

تحقیقی

اثر القایی دپرنیل و دی‌متیل سولفو کساید بر تکثیر و بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

فاطمه طاهری^۱، دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی*^۲، دکتر محمدتقی قربانیاں^۳، لیلی حسین پور^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان. ۲- اسنادیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان. ۳- کارشناس ارشد زیست شناسی تکوینی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان.

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از القاگرهای شیمیایی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بالغ (*bone marrow mesenchymal stem cells: BMSCs*) به سلول‌های عصبی مورد توجه محققین است و در ابتدا لازم است تا اثر سمیت القاگر شیمیایی بر سلول‌های تحت القاء بررسی گردد. بدیهی است افزایش درصد سلول‌های زنده پس از القاء می‌تواند بهترین معیار برای تعیین مناسب‌ترین القاء کننده باشد. این مطالعه به منظور تعیین اثرات القایی دپرنیل و دی‌متیل سولفو کساید (*DMSO*) بر تکثیر و بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۲۰ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار در دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. از مغز استخوان موش صحرایی بالغ استخراج و در محیط *aMEM* حاوی *FBS* ده درصد کشت داده شدند. در پاساژ سوم تعیین هویت سلولی برای آنتی‌ژن‌های سطحی *CD71* و *CD90* به روش ایمونوسیتوشیمی و قابلیت چندتوانی *BMSCs* با تمایز به سلول‌های چربی و استخوان انجام شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض عوامل القاگر (محیط کشت تکمیل شده با ۲ درصد دی‌متیل سولفو کساید و محیط کشت تکمیل شده با دپرنیل 10^{-8} مولار) قرار گرفتند و بعد از آن به محیط *aMEM* حاوی *FBS* ده درصد منتقل شدند. تکثیر و بقاء سلولی پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با روش آزمون *MTT* [*3-(4-(5-Dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری *SPSS-18* و آزمون‌های *One-Way ANOVA* و *Tukey* تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: سلول‌های چسبیده به فلاسک کشت که از مغز استخوان جدا شدند؛ علاوه بر بیان آنتی‌ژن‌های سطحی *CD71* و *CD90* توانایی تمایز به سلول‌های چربی و استخوان را داشته و نتایج حاصل از آزمون *MTT* نشان داد که بقاء و تکثیر سلول‌های القاء شده با دپرنیل و دی‌متیل سولفو کساید در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از القاء نسبت به گروه کنترل منفی به طور معنی‌داری افزایش داشته است ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: دپرنیل موجب افزایش بقاء و قابلیت تکثیر سلولی در مقایسه با دی‌متیل سولفو کساید شد و می‌توان این ترکیب را به عنوان القاگر سلولی مورد استفاده قرار داد.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، دپرنیل، دی‌متیل سولفو کساید، *MTT*

* نویسنده مسؤل: دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی، پست الکترونیکی kashani_tmu@yahoo.com

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، کد پستی ۳۶۷۱۶۴۱۱۶۷، تلفن ۰۲۳۲-۵۲۴۷۱۴۶، نامبر ۵۲۴۷۱۴۶
وصول مقاله: ۹۰/۶/۱۶، اصلاح نهایی: ۹۰/۷/۱۰، پذیرش مقاله: ۹۰/۸/۸

مقدمه

مغز استخوان (*BMSCs*) به سلول‌های عصبی از مولکول‌هایی مانند عوامل رشد، نوروتروفین‌ها و سایتوکین‌ها که عمدتاً در تکوین عصبی نقش داشتند؛ استفاده گردید (۷). القاء عصبی به سادگی و از طریق افزودن ترکیبات شیمیایی ویژه از قبیل دپرنیل، دی‌متیل سولفو کساید (*DMSO*)، بتامر کاپتوتانول، بوتیلات هیدروکسی آنیزول و سایر ترکیبات به محیط کشت انجام می‌شود. دپرنیل ترکیبی است که اثر نوروپروتکتیو داشته و از طریق دفع گونه‌های واکنشگر اکسیژن اثر آنتی‌آپوپتوتیک دارد و بقای سلول‌ها را می‌افزاید (۱۸-۲۰). این ترکیب با نام تجاری سلزین به عنوان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (*Mesenchymal Stem Cells*) (*MSCs*) حاصل از مغز استخوان به‌طور وسیع در درمان اختلالات عصبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سلول‌های بنیادی مغز استخوان سلول‌های چندتوان (*Multipotent*) هستند که می‌توانند به انواع سلول‌های رده مزانشیمی شامل استخوان، غضروف و چربی تمایز یابند (۱-۳). این سلول‌ها در شرایط *in vitro* و *in vivo* توانایی تمایز به سلول‌های غیر مزانشیمی مثل سلول‌های عصبی را نیز دارند (۱-۱۷). در مطالعات قبلی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

منتقل شدند؛ ج) سلول‌های کشت داده شده در محیط α MEM غنی شده با ۲ درصد DMSO که بعد از ۲۴ ساعت به محیط غنی شده با ۱۰ درصد FBS منتقل شدند و د) سلول‌های کشت داده شده در محیط α MEM غنی شده با 8×10^{-4} مولار دپرنیل که بعد از ۲۴ ساعت به محیط غنی شده با ۱۰ درصد FBS منتقل شدند.

ایمنوسیتوشیمی

به منظور تایید هویت BMSCs پس از کشت سلول‌ها بر روی لامل آغشته به ژلانتین با تراکم 5×10^4 سانتی متر مربع به روش ایمنوسیتوشیمی، از آنتی‌بادی‌های آنتی CD71 (۱:۲۰)، CD90 (Sigma)، و CD2063 (Miltenyi Biotec, 130-094-524) استفاده شد. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS به مدت ۲۰ دقیقه در پارافمالدهید ۴ درصد (Merck) ثبوت انجام شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در معرض Triton X-100 ۰/۳ درصد و مدت ۱۵ دقیقه در سرم ۱۰ درصد بز قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب در معرض آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند. در ادامه نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب با آنتی‌بادی ثانویه ضد موش کونژوگه با رودامین (NMM1767594, Millipore) در تاریکی انکوبه شدند. بعد از شستشو، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Nicon Eclipse, E 600, Japan) و دوربین دیجیتال (USA, DXM 120 Nikon Digital Camera) مطالعه و عکسبرداری شدند.

برای آزمون درستی روش کار با حذف آنتی‌بادی اولیه، واکنش مثبت کاذب کنترل گردید. برای هر یک از آنتی‌بادی‌ها در هر گروه سه بار تکرار انجام شد.

تمایز BMSCs به سلول‌های چربی

برای تمایز BMSCs به سلول‌های چربی، پس از کشت سلول‌های پاساژ دوم یا سوم در پلیت ۶ خانه با تراکم 5×10^4 سانتی متر مربع و رسیدن به تراکم ۹۰-۸۰ درصد محیط اختصاصی چربی‌ساز (adipocyte differentiation medium, stem cell technology) به این سلول‌ها اضافه شد و هر سه روز یک‌بار تعویض محیط انجام گردید. به‌تدریج تغییرات مورفولوژیک در این سلول‌ها ظاهر شد. تولید قطرات چربی در روز ۲۱ پس از القاء بررسی شد و سلول‌ها برای رنگ‌آمیزی با Oil Red ۵ mg/ml (Sigma, Oo625-25G) آماده شدند. پس از شستشو با PBS به مدت یک ساعت با الکل ۷۰ درصد فیکس شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با محلول رنگی OIL RED رنگ‌آمیزی انجام گرفت. پس از خارج کردن محلول رنگی و شستشوی سلول‌ها با الکل ۷۰ درصد مشاهده سلول‌ها و عکسبرداری انجام شد.

داروی ضدافسردگی معرفی شده و همچنین در درمان بیماری پارکینسون و برای تمایز سلول‌های بنیادی به نورون‌های دوپامینرژیک مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱ و ۲۲). DMSO نیز ترکیبی کرایوپروتکتنت بوده و همچنین به همراه ترکیبات دیگری مانند ریتینویک اسید، تامرکاپتوتانول و بوتیلات هیدروکسی آنیزول برای تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۴-۹). در عین حال گزارشاتی مبنی بر اثر سمی DMSO بر سلول‌های بنیادی وجود دارد که بعد از گذشت حدود ۲۴ ساعت باعث آپوپتوز ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود (۲۷-۲۵). همچنین برخی معتقدند که اثر القاگرهای شیمیایی موقتی بوده و در سطح بیان ژن‌ها عمل نمی‌کند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که تمایز با استفاده از القاگرهای شیمیایی واقعی نبوده و با تغییر اسکلت سلولی موجب تغییر مورفولوژی سلولی گردیده است (۲۷ و ۲۸). این مطالعه به منظور تعیین اثرات القایی دپرنیل و دی‌متیل‌سولفوکساید بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان انجام شد.

روش بررسی

جداسازی و کشت سلولی

این مطالعه تجربی روی ۲۰ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتوی رازی کرج در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات براساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان‌های فمور و تیبیای موش‌ها استخراج شد.

سلول‌ها در محیط (USA, Gibco) α MEM غنی شده با FBS (Gibco) ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک درصد در فلاسک (۲۵ سانتی متر مربع، Falcon) کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دی‌اکسید کربن ۵ درصد و شرایط مرطوب (۹۷ درصد) نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت با تعویض محیط، سلول‌های خونی غیرچسبنده جدا گردیدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۹۰-۸۰ درصد به کمک تریپسین (USA, Sigma) ۰/۲۵ درصد به همراه EDTA ۰/۰۲ درصد (USA, Sigma) سلول‌ها از کف فلاسک جدا و به نسبت ۱:۲ پاساژ داده شدند. هر ۳ روز یک‌بار تعویض محیط انجام شد. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سه استفاده گردید.

سلول‌ها به چهار گروه به شرح زیر تقسیم شدند.

الف) گروه کنترل مثبت شامل سلول‌های کشت داده شده در محیط α MEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS؛ ب) گروه کنترل منفی شامل سلول‌های کشت داده شده در محیط α MEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS که بعد از ۲۴ ساعت به محیط α MEM بدون FBS

تمایز BMSCs به سلول‌های استخوانی

برای تمایز BMSC به سلول‌های استخوانی، پس از کشت سلول‌های پاساژ دوم یا سوم در پلیت ۶ خانه با تراکم 5×10^4 سانتی متر مربع و رسیدن به تراکم ۹۰-۸۰ درصد محیط اختصاصی استخوان‌ساز (Osteocyte differentiation medium, stem cell technology) به این سلول‌ها اضافه شد و هر سه روز یک‌بار تعویض محیط انجام شد. فرآیند معدنی شدن ۲۱ روز پس از القاء مورد ارزیابی قرار گرفت. شستشوی سلول‌ها با PBS انجام شد و برای ثبوت به مدت ۱۰ دقیقه از متانول استفاده گردید و پس از تخلیه متانول محلول رنگی Alizarin Red یک درصد (sigma, A5533-23G) برای رنگ‌آمیزی استفاده شد.

ارزیابی حیات و تکثیر سلولی به روش MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] مقایسه و ارزیابی حیات BMSCs به روش MTT انجام شد (بیش از پنج نمونه در هر گروه). به این منظور سلول‌های پاساژ ۲ با تراکم 2×10^4 سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه کشت شد. به هر یک از خانه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت α -MEM دارای سرم ۱۰ درصد اضافه و تکثیر سلولی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. سپس محیط قبلی را خارج کرده و به هر کدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت α -MEM فاقد سرم به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma) را افزوده و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۴ ساعت، ۸۵ میکرولیتر از محیط رویی را برداشته و ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفو کساید اضافه گردید. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ nm با دستگاه ELIZA reader (BioTek) اندازه‌گیری شد (۲۹).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-18 و آزمون‌های One-Way ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر و مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ویژگی مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از استخوان

سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان در کشت اولیه به اشکال مختلف دیده شدند. در پاساژ اول جمعیت سلولی با مورفولوژی مشابه بیشتر شد؛ ولی از پاساژ دوم فنوتیپ سلولی یکدست گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، به سادگی به ظرف کشت چسبیده و تکثیر شدند. این سلول‌ها در شرایط کشت به سه شکل دیده شدند. تعدادی از سلول‌های در حال تکثیر ظاهری کروی و کوچک داشتند و برخی دیگر که بیشتر سلول‌ها را به خود

اختصاص داد؛ به شکل دوکی و شبه فیبروبلاستی دیده شد و برخی از سلول‌های به صورت پهن و بزرگ تر در محیط کشت دیده شدند (شکل یک).

در برخی شرایط کلنی‌های بزرگ سلولی در ظرف کشت نمایان می‌شود که به صورت کانون‌های زیای سلولی بر سرعت تکثیر افزوده و در زمان کوتاه‌تری به تراکم می‌رسند. ارزیابی میزان حیات سلولی نشان داد که ۹۵ درصد سلول‌های هر دو گروه در پاساژهای مختلف زنده بودند.

تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از استخوان و چربی به روش ایمونوسیتوشیمی

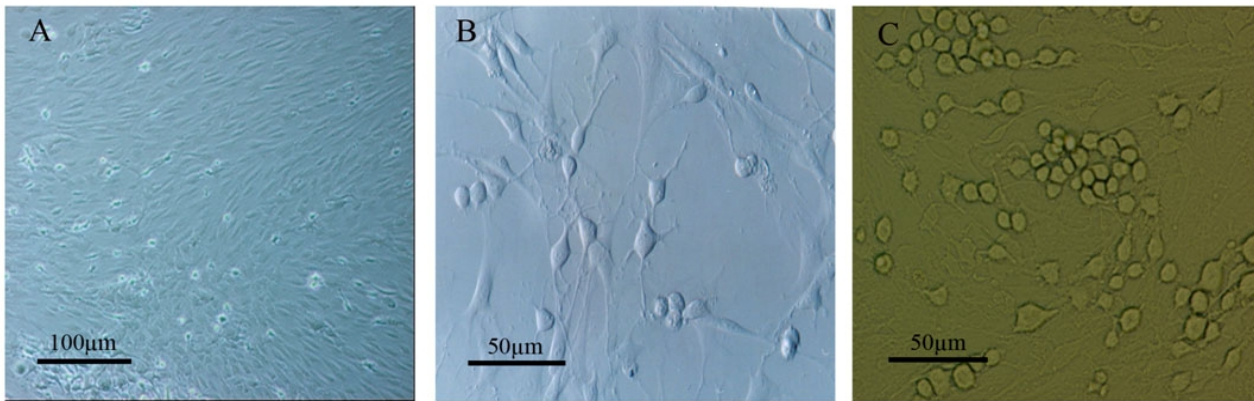
با وجود آن که تاکنون نشانگر اختصاصی برای BMSCs معرفی نشده است (۳۰)؛ ولی حضور برخی نشانگرها برای تعیین هویت و خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بررسی ایمونوسیتوشیمی برای نشانگرهای CD71 و CD90 نشان داد که تقریباً همه BMSCs به این دو نشانگر واکنش مثبت دادند. همانگونه که در شکل ۲ دیده می‌شود؛ بیشتر سلول‌ها به این نشانگر واکنش داده که توسط میکروسکوپ فلورسانس به رنگ سبز (FITC) برای CD71 و قرمز (رودامین) برای CD90 دیده می‌شود. تصویر فاز کنتراست برای مشاهده و شمارش کل سلول‌ها و مقایسه آن به تصویر فلورسانس، درصد سلول‌های مثبت و نیز میزان واکنش سلول‌ها به نشانگر را مشخص می‌کند.

قابلیت تمایز چند توانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استخوان و چربی

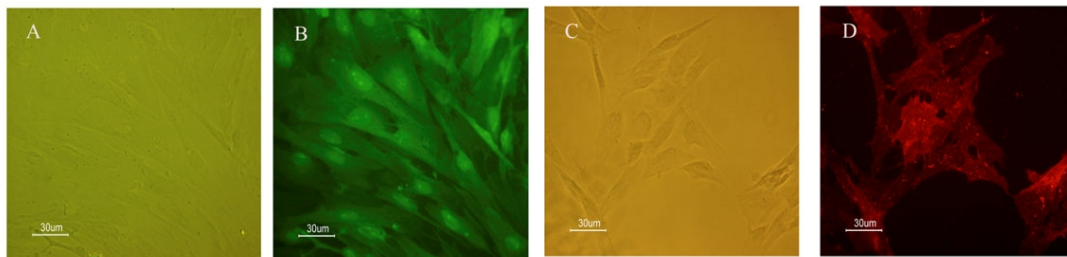
برای نشان دادن قابلیت چندتوانی این سلول‌ها، تمایز به سلول‌های چربی و استخوان نیز صورت گرفت. پس از افزودن محیط تمایزی چربی‌ساز و استخوان‌ساز بر BMSCs کشت شده، به تدریج مورفولوژی شبیه سلول چربی و استخوان ظاهر گردید و پس از سه هفته رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد (شکل ۳). تمایز چربی با تجمع قطرات لیپید از هفته اول آغاز شد و پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی Oil Red قابل مشاهده است. همچنین در شرایط کشت تمایز به سلول استخوانی با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی، پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی Alyzarin Red مشاهده گردید.

نتایج حیات و تکثیر سلولی به روش MTT

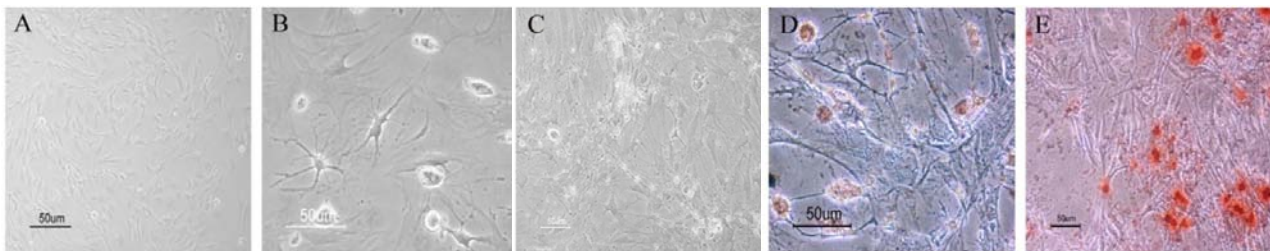
با بررسی نتایج حاصل از MTT می‌توان دریافت که میزان ازدیاد و تکثیر سلول‌ها، بین گروه‌های مختلف، با گذشت زمان، الگوی متفاوتی به خود می‌گیرد. به صورتی که ۲۴ ساعت پس از حذف محیط‌های القایی دپرنیل و DMSO و انتقال سلول‌ها به محیط α -MEM میزان تکثیر در گروه‌های تمایزی نسبت به گروه کنترل



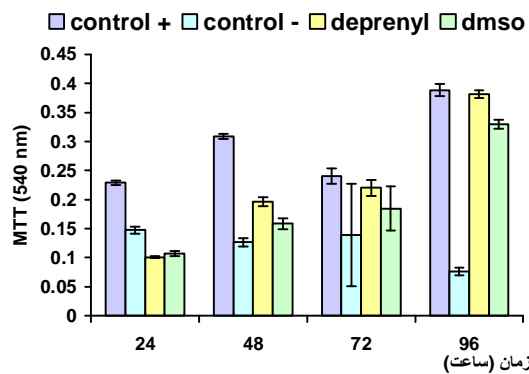
شکل ۱: مشاهده *BMSCs* توسط میکروسکوپ اینورت. *A*: *BMSCs* القاء نشده با مورفولوژی متفاوت، *B*: ۲۴ ساعت پس از القاء توسط دپرنیل، *C*: ۲۴ ساعت پس از القاء توسط *DMSO*



شکل ۲: تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان *BMSCs* به روش ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر *CD71* (شکل *A* و *B*) که با *FITC* به رنگ سبز و *CD90* (شکل *C* و *D*) که با رودامین به رنگ قرمز دیده می‌شوند. تصاویر سمت چپ فازکنتراست و تصاویر سمت راست در همان میدان دید و با نور فلورسانس مشاهده می‌گردد.



شکل ۳: تصویر فازکنتراست سلول‌های *MSC* مشتق از مغز استخوان القاء نشده (شکل *A*)، تمایز *MSCs* به سلول‌های چربی قبل از رنگ آمیزی (شکل *B*)، پس از رنگ آمیزی با *Oil Red* (شکل *D*)، تمایز *MSCs* به سلول‌های استخوانی قبل از رنگ آمیزی (شکل *C*) و پس از رنگ آمیزی با *Alizarin Red* (شکل *E*)



نمودار ۱: ارزیابی حیات و تکثیر سلولی *BMSCs* به روش *MTT* برای *BMSCs* میزان حیات و تکثیر *BMSCs* القاء شده توسط دپرنیل، دی‌متیل‌سولفوکساید، سلول‌های کنترل منفی و مثبت در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ($P < 0.05$)

کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). به گونه‌ای که شمار سلول‌های زنده در گروه کنترل منفی نسبت به *DMSO* و دپرنیل به ترتیب برابر با ۱/۳۷ و ۱/۴۶ برابر بود. اما نتایج حاصل از *MTT* در روزهای بعد، نشان داد که با گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، از زمان انتقال سلول‌ها به محیط α -MEM زنده در گروه‌های تیمار شده افزایش یافت. این افزایش نسبت به گروه کنترل، معنی‌دار بود ($P < 0.05$). به صورت کمی، میانگین تعداد سلول‌های زنده در گروه دپرنیل نسبت به گروه کنترل در ساعات ۴۸، ۷۲ و ۹۶ به ترتیب ۱/۵۴، ۱/۵۸ و ۵ برابر بود همچنین این نسبت برای گروه *DMSO* در ساعات فوق‌الذکر به ترتیب ۱/۲۵، ۱/۳۲ و ۴/۳۳ برابر بود (نمودار یک).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دپرنیل موجب افزایش بقا و قابلیت تکثیر سلولی شده است. همچنین استفاده از دی‌متیل سولفو کساید به تنهایی اثر سمی جدی بر BMSCs نداشت. یکی از نکات مهم در بحث استفاده از سلول‌های بنیادی، کشت در شرایط محیط حاوی القاء کننده‌های شیمیایی است. برخی معتقدند استفاده از القاء کننده‌ها موجب تمایز سلولی و تولید سلول عملکردی می‌گردد (۲۷ و ۲۸). برخی دیگر اثر تمایزی ترکیبات شیمیایی القایی بر سلول‌های بنیادی را غیر واقعی، موقتی و حتی سمی می‌دانند (۳۳-۳۱).

همانگونه که Freidenstein و سایر محققین شرح داده‌اند؛ BMSCs در شرایط کشت مناسب به سرعت تکثیر شده و با مورفولوژی دوکی و فیرو بلاست مانند دیده می‌شوند (۳۴ و ۳۵).

در مطالعه حاضر علاوه بر مشخصات بیولوژیک، ماهیت و ویژگی آنتی‌ژنیک سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بررسی شد. علاوه بر مورفولوژی فیرو بلاستی و چسبندگی به سطح پلاستیک، برخورداری از قابلیت تمایز به سلول استخوانی، چربی و غضروف و بیان برخی آنتی‌ژن‌های سطحی که از دیگر معیارهای معرفی این سلول‌ها است (۳۶ و ۳۷) به اثبات رسید.

BMSCs آنتی‌ژن سطحی CD90 و CD71 را که گیرنده ترانسفرین بوده و یکی از نشانگرهای اختصاصی BMSCs می‌باشد (۳۵) را در بیان نمودند که نشان‌دهنده تایید ماهیت BMSCs است. مشاهده شد که حدود ۹۰ درصد این سلول‌ها این مارکر را بیان می‌کنند. در مطالعه Lou و همکاران نیز ۹۵ درصد MSCs به این نشانگر پاسخ مثبت نشان دادند (۳۸). همچنین گزارش شده که BMSCs برای آنتی‌ژن‌های سلول بنیادی خون‌ساز مثل CD45، CD34 و CD14 منفی و برای آنتی‌ژن‌های CD54، CD44 و CD90 مثبت است. شباهت مورفولوژیکی و بیان مشابه آنتی‌ژن‌های سطح سلولی نشان‌دهنده منشا و عملکرد یکسان آنها است (۳۰). یکی از نکات مهم در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تعیین میزان خلوص سلول‌ها با یکی از روش‌های معتبر تشخیصی است. پاسخ مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به نشانگرهای CD90 و CD71 و تمایز به چربی و استخوان، تایید مهمی برای ماهیت این سلول‌ها محسوب می‌شود (۹ و ۴۱-۳۸). در مطالعات انجام شده بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در محیط‌های کشت مختلف به روش MTT مورد مقایسه قرار گرفته است (۲۹ و ۴۲). همچنین مشخص شده که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بقا و تکثیر سلولی که به روش MTT سنجیده شده را در سلول‌های شوان افزایش می‌دهند (۴۳). در مطالعه حاضر ارزیابی حیات، بقا و تکثیر سلولی پس از القاء با دپرنیل نشان داد که BMSCs ۲۴ ساعت پس

از القاء وارد یک مرحله سازش با شرایط محیطی جدید شده و در ادامه شروع به تکثیر سلولی می‌کند که رشد سلولی در مقایسه با سلول‌های کنترل منفی اختلاف معنی‌دار داشت و الگوی رشد یکسانی را با گروه کنترل مثبت برای زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت، نشان داد.

سلزلین (دپرنیل) که به عنوان یک داروی درمان کننده بیماری پارکینسون مورد توجه است (۴۴)؛ ترکیبی است که به عنوان داروی ضدافسردگی نیز معرفی شده و غلظت‌های پایین آن (10^{-13} تا 10^{-9}) اثر سیتوپروتکتیو، آنتی آپوپتوتیک و آنتی اکسیدانت دارد. این ترکیب در بیماری پارکینسون به همراه لوودوپا استفاده شده و سنتز دوپامین را افزایش می‌دهد و باعث بقا نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود. برخی از محققین از این ترکیب برای تمایز سلول‌های بنیادی به نورون‌های دوپامینرژیک استفاده کرده‌اند. این ترکیب با دوز پایین طول عمر حیوانات آزمایشگاهی را افزایش می‌دهد و آسیب اکسیداتیو نورون‌ها و سایر بافت‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین در تحقیقاتی که اثر غلظت‌های مختلف دپرنیل بر میزان بقا سلول‌های استرومایی مغز استخوان مورد ارزیابی قرار گرفته؛ مؤثرترین غلظت‌ها برای افزایش میزان بقا سلول‌های استرومایی 6^{-10} مولار، 7^{-10} مولار و 8^{-10} مولار معرفی شده است (۲۱-۱۸). همچنین اثر سلزلین در شرایط *in vitro* بر نورون‌های دوپامینرژیک مشابه اثر BDNF گزارش شده است. محققین این دارو را به عنوان یک ماده ضد آپوپتوتیک معرفی کرده‌اند (۴۵ و ۴۶). اثرات عامل BDNF بر روی تمایز عصبی BMSC مانند اثرات داروهای القاء گر عصبی نظیر سلزلین است (۴۷ و ۴۸). با توجه به این که در *in vitro* از انواع عوامل نوروتروفیک برای بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی استفاده می‌کنند و با توجه به نقش نوروتروفیک داروی سلزلین می‌توان این دارو را به عنوان یک القاء کننده تکثیر سلولی معرفی نمود. سلزلین باعث افزایش بقا، تکثیر و بیان ژن‌های نوروتروفیک در BMSCs می‌گردد (۴۹-۴۷). با توجه به موارد ذکر شده اثر سیتوپروتکتیو دپرنیل در این تحقیق نیز مشاهده شد.

DMSO یکی دیگر از ترکیبات مورد استفاده برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی است. نتایج MTT تحقیق حاضر نشان داد که وقتی سلول‌ها در معرض DMSO قرار گرفتند؛ ابتدا با کاهش رشد مواجه شدند؛ ولی مجدداً به صورت طبیعی به رشد و تکثیر ادامه دادند. کاهش تعداد سلولی می‌تواند ناشی از غلظت DMSO و یا اثر شرایط کشت جدید در مرحله ابتدایی تکثیر و یا اثر سمی این ماده بر سلول‌ها باشد. نتایج تحلیل آماری نشان می‌دهد که سلول‌ها در محیط حاوی DMSO در ابتدا با توقف و کندی رشد در مقایسه با گروه سلولی دپرنیل و کنترل منفی و مثبت

تکثیری، استفاده از دپرنیل می‌تواند برای القاء و تمایز سلولی در شرایط کشت قابل استفاده باشد. در حال حاضر نیز گروهی از محققین با استفاده از DMSO به‌همراه ترکیبات دیگر توانسته‌اند BMSCs را به نوروئین‌های عملکردی تمایز دهند (۲۴) و با توجه به این موارد بعید به نظر می‌رسد که DMSO اثر کشنده جدی بر سلول‌ها داشته باشد.

نتیجه‌گیری

دپرنیل موجب افزایش بقاء و قابلیت تکثیر سلولی در مقایسه با دی‌متیل‌سولفو‌کساید شد و می‌توان این ترکیب را به عنوان القاگر سلولی مورد استفاده قرار داد. استفاده از دی‌متیل‌سولفو‌کساید به تنهایی اثر سمی جدی بر BMSCs نداشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم فاطمه طاهری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی تکوینی از دانشگاه دامغان بود. بدین‌وسیله از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به‌خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*. 2005 Mar; 23(3):392-402.
2. Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, Burshtein A, Cherlow T, Kan I, et al. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev*. 2006 Apr; 15(2):141-64.
3. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells*. 2006 Jun; 24(7):1707-18.
4. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Delilieri GL, et al. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol*. 2005 Jun; 193(2):312-25.
5. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2004 Sep; 117(Pt 19):4411-22.
6. Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, et al. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2007 Sep; 31(9):916-23.
7. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000 Aug; 164(2):247-56.
8. Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argioli F, et al. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci*. 2006 Feb 16;7:14.

روبرو می‌شوند. Woodbury و همکاران (۱۵ و ۹) برای تمایز BMSCs به سلول‌های عصبی از چندین القاء‌گر استفاده نمودند که یکی از آنها DMSO بود. یکی از ترکیباتی که Bertani و همکاران برای بیان BMSCs پس از القاء استفاده نمود؛ DMSO است (۵۰). برخی از محققین گزارش کرده‌اند که DMSO اثر سمی بر روی سلول‌های بنیادی دارد و بعد از گذشت حدود ۲۴ ساعت باعث آپوپتوز ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود. تحقیقات انجام شده روی DMSO نشان می‌دهد که این ترکیب یک حلال آلی غیرسمی است و کاربرد آن در سنتز دارو، تولیدات الکترونیک و منتشر کردن دارو در بدن رو به افزایش است. بسیاری از مطالعات سم‌شناسی، محیطی و پزشکی روی DMSO انجام شده تا ایمنی این ماده شیمیایی تعیین شود (۵۸-۵۱). برخی از محققین از آسکوربات، دپرنیل، ویتامین E و DMSO به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مهم محافظت‌کننده آسیب‌های نورو‌توکسیک به نوروئین‌های دوپامینرژیک جسم سیاه، نام می‌برند (۵۹). در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که دپرنیل اثر تحریکی بر تکثیر BMSCs داشته ولی DMSO در زمان ابتدایی کشت بقاء و تکثیر سلولی را کاهش می‌دهد. بنابراین به دلیل اثر

9. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000 Aug; 61(4):364-70.
10. Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*. 2004 May; 24(19):4585-95.
11. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar; 95(7):3908-13.
12. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000 Dec; 290(5497):1775-9.
13. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep; 96(19):10711-6.
14. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb; 100(3):1364-9.
15. Muñoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells*. 2003; 21(4):437-48.
16. Gurok U, Steinhoff C, Lipkowitz B, Ropers HH, Scharff C, Nuber UA. Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *J Neurosci*. 2004 Jun; 24(26):5982-6002.
17. Yang LY, Huang TH, Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation in vivo. *Biomed Environ Sci*. 2006 Oct; 19(5):

329-35.

18. Magyar K, Szende B. (-)-Deprenyl, a selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties. *Neurotoxicology*. 2004 Jan; 25(1-2):233-42.

19. Szilágyi G, Simon L, Wappler E, Magyar K, Nagy Z. (-) Deprenyl-N-oxide, a (-)deprenyl metabolite, is cytoprotective after hypoxic injury in PC12 cells, or after transient brain ischemia in gerbils. *J Neurol Sci*. 2009 Aug; 283(1-2):182-6.

20. Subramanian MV, James TJ. Age-related protective effect of deprenyl on changes in the levels of diagnostic marker enzymes and antioxidant defense enzymes activities in cerebellar tissue in Wistar rats. *Cell Stress Chaperones*. 2010 Sep;15(5):743-51.

21. Esmacili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. *Rejuvenation Res*. 2006;9(4):475-84.

22. Muralikrishnan D, Samantary S, Mohanakumar KP. D-deprenyl protects nigrostriatal neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Synapse*. 2003 Oct; 50(1):7-13.

23. Qian DX, Zhang HT, Ma X, Jiang XD, Xu RX. Comparison of the efficiencies of three neural induction protocols in human adipose stromal cells. *Neurochem Res*. 2010 Apr; 35(4):572-9.

24. Jiang J, Lv Z, Gu Y, Li J, Xu L, Xu W, Lu J, Xu J. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res*. 2010 Jan; 66(1):46-52.

25. Barnabé GF, Schwindt TT, Calcagnotto ME, Motta FL, Martinez G Jr, de Oliveira AC, et al. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5222.

26. Tao H, Rao R, Ma DD. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Dev Growth Differ*. 2005 Aug; 47(6):423-33.

27. Choi CB, Cho YK, Prakash KV, Jee BK, Han CW, Paik YK, et al. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Nov; 350(1):138-46.

28. Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Hida K, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res*. 2008 Apr; 86(5):1024-35.

29. Apel A, Groth A, Schlesinger S, Bruns H, Schemmer P, Büchler MW, et al. Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium. *Exp Cell Res*. 2009 Feb; 315(3):498-507.

30. Dvorakova J, Hruby A, Velebný V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int*. 2008 Sep; 32(9):1116-25.

31. Lu P, Blesch A, Tuszyński MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004 Jul; 77(2):174-91.

32. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2004 Jul; 77(2):192-204.

33. Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural

transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res*. 2008 Mar; 60(3):275-80.

34. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976; 47:327-59.

35. Wang FW, Jia DY, Du ZH, Fu J, Zhao SD, Liu SM, et al. Roles of activated astrocytes in bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *Neuroscience*. 2009 May; 160(2):319-29.

36. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Jan; 234(1):1-9.

37. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec; 20(5-6):419-27.

38. Lou S, Gu P, Chen F, He C, Wang M, Lu C. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats. *Brain Res*. 2003 Apr; 968(1):114-21.

39. Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Dec; 27(36):6052-63.

40. Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res*. 2007 Feb; 32(2):353-62.

41. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun; 5(2):103-10.

42. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*. 2007 Oct; 207(2):267-74.

43. Wang J, Ding F, Gu Y, Liu J, Gu X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Res*. 2009 Mar; 1262:7-15.

44. Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell*. 2010 Aug; 42(4):211-6.

45. Henchcliffe C, Schumacher HC, Burgut FT. Recent advances in Parkinson's disease therapy: use of monoamine oxidase inhibitors. *Expert Rev Neurother*. 2005 Nov; 5(6):811-21.

46. Ebadi M, Sharma S, Shavali S, El Refaey H. Neuroprotective actions of selegiline. *J Neurosci Res*. 2002 Feb; 67(3):285-9.

47. Seymour CB, Mothersill C, Mooney R, Moriarty M, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors 1-deprenyl and clorgyline protect nonmalignant human cells from ionising radiation and chemotherapy toxicity. *Br J Cancer*. 2003 Nov; 89(10):1979-86.

48. Ghobanian M.T, Tiraihi T, Mesbah-Namin S.A, Fathollahi Y. [Induction effect of deprenyl on transdifferentiation of BMSCs into neuron and glial-like cells in vitro]. *Cell J Yakhteh*. 2007; 9(1):15-22. [Article in Persian]

49. Haji Ghasem Kashani M. Tiraihi T. Ghorbanian M.T. Abrari K. [In vitro expression of BDNF, GDNF, NGF, NT3 and NT4/5 genes in selegiline induced bone marrow stromal cells]. *Cell J Yakhteh*. 2010;11(4):400-7. [Article in Persian]

50. Bertani N, Malatesta P, Volpi G, Sonogo P, Perris R. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited:

- analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci.* 2005 Sep; 118(Pt 17):3925-36.
51. Ghorbanian MT, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Fathollahi Y. Selegiline is an efficient and potent inducer for bone marrow stromal cell differentiation into neuronal phenotype. *Neurol Res.* 2010 Mar; 32(2):185-93.
52. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Health and Safety Information. Bulletin # 106. Slidell, Louisiana: Gaylord Chemical Company (LLC). 2007. Available at: <http://www.gaylordchemical.com/uploads/images/pdfs/literature/106B.pdf>
53. Ravid M, Shapira J, Lang R, Kedar I. Prolonged dimethylsulphoxide treatment in 13 patients with systemic amyloidosis. *Ann Rheum Dis.* 1982 Dec;41(6):587-92.
54. MacGregor WS. The chemical and physical properties of DMSO. *Ann N Y Acad Sci.* 1967 Mar;141(1):3-12.
55. Parisi A, Alfieri A, Mazzella M, Mazzella A, Scognamiglio M, Scognamiglio G, et al. Protective effect of dimethyl sulfoxide on acute myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010 Jan; 55(1):106-9.
56. Murav'ev IuV. [The efficacy of dimethyl sulfoxide in secondary amyloidosis in patients with rheumatic diseases]. *Revmatologiya (Mosk).* 1990 Jan-Mar;(1):4-8. [Article in Russian]
57. Ravid M, Keizman IK, Sohar E. Effect of a single dose of dimethyl sulphoxide on renal amyloidosis. *Lancet.* 1977 Apr; 1(8014):730-1.
58. Shibuya T, Murakawa M, Tsuda Y, Harada M. Successful treatment of primary amyloidosis with dimethylsulfoxide and cytoreductive chemotherapy. *Intern Med.* 1992 Apr;31(4):544-8.
59. Iacovitti L, Stull ND, Johnston K. Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res.* 1997 Sep;768(1-2):317-26.

Original Paper

Inductive effect of Deprenyl and Dimethyl sulfoxide on proliferation and survival of the mesenchymal stem cells

Taheri F (BSc)¹, Haji Ghasem Kashani M (PhD)*²
Ghorbanian MT (PhD)², Hosseinpour L (MSc)³

¹MSc Student in Developmental Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ²Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran. ³MSc in Developmental Biology, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Research have been focused on the applying the chemical inducer for trans-differentiation the adult BMSCs into neural cell. So that, at the first should investigate the toxicity effect of the chemical inducer on the induced cells. Plasticity and easy accessibility of bone marrow mesenchymal stem cells is a unique characteristic for treatment of neural disorderies. This study was desgined to determine the inductive effect of Deprenyl and Dimethyl sulfoxide on proliferation and survival of the mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: In this experimental study, BMSCs isolated from the adult rat bone marrow and cultured in α MEM containing 10% FBS. Cell identity for surface antigens was performed in third passage by immunocytochemistry and multipotancy capacity of BMSCs was done by BMSC differentiation into adipocytes and osteocytes. The cells were exposed to chemical agents (a: the α MEM medium supplemented with 2% DMSO, b: the α MEM medium supplemented with 10^{-8} M Deprenyl) for 24 hours and then transferred to α MEM containing 10% FBS cell survival and proliferation was evaluated after the 24, 48, 72 and 96 hours by MTT [3-(4-5-Dimethylthiazolyl-2-y1)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] test. Data were analyzed using SPSS-16, One-Way ANOVA and Tukey tests.

Results: In addition to expression the surface antigens and adipogenic and osteogenic differentiation by BMSCs, MTT test results showed that proliferation and survival of induced-deprenyl and DMSO cells within 48, 72 and 96 hours after the induction was increased significantly than negative control group.

Conclusion: Deprenyl increases survival and cell proliferation compared to Dimethyl Sulfoxide. It can be used as cell inducer.

Keywords: Bone marrow mesenchymal stem cell, Deprenyl, Dimethyl Sulfoxide, MTT

* Corresponding Author: Haji Ghasem Kashani M (PhD), E-mail: kashani_tm@yahoo.com

Received 28 Aug 2011

Revised 2 Oct 2011

Accepted 30 Oct 2011