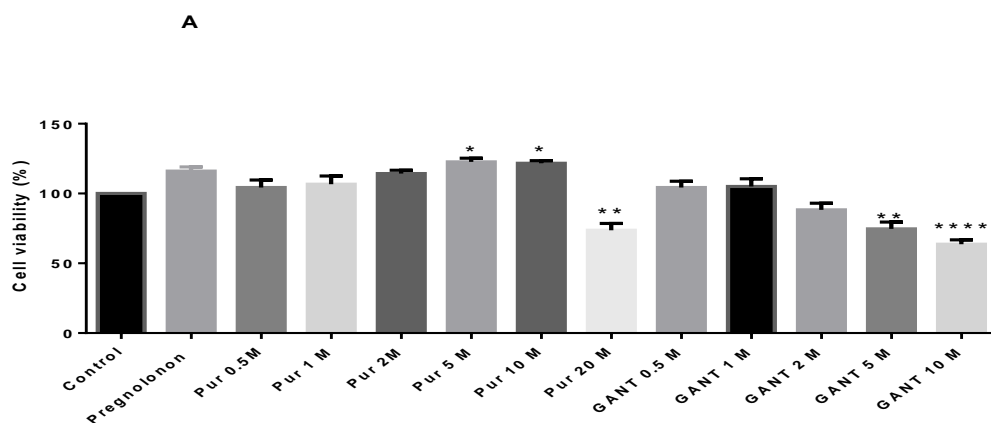
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism و آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

نهایت درصد ضریب تغییرات که معرف دقت و درصد خطا که نمایانگر تکرارپذیری روش است محاسبه شد. پس از تیمار و انکوباسیون سلولی محیط روی سلول‌ها روی هر کدام از چاهکها به طور جداگانه برداشته شدند و برای میزان استروئیدهای پروژسترون و استروژن و تستوسترون به روش زیر مورد استفاده قرار گرفت. معرف‌ها، رقت‌های استاندارد و نمونه‌ها بر اساس روش ذکر شده در کیت تهیه شدند.

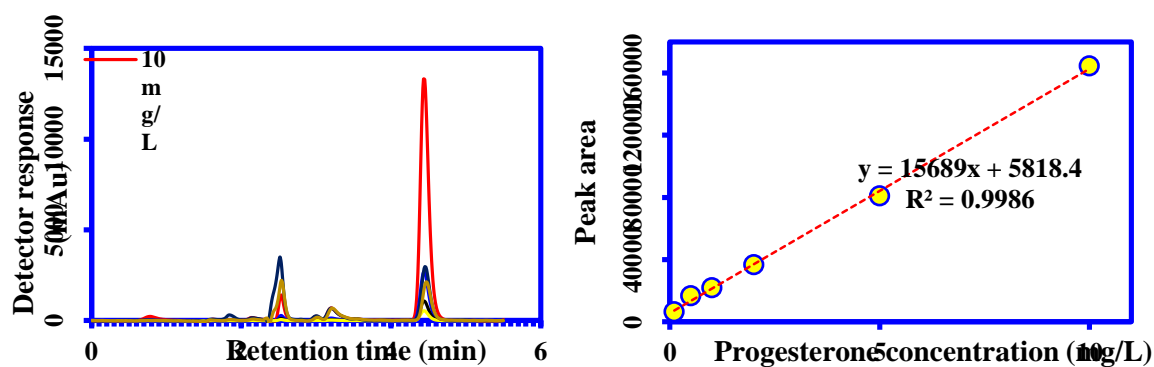
۵۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده به هر کدام از چاهکها اضافه و ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد، کنترل یا تست نیز به چاهک‌های مربوطه اضافه و به مدت ۱ دقیقه و به آرامی تکان داده شد. سپس پلیت‌ها با استفاده از نوارچسب پوشانده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. هر کدام از چاهکها آسپیره و شستشو و پلیت مخصوص وارونه روی دستمال کاغذی تمیز قرار داده شد تا بافر شستشوی باقیمانده از چاهکها خارج شود.



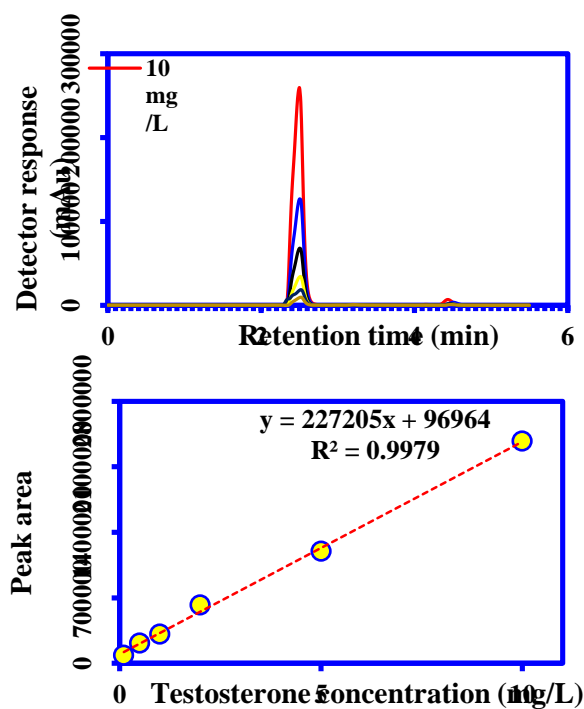
شکل ۱: دیانگرام کلی تهیه سلول و تأیید سلول‌های عصبی گلیالی، A و B: موش حامله ۱۴ روزه و برداشتن ناحیه برجستگی گانگلیونیک خارجی C: نور سفرهای شکل گرفته پس از کشت سلول‌های بنیادی عصبی مغز جنین ۱۴ روزه موش سوری D: سلول‌های منتج از نورسفرها در محیط تمایزی قرار داده شده و به سلول‌های عصبی گلیالی تمایز یافتند. E: سلول‌های تمایزی با رنگ آمیزی فلورسنتی خاص برای سلول‌های نورونی - گلیالی با آنتی بادی B tubulin و GFAP تأیید شدند.



شکل ۲: نمودار زنده مانی گروه‌های مورد مطالعه



شکل ۳: کروماتوگرام طیف استاندارد و منحنی کالیبراسیون هورمون پروژسترون



شکل ۴: کروماتوگرام طیف استاندارد و منحنی کالیبراسیون هورمون تستوسترون

یافته‌ها

به دنبال تیمار با پیوموفارمین Gant61، میانگین زنده‌مانی سلول‌های عصبی در گروه پیوموفارمین ۵ و ۱۰ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.01$) و میانگین Gant61 با غلظت ۱۰ میکرومولار کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.001$) (شکل ۱).

تیمار با پیوموفارمین موجب شد میانگین میزان پروژسترون در محیط رویی سلول‌ها در مقایسه با گروه‌های Gant61 و کنترل و پرگنولون افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$). همچنین مقایسه بین گروه‌های پیوموفارمین ۱۰ و ۵ نشان داد که میانگین میزان پروژسترون در گروه پیوموفارمینی ۱۰ میکرومولار در مقایسه با گروه ۵ میکرومولار افزایش معنی‌داری دارد ($p < 0.01$) (شکل ۶ و ۵).

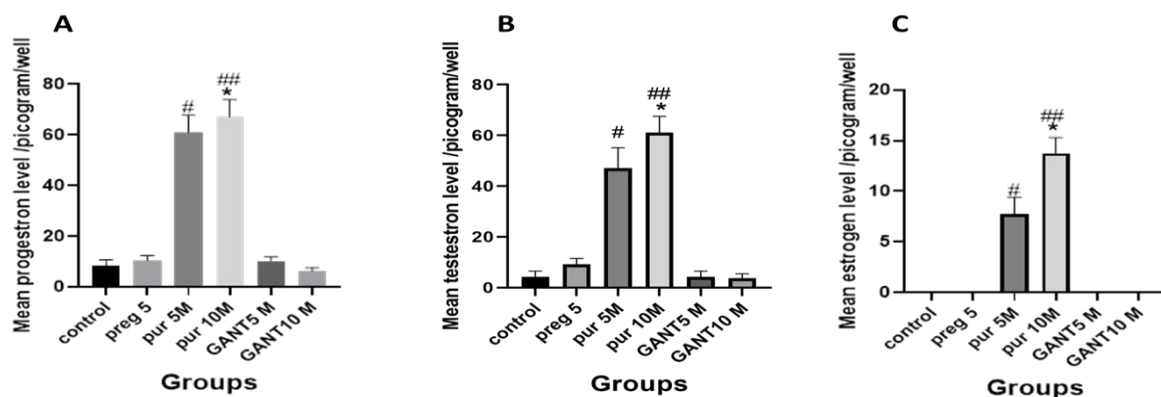
داده‌های حاصل از روش HPLC نیز موید این موضوع بوده است به طوری که میانگین میزان پروژسترون در گروه‌های تیمار با پیوموفارمین در مقایسه با همه گروه‌های دیگر (کنترل، پرگنولون و Gant 61) افزایش معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0.001$). همچنین میانگین میزان پروژسترون بین گروه‌های Gant 61 با غلظت ۱۰ میکرومولار در مقایسه با گروه Gant61 با غلظت ۵ میکرومولار افزایش معنی‌داری نشان داده شد ($p < 0.01$). میانگین پروژسترون در گروه پرگنولون در مقایسه با گروه‌های Gant61 نیز افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۱ قسمت A).

میانگین تستوسترون در گروه‌های

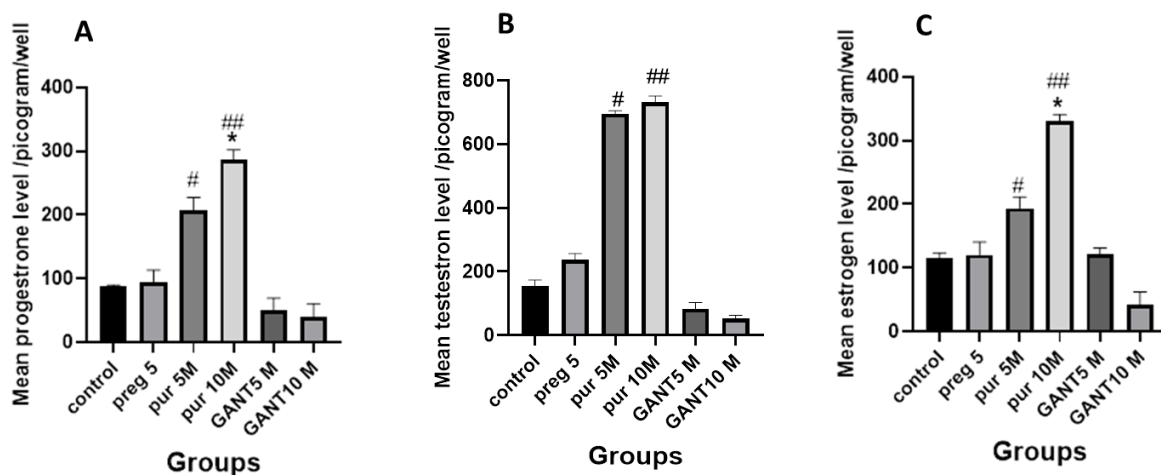
پیوموفارمین ۵ و ۱۰ میکرومولار در مقایسه با گروه‌های کنترل و Gant 61 (با غلظت‌های ۵ و ۱۰) افزایش معنی‌دار داشت ($p < 0.01$)، همچنین میانگین تستوسترون در گروه Gant 61 با غلظت ۱۰ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ($p < 0.05$). مقایسه بین گروه‌های پیوموفارمین نیز نشان داد که پیوموفارمین ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری در میزان تستوسترون در مقایسه با گروه ۵ میکرومولار دارد ($p < 0.01$) (شکل ۶ و ۵ قسمت B). از طرفی میانگین داده‌های اندازه‌گیری شده تستوسترون به روش HPLC از افزایش این هورمون در محیط کشت پس از تیمار با پیوموفارمین در مقایسه با سایر گروه‌ها حکایت دارد ($p < 0.01$) (شکل ۶ و ۵ قسمت B). میانگین میزان استروژن در گروه‌های کنترل و پرگنولون و Gant61 صفر بوده است و فقط در گروه‌های پیوموفارمین اندازه‌گیری شد. میانگین میزان استروژن محیط سلولی در گروه پیوموفارمین ۵ و ۱۰ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.01$). مقایسه بین گروه‌های پیوموفارمین نیز نشان داد که تیمار با پیوموفارمین ۱۰ موجب افزایش استروژن در مقایسه با گروه‌های پیوموفارمین ۵ میکرومولار داشته است ($p < 0.01$) (شکل ۶ و ۵ قسمت C). برعکس میانگین داده‌های استروژن حاصل از HPLC نشان داد که میزان استروژن در محیط کشت که این هورمون در همه گروه‌ها قابل اندازه‌گیری بوده است و آنالیز

هم‌چنین میانگین استروژن در گروه کنترل و پرگنولون در مقایسه با Gant61 افزایش معنی‌داری داشته است ($p \leq 0.04$) (شکل ۶ و ۵ قسمت C).

داده‌ها نشان داد که در گروه‌های تیمار با پیومورفامین در مقایسه با گروه کنترل و Gant61 پرگنولون افزایش معنی‌داری داشته است ($p \leq 0.001$).



شکل ۵: نمودارها داده‌های هورمون‌های استروئیدی به روش الیزا، A: آنالیز داده‌ها و قیاس بین گروهی نشان از افزایش تولید پروژسترون در گروه‌های پیومورفامین در مقایسه با گروه‌های دیگر دارد. B: داده‌های تستوسترون در گروه‌های پیومورفامین افزایش معنی‌داری نشان داد C: پروژسترون در گروه‌های پیومورفامین قابل اندازه‌گیری بود که گروه پیومورفامین ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌دار در مقایسه با همه گروه‌های دیگر داشت



شکل ۶: نمودارهای داده‌های هورمون‌های استروئیدی به روش HPLC، A: آنالیز داده‌های پروژسترون نشان از افزایش معنی‌دار تولید پروژسترون در گروه‌های پیومورفامین در مقایسه با گروه‌های دیگر دارد و گروه پرگنولون در مقایسه با گروه‌های Gant61 افزایش معنی‌داری دارد. B: داده‌های تستوسترون ساخته شده در گروه‌های پیومورفامین افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان داد و پرگنولون در مقایسه با گروه‌های Gant61 افزایش معنی‌داری نشان داد. C: میانگین پروژسترون در گروه‌های پیومورفامین در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری نشان داد، به طوری که گروه پیومورفامین ۱۰ میکرومولار در مقایسه با پیومورفامین ۵ میکرومولار افزایش معنی‌دار داشته و گروه کنترل و پرگنولون در مقایسه با همه گروه Gant61 ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری داشت. A: درصد زنده مانی سلول در گروه‌های Gant61 با غلظت‌های مختلف در مقایسه با گروه‌های پیومورفامین و گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد.

بحث

جستجو برای ترکیبات دارویی جدید به منظور کنترل مسیرهای سیگنالینگ و درمان ناهنجاری‌های مختلف در دوران جنینی برای اکثر محققان قابل توجه می‌باشد. ترکیبات طبیعی یا شیمیایی تولید شده با مکانیسم ثانویه بر روی این مسیرهای سلولی-مولکولی استفاده شده است (۱۴). لذا هدف از این مطالعه ارزیابی اثر داروی پیومورفامین و GANT61 بر مهار یا فعالیت مسیر سیگنالی SHH بود. در سال‌های اخیر کشف مکانیسم داروهای مؤثر در مهار یا فعالیت مسیرهای سیگنالینگ پیشرفت فراوانی داشته است. به دنبال بررسی این مکانیسم‌ها فاکتورها و آنزیم‌های مختلفی کشف شده که خود واسطه‌های مهار یا فعال نمودن آبخاری از پروتئین‌های مختلف را ایجاد می‌کند تا بتوانند الگوی رشد جنینی را به درستی تنظیم نمایند، یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم P450scc می‌باشد که فعالیت آن قبلاً در سراسر مغز موش بالغ در مخلوطی از سلول‌های گلیالی نورونی گزارش شده است (۱۳-۱۵). همچنین تولید پرگنولون در محیط کشت سلول‌های گلیالی نورونی در پژوهش‌های قبلی ارایه شده است که نورون‌های قشر مغز، شبکیه، اعصاب محیطی موش و عصب سیاتیک انسانی، سایت‌هایی برای بیان P450scc بوده و توانایی تولید پرگنولون را دارند (۱۶-۱۸). مطالعه حاضر نشان داد که در گروه کنترل استروئیدسازی (پروژسترون، تستوسترون و استروژن) به میزان اندکی به وسیله سلول‌های متمایز عصبی - گلیالی ساخته شد و در

گروهی که پرگنولون به عنوان پیش‌ساز استروئیدها اضافه شد میزان استروئیدسازی بیشتر از گروه کنترل بود، اما معنی‌دار نبوده است. همچنین بر اساس داده‌های پژوهش‌های قبل الیگودندروسیت‌ها اولین سلول‌های سیستم عصبی هستند که آنزیم کلیدی استروئیدوژنیک دیگر یعنی bHSD3 را بیان می‌کنند و قادر به تبدیل پرگنولون به پروژسترون و دی‌هیدرو تستوسترون به اندرستندین است (۱۹ و ۱۸، ۱۳). این که این توانایی دخالتی در میلین‌سازی که عمده فعالیت‌های الیگودندروسیت و سلول‌های شوان بوده نامشخص می‌باشد (۲۱ و ۲۰). البته این فعالیت یعنی تبدیل کلسترول به استروئیدهای دیگر در سلول‌های آستروسیتی و نورون نیز به کرات گزارش شده است (۲۳ و ۲۲). از طرفی در حضور میکروگلیا تبدیل استروئیدها متوقف می‌گردد (۲۵ و ۲۴) و برداشت سلول‌های میکروگلیالی از محیط کشت موجب آغاز مجدد تبدیل و تولید نورواستروئیدها می‌گردد که می‌تواند به دلیل مهار آنزیم P450c17 باشد (۲۷ و ۲۶). به نظر می‌رسد توانایی تولید استروئیدهای خاصی مثل دی‌هیدرو تستوسترون در بعضی سلول‌های گلیالی نظیر آستروسیت بیشتر است که شاید به توانایی این سلول در بستر و پارانشیم سیستم عصبی باشد (۲۸). در مغز، فعالیت سلولی تحت کنترل تعاملات پیچیده‌ای از عوامل متعدد، از جمله فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها، نوروپپتیدها، انتقال دهنده‌های عصبی و استروئیدها که ممکن است به میزان کمی در محیط کشت وجود

داشته باشند (۲۹ و ۲۸). بنابراین در محیط کشت از مخلوطی از سلول‌های سیستم عصبی که بتوانند با یکدیگر تعامل داشته و همچنین ریز مغذی‌های گفته شده که قابل کنترل بوده که می‌توانند بستر مناسبی برای بررسی دخالت مسیر سیگنالینگ سلولی در فرآیند استروئیدسازی باشند. بنابراین در این مطالعه مسیرهای پیام رسان که از دیر باز مورد توجه محققان برای تولید مواد بیولوژیک بوده و پژوهش‌های گسترده در این زمینه موجود است طراحی شد و بررسی داده‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مسیر SHH در تولید استروئیدها اثرگذار بوده است، به طوری که فعال کردن مسیر SHH موجب افزایش تولید پروژسترون در هر دو روش HPLC و الیزا گردید. در عوض مهار این مسیر با استفاده از Gant 61 موجب کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های پیومورفامینی شد، حتی در مقایسه با گروه کنترل نیز کاهش مشاهده می‌گردد. تولید استروژن در گروه‌های مطالعه، بیشتر در گروه‌های پیومورفامین قابل اندازه‌گیری و مشاهده است که عدم اندازه‌گیری آن در گروه‌های دیگر در مقایسه با سلول‌ها نیاز به زمان بیشتری داشته تا به محصول نهایی استروئیدها یعنی بر استروژن دست یافته، اما دلیل رو به افزایش میزان اندازه‌گیری در گروه پیومورفامین می‌تواند ناشی از اثر فعالیت مسیر SHH و این که این فعالیت موجب تسریع در استروژن‌سازی به وسیله سلول‌های عصبی و گلیالی شده است، باشد. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از داروی پیومورفامین با غلظت‌های ۵ و

۱۰ میکرومولار احتمالاً توانسته است مسیر سیگنالی SHH را تحریک و روند سنتز استروژن، پروژسترون و تستوسترون را در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش دهد که با پژوهش‌های دیگر محققان هم‌خوانی دارد (۴). سینه‌ها و همکاران نشان دادند که سلول‌های گلیالی می‌توانند ترکیبات نورواستروئیدی با استفاده از مسیر سیگنالینگ سلولی سنتز نمایند که با پژوهش‌های حاضر هم‌خوانی داشته است. وانگ و همکاران نشان دادند که سلول‌های نرونی با استفاده از آنزیم P450 توانسته‌اند استروئید لازم جهت ترمیم و آسیب‌های وارده به سلول‌های مغز را با استفاده از مسیرهای سلولی-مولکولی سنتز نمایند که با پژوهش‌های این تحقیق هم‌خوانی دارد (۲۴).

از محدودیت‌های این مقاله می‌توان به عدم تشکیل سلول‌های نروسفر در غلظت‌های مختلف دارو در مراحل تیمار اشاره کرد که در نتیجه اثرات استروئیدسازی مشاهده نشد، بنابراین روش اجرا مجدداً بررسی و تکرار گردید. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که در آینده از این غلظت‌های استفاده شده در سلول‌های بنیادی بافت‌های دیگر جنین هم به کار رود تا مقایسه‌ای بهتر برای اثرات فعالیت‌های این داروها به دست آید.

نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که القای مسیر SHH به وسیله پیومورفامین موجب افزایش تولید هورمون‌های استروئیدی (استروژن-

پروستروژن و تستوسترون) به وسیله سلول‌های تمایزی گلیالی - عصبی می‌شود که مهار این مسیر به وسیله 61 Gant نتایج عکس را به دنبال داشته است، بنابراین از داده‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که القا مسیر SHH می‌تواند موجب تولید استروئیدها گردد.

تقدیر و تشکر

محققان این طرح از مسئولین مرکز تحقیقات گیاهان دارویی برای استفاده از امکانات آن مرکز تشکر می‌نمایند، ضمناً این طرح با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1399.120 در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده پزشکی اجرا شد.

REFERENCES

1. Diotel N, Charlier TD, Lefebvre d'Hellencourt C, Couret D, Trudeau VL, Nicolau JC, et al. Steroid transport, local synthesis, and signaling within the brain: roles in neurogenesis, neuroprotection, and sexual behaviors. *Frontiers in Neuroscience* 2018; 12: 84.
2. Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nature Chemical Biology* 2006; 2(1): 29-30.
3. Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *Journal of the American Chemical Society* 2002; 124(49): 14520-1.
4. Peterson R, Turnbull J. Sonic hedgehog is cytoprotective against oxidative challenge in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012; 47(1): 31-41.
5. Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting smoothened. *Nature Chemical biology* 2006; 2(1): 29-30.
6. Chechneva O, Mayrhofer F, Daugherty D, Krishnamurthy R, Bannerman P, Pleasure D, et al. A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell death & Disease* 2014; 5(10): e1481-e.
7. Hu Q, Li T, Wang L, Xie Y, Liu S, Bai X, Zhang T, Bo S, Xin D, Xue H, Li G. Neuroprotective effects of a smoothened receptor agonist against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017; 10: 306.
8. Sanne JL, Krueger KE. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Journal of Neurochemistry* 1995; 65(2): 528-36.
9. Strömstedt M, Waterman MR. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Molecular Brain Research* 1995; 34(1): 75-88.
10. Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K. Age-and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes P450scc, P450c17 and 3 β -HSD in the postnatal rat brain. *Brain Research* 1998; 801(1-2): 233-8.
11. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothened. *Oncotarget* 2015; 6(16): 13899.
12. Kool M, Jones DT, Jäger N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothened inhibition. *Cancer Cell* 2014; 25(3): 393-405.
13. Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu E. Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1994; 48(1): 145-54.
14. Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84(23): 8215-9.
15. Mellon SH, Descheppe CF. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Research* 1993; 629(2): 283-92.
16. Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V. Neurosteroidogenesis in rat retinas. *Journal of Neurochemistry* 1994; 63(1): 86-96.
17. Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein J, Mellon SH. Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 1995; 136(6): 2689-96.
18. Zwain IH, Yen SS. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology* 1999; 140(2): 880-7.
19. Giulian D, Baker TJ. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *Journal of Neuroscience* 1986; 6(8): 2163-78.
20. Jung-Testas I, Baulieu E. Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular biology* 1998; 65(1-6): 243-51.
21. Melcangi R, Magnaghi V, Galbiati M, Martini L. Glial cells: a target for steroid hormones. *Progress in Brain Research* 2001; 132: 31-40.
22. Ludwig PE, Das JM. Histology, glial cells. In: StatPearls [Internet] 2021 May 10. StatPearls Publishing.

- 23.Silva NJ, Dorman LC, Vainchtein ID, Horneck NC, Molofsky AV. In situ and transcriptomic identification of microglia in synapse-rich regions of the developing zebrafish brain. *Nature Communications* 2021; 12(1): 1-12.
- 24.Wang J, Zhang Q, Lu Y, Dong Y, Dhandapani KM, Brann DW, Yu RK. Ganglioside GD3 is up-regulated in microglia and regulates phagocytosis following global cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry* 2021; 158(3): 737-52.
- 25.Soares NL, Vieira HL. Microglia at the Centre of Brain Research: accomplishments and challenges for the future. *Neurochemical Research* 2021 Sep 29:1-6.
- 26.Farahani F, Khaksari M, Amiresmaili S, Iranpour M, Shahrokhi N, AsadiKaram G, et al. Possible involvement of female sex steroid hormones in intracellular signal transduction mediated by cytokines following traumatic brain injury. *Brain Research Bulletin* 2022; 178: 108-19.
- 27.Lopes B, Sousa P, Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Mendonça C, et al. Peripheral nerve injury treatments and advances: one health perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(2): 918.
- 28.Hidalgo-Lanussa O, Baez-Jurado E, Echeverria V, Ashraf GM, Sahebkar A, Garcia-Segura LM, et al. Lipotoxicity, neuroinflammation, glial cells and oestrogenic compounds. *Journal of Neuroendocrinology* 2020; 32(1): e12776.
- 29.Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 1999; 140(8): 3843-52.

Empowerment of Balb/C Mouse Neuron and Glial Cells in Steroidogenesis After Activation of the SHH Signaling Pathway and Co-Treatment with Pregnenolone

Arsalan Z¹, Asfaram A², Ghitasi I², Bizhani F², Negintaji K⁴, Jafari Barmak M³, Ghanbari A^{3*}

¹Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ²Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ⁴Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Received: 11 Jan 2022 Accepted: 06 Mar 2022

Abstract:

Background & aim: Steroid production has been reported in the asexual tissues of the nervous system. Stimulants are in the normal activity, function and function of the nervous system. Identifying the conduction pathways involved in glucocorticoids and enabling brain parenchymal cells can offset the balance in the active nervous system at old ages when the body is depleted. Therefore, in this study, by increasing the activity of sonic hedgehog (SHH) pathway attempted by purmorphamine and its capacity by Gant 61, the effect of this pathway on steroid process in culture medium of glial neurons is evaluated.

Methods: The present experimental study was conducted in 2021. First, neuronal stem cells were obtained from the cortex of a 14-day-old embryonic mice by standard methods. Survival of neuronal stem cells after treatment with 5 μ M pregnenolone with different concentrations of purmorphamine (1,2,5, 10 and 20) and Gant 61 was performed by MTT method. Then the cells were placed in a differentiation medium and after treatment with different concentrations and 5-day incubation, the surface of the cells was removed from the cell culture medium and the amount of testosterone and estrogen were measured by ELISA and HPLC. Data were analyzed using ANOVA statistical test using graph pad software.

Results: The survival data of the groups indicated an increase in survival after treatment with purmorphamine (114.3) compared to the Gant 61 group (63.7 Pg) ($p \leq 0.5$). Progesterone data in the supernatant of glial neurons showed that purmorphamine groups (287.2 Pg) had a significant increase compared to control (88.28) and Gant 61 (40.5 Pg) groups ($p \leq 0.001$). Also, testosterone data show that purmorphamine groups (73.8 Pg) in both ELISA and HPLC methods have a significant increase compared to the control (153.8 Pg) and Gant61 (52.92 Pg) groups ($p \leq 0.0001$). Also, pregnenolone group (236.5 Pg) showed a significant increase compared to Gant61 (40.5 Pg) group ($p \leq 0.05$). Analysis of estrogen data by HPLC method showed that there was a significant increase in estrogen production in the purmorphamine groups (331.2 Pg) compared to the control (42.11 Pg) and Gant61 (42.11 Pg) groups ($p \leq 0.0001$).

Conclusion: The data from this study indicated that the induction of the shh pathway by purmorphamine increased the production of steroid hormones (estrogen-progesterone and testosterone) by glial-neuronal differentiating cells, which inhibition of this pathway had the opposite effect. The present study concluded that induction of the shh pathway can lead to the production of steroids.

Keywords: SHH signal pathway, Balb/c Mouse, Neuron -glial cells, Steroid, Purmorphamine

***Corresponding author:** Ghanbari A, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Email: amirghanbari52@yahoo.com

Please cite this article as follows: Arsalan Z, Asfaram A, Ghitasi I, Bizhani F, Negintaji K, Jafari Barmak M, Ghanbari A. Empowerment of Balb/C Mouse Neuron and Glial Cells in Steroidogenesis After Activation of the SHH Signaling Pathway and Co-Treatment with Pregnenolone. Armaghane-danesh 2022; 27(3): 321-335.