

اثرات کریاتین و اسید رتینوئیک بر القای اتوفازی و تمایز سلول های بنیادین چربی به نورون های شبه گابارژیک

شهرام دارابی (PhD)*، تقی طریحی (PhD)²، علی نوری زاده (PhD)³، فرزاد رجایی (PhD)⁴، لیلا دارابی (MD)⁵، حجت اله عباس زاده (PhD)²

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۴- مرکز اختلالات شنوایی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: ۹۵/۱۲/۲۱، اصلاح: ۹۶/۱/۱۵، پذیرش: ۹۶/۲/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: آسیب نورون های مهاری گابارژیک در بسیاری از بیماری های تخریبی سیستم عصبی مشاهده گردیده و سلول های بنیادی چربی نیز به عنوان یک منبع در دسترس برای تمایز و پیوند در بیماریهای سیستم عصبی نشان داده شده است. در این مطالعه نقش اتوفازی در تمایز به وسیله ارزیابی بیان ژنهای اتوفازی p62, LC3 و GABARAP در سلول های بنیادین چربی و بعد از مرحله پیش القا بررسی گردید.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی در شرایط استریل سلول های بنیادین چربی از اطراف کلیه های دو عدد موش صحرایی نر جدا گردید. سلول های مورد مطالعه به سه گروه سلول های بنیادین چربی، پیش القا و القا تقسیم شدند. در گروه پیش القا، پس از پاساژ سوم سلول های بنیادین چربی به وسیله بتامرکاپتاتانل 1mm و اسید رتینوئیک ۱۰ μM به سلول های شبه عصبی تبدیل شدند. سپس در گروه القا، برای پیدا کردن بهترین دوز کریاتین، سلول ها در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ و ۲۰ میلی مولار، به مدت ۵ روز القا پیدا کردند. اثرات کریاتین به وسیله بیان ایمونوسیتوشیمیایی nestin و GABA ارزیابی گردید. همچنین نقش ژن های اتوفازی p62 و GABARAP, LC3 در تمایز سلولی به وسیله RT-PCR ارزیابی گردید.

یافته ها: در بررسی ایمونوسیتوشیمیایی سلول های بنیادی چربی به وسیله CD49d ماهیت چربی بودن سلول ها اثبات گردید. در مطالعات ایمونوسیتوشیمیایی مرحله القا، در دوز ۱۰ میلی مولار کریاتین به مدت ۵ روز، میزان بیان نشانگر نورونهای گابارژیکی (GABA)، ۵۸±۲٪ و نشانگر سلول های شبه عصبی nestin، ۵۶±۵٪ بود که اختلاف معنی دار با سایر دوزها و گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵). در بررسی RT-PCR در سلول های پیش القا شده ژن های اتوفازی p62 و GABARAP, LC3 بیان گردید، اما در سلول های بنیادین چربی فقط ژن P62 بیان شد.

نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که سلول های بنیادین چربی پس از القا توانایی بیان مارکرهای نورونی nestin و GABA را دارند. ژن های اتوفازی p62 و GABARAP, LC3 در سلول های پیش القا بیان شد، که نشان دهنده نقش احتمالی اتوفازی در تمایز سلول های بنیادین چربی به سلول های شبه عصبی است.

واژه های کلیدی: نورونهای شبه گابارژیک، سلول های بنیادین مشتق از بافت چربی، کریاتین، اتوفازی.

مقدمه

سیستم عصبی (۱۳) شوند. در سلول درمانی و ژن درمانی، از منابع سلولی که زیاد باشند و به آسانی استخراج شوند و قابل کنترل باشند، استفاده می شود (۱۴ و ۱۵). سلول های بنیادین چربی به راحتی به سلول های عصبی تمایز می یابند و میتوانند به عنوان جایگزین سلول های آسیب دیده سیستم عصبی به کار روند (۱۶ و ۱۷). اتوفازی یک فرآیند است که در آن سلول، اندامک ها، پروتئین ها و اجزای تخریب شده سلولی و سیتوپلاسم را در یک غشای دو لایه در بر گرفته و لیزوزم آنها را تجزیه می کند و در نتیجه محصولات حاصل از تجزیه سلولی در تولید انرژی و ساخت پروتئین ها و ساختارهای سلولی جدید استفاده می شود.

سلول های گابارژیک، سلول های مهاری در سیستم عصبی هستند که در ایجاد بسیاری از بیماری های تخریب کننده نورونی مانند بیماری هانتینگتون (۱)، آلزایمر (۲)، صرع (۳)، شیذوفرنی (۴)، اوتیسم (۵)، پارکینسون و ضایعات مغزی (۶) و نخاعی (۷) نقش دارند. بنابراین ایجاد سلول های گابارژیک (۸ و ۹) و پیوند آنها در محل ضایعه ممکن است در درمان این بیماری ها موثر باشد. امروزه مشخص شده که سلول های بنیادین مشتق از بافت چربی (Adipose-derived stem Cells; ADSCs) می توانند موجب تشکیل طیف وسیعی از بافتهای همبندی کاملاً تمایز یافته مانند تاندون (۱۰) غضروف (۱۱)، استخوان (۱۲) و سلولهای

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به شماره ۶۵۸۸ می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر شهرام دارابی

آدرس: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی. تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۶۰۰۱

E-mail: shahram2005d@yahoo.com

سوسپانسیون سلولی مجدداً ۵ دقیقه در ۳۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و تا پاساژ سوم درون فلاسک حاوی محیط کشت DMEM و FBS ۱۰٪ و آنتی بیوتیک ریخته شده، درون انکوباتور در دمای ۳۷ °C و رطوبت نسبی ۹۵٪ نگهداری شدند (۲۸).

تعیین هویت سلول های بنیادین چربی: به منظور بررسی ماهیت سلول های بنیادین چربی چسبیده به کف فلاسک و تأیید منشأ مزانشیمی آنها با آنتی بادی CD49D (نشانگر سلولهای چربی)، CD34 (نشانگر سلولهای خونساز)، CD31 (نشانگر سلولهای اندوتلیال عروق) به روش ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

گروههای سلولی: سلول های مورد مطالعه به سه گروه، سلولهای بنیادین چربی (ADSCs)، گروه پیش القا (سلول های بنیادین چربی که در معرض BME یک میلی مولار به مدت یک ساعت و سپس ۱۰ μM RA به مدت دو روز قرار گرفتند) و گروه القا (سلول های پیش القا شده که در معرض کریاتین (Cr) به مدت ۵ روز با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار قرار گرفتند تقسیم شدند.

بررسی زنده بودن سلولها (Viability test): بررسی درصد بقای سلول ها در سلول های چربی پاساژ ۳ (قبل از شروع مرحله پیش القا) و در مراحل پیش القا (Preinduction) و القا (Induction) انجام شد. برای انجام این بررسی یک حجم سوسپانسیون سلولی و یک حجم مساوی از رنگ تریپان بلو مخلوط و شمارش سلولی با استفاده از لام نتوبار در زیر میکروسکوپ انجام شد. در این روش رنگ به داخل سلولهای مرده نفوذ می کند و به رنگ آبی در می آیند و سلولهای رنگ نشده معرف سلول های زنده هستند که با شمارش کل سلول ها و سلول های رنگ شده درصد سلول های زنده به دست آمد. تمایز سلولهای بنیادین چربی به سلول های شبه گابارژیک طی دو مرحله پیش القا و القا صورت گرفت. در این دو مرحله آنتی بادهای nestin و GABA جهت بررسی تمایز استفاده شد.

مرحله پیش القا: پس از تریپسینه کردن سلول های بنیادین چربی پاساژ سوم، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به طور مساوی در هر یک از خانه های پلیت ۲۴ خانه ای لامل گذاری شده ریخته شد. در مرحله اول پیش القا از بتامرکاپتواتانل با دز یک میلی مولار بر روی سلول های بنیادین چربی حاوی محیط کشت بدون سرم استفاده گردید (۲۹). پس از گذشت یک ساعت از مرحله اول پیش القا، شستشو توسط PBS انجام شد. مرحله دوم پیش القا با اضافه نمودن محیط حاوی FBS ۱۵٪ و اسید رتینوئیک ۱۰ میکرومولار (۹) به مدت دو روز بر روی سلولها صورت گرفت. مراحل بررسی ایمونوسیتوشیمی و شمارش و تعیین درصد سلولهای زنده انجام شد.

مرحله القا: در مرحله القا، پس از خارج کردن محیط کشت حاوی اسیدرتینوئیک و شستشوی سلول ها با PBS، سلول های شبه عصبی در محیط کشت DMEM/F12 حاوی FBS ۱۵٪ و کریاتین با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار به مدت ۵ روز قرار گرفتند. در ابتدا با استفاده از تست بررسی زنده بودن سلولها، روزها و دوزهایی که در آن میزان مرگ و میر سلولها افزایش نشان می داد مشخص گردید. سپس سلولها در معرض میزان دوز غیر سمی کریاتین در روزهای مناسب قرار گرفتند. در پایان این مرحله ارزیابی از آنتی بادی های اولیه شامل آنتی بادهای nestin و GABA به روش ایمونوسیتوشیمی بر روی سلولها انجام شد. تمام مراحل و همچنین نحوه شمارش و تعیین درصد سلول ها

نقص در مسیرهای مرتبط با اتوفازی در سلول های عصبی ممکن است باعث بیماری پارکینسون، آلزایمر، هانتینگتون و سایر بیماری های عصبی شود (۱۸). ژنهای p62، LC3 و GABARAP در تشکیل غشای اتوفاگوزوم و اتوفازی نقش دارند (۱۹). القای اتوفازی به وسیله اسید رتینوئیک باعث تمایز سلول ها می شود (۲۰). اسید رتینوئیک فراورده متابولیک ویتامین A (رتینول) است، که در القا، تمایز نورونی، رشد آکسونی و ترمیم عصبی نقش دارد (۲۱). ترکیب همزمان اسید رتینوئیک با استفاده از فاکتورهای رشد مختلف، سبب ایجاد انواع سلول های عصبی مانند سلول های گابارژیک از سلول های بنیادین جنینی (۲۲)، مزانشیمی (۸۹) و عصبی (۲۳) می شود.

کریاتین (Cr/Creatine) یک اسید نیتروژن دار ارگانیک است که به صورت طبیعی در بدن مهره داران وجود دارد و نقش اولیه آن، تولید انرژی در سیستم عصبی و عضلانی است (۲۴). کریاتین سوسترای آنزیم کریاتین کیناز است که میزان ATP سلول را تنظیم می کند (۲۵). نتایج مطالعات نشان داد که کریاتین باعث افزایش تمایز سلول های بنیادی به سلول های شبه گابارژیکی شده و همچنین نورونهای گابارژیک از منابع مختلف سلولی ایجاد می گردد (۲۷ و ۲۶). در مطالعات قبلی از سلولهای بنیادین چربی به عنوان منبع سلولی، جهت تمایز به نورون های شبه گابارژیک استفاده شد. در این مطالعه نقش اتوفازی در تمایز به وسیله ارزیابی بیان ژنهای اتوفازی p62، LC3 و GABARAP در سلول های بنیادین چربی و بعد از مرحله پیش القا بررسی گردید.

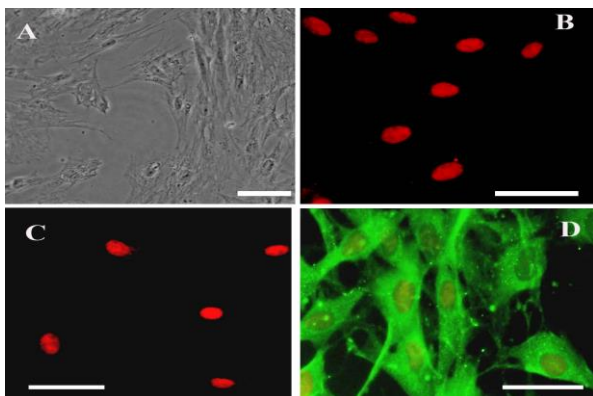
مواد و روشها

جداسازی و کشت سلول های بنیادین چربی: این مطالعه با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی قزوین با تأیید در کمیته اخلاق با کد IR.QUMS.REC.۹۴.۱۳۱ صورت گرفت. تعداد دو عدد موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley (انستیتو رازی، تهران، ایران) و وزن حدود ۲۰۰ گرم به طور تصادفی انتخاب شدند. حیوانات توسط مخلوط ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. سطح شکمی حیوان پس از ضد عفونی کردن به وسیله چچی و تیغ جراحی استریل باز شد. چربی از اطراف کلیه ها برداشته شد. در هنگام برداشت چربی از بریده شدن عروق و خونی شدن نمونه ها پیشگیری شد. بافت های چربی جدا شده با اسکالپل استریل در پلیت استریل حاوی یک سی سی سی (phosphate buffered saline) و آنتی بیوتیک به قطعات بسیار ریز تقسیم شد. در کلیه مراحل جداسازی و کشت سلولی از پنی سیلین ۱۰۰ U/mL و استرپتومایسین ۱۰۰ μg/ml استفاده شد. قطعات ریز شده چربی درون یک تیوب فالکون بزرگ حاوی ۲۰ سی سی محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) با آنتی بیوتیک و آنزیم کلاژناز نوع یک ۰/۰۷۵ درصد ریخته و در حدود نیم ساعت تکان داده شد تا محلول شیری رنگی به دست آید. محلول به دست آمده با ۵ سی سی سرم FBS (fetal bovine serum) مخلوط کرده تا آنزیم خنثی شود و سپس ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و محلول رویی سلول ها دور ریخته شد. سلولهای ته نشین شده با ۲ سی سی محیط کشت بدون سرم (جلوگیری از کف کردن در حین پیپتاژ) پیپتاژ شدند و سپس سوسپانسیون سلولی برای تصفیه از قطعات اضافی از فیلتر ناپلونی مش با قطر منافذ ۱۰۰ میکرومتر عبور داده شد.

ظاهری نسبتاً یکدست و یکنواخت به دست آوردند. سلول‌ها در محیط کشت عمدتاً به دو شکل دیده شدند. تعدادی از سلول‌های در حال تکثیر ظاهری گرد، کروی و کوچک داشتند و مابقی که اکثریت سلول‌ها را به خود اختصاص می دادند به شکل پهن، دوکی و شبه فیبروبلاستی مشخص شدند (شکل ۱-۱A).

تأیید ماهیت سلول های بنیادین چربی: سلول‌های بنیادین چربی نسبت به CD49d (نشانه سلول های بنیادی چربی) مثبت بودند و سیتوپلاسم سلول‌ها به علت استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه به FITC به رنگ سبز در آمد، هسته سلول‌ها نیز توسط پروپیدیوم آیوداید به رنگ قرمز در آمدند (شکل ۱-۱D). اما سلول‌های بنیادین چربی نسبت به CD34 (نشانه سلول های خونساز) و CD31 (نشانه سلول های اندوتلیال) منفی بودند (شکل ۱-۱B, C).

تعیین میزان حیات سلولها با تریپان بلو در طی مرحله پیش القا و القا: درصد بقا سلول های پیش القا و القا شده سلول های بنیادین چربی نشان دهنده این بود که میزان بقای سلول های بنیادین چربی القا نشده یا گروه شاهد، با $95/8 \pm 2/58$ به صورت معنی داری ($p < 0/05$) بیشتر از سلول های القا شده گروههای دیگر بود، اما نسبت به BME β در گروه پیش القا، اگرچه بیشتر بود اما تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۱). گروه پیش القا که بتامراکپوتانل یک میلی مولار به مدت یک ساعت دریافت کردند، میزان بقا $90/2 \pm 0/83$ بود، اما پس از استفاده از اسیدرتینوتیک 10 میکرومولار به مدت 2 روز، میزان بقا $82/4 \pm 2/43$ بود و اختلاف بین آنها معنی دار نبود، اما میزان مرگ و میر نسبت به گروه سلول های بنیادین چربی بیشتر بود. در گروه القا در روز 5 ، میزان مرگ و میر در دوزهای 1 ، 5 و 10 میلی مولار به ترتیب با $78/4 \pm 2/88$ ، $75 \pm 2/54$ و $71 \pm 1/22$ کمترین میزان مرگ و میر ($p < 0/05$) سلولی را نسبت به گروه کریاتین 20 میلی مولار ($46/6 \pm 3/04$) دارند و اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) بود. ضمناً این بررسی نشان می دهد که بیشترین میزان مرگ و میر سلولی در دوز کریاتین 20 میلی مولار در روز پنجم، با اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) نسبت به سایر گروهها است، که میزان بقای سلول ها به کمتر از 50 می رسد بنابراین این دوز در مطالعات حذف می شود (نمودار ۱).



شکل ۱. تصویر A سلول های بنیادین چربی در پاساژ سوم، تصاویر B و C سلول های بنیادین چربی نسبت به CD34 (نشانه سلول های خونساز)، CD31 (نشانه سلول های اندوتلیال) منفی بودند تصویر D سلول های بنیادین چربی نسبت به CD49d (نشانه سلول های بنیادی چربی) مثبت بودند و سیتوپلاسم سلول ها به علت استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه به FITC به رنگ سبز در آمد، هسته سلول ها نیز توسط پروپیدیوم آیوداید به رنگ قرمز در آمد (خط مقیاس 50 میکرومتر).

مانند قبل انجام شد. به این ترتیب بالاترین درصد تمایز به سلول های شبه گابارژیک در گروه القا مشخص گردید.

بررسی ایمونوسیتوشیمی: در هر مرحله، پس از ترسیب سلول ها، تعداد 10000 سلول به طور مساوی در هر یک از خانه‌های پلیت 6 خانه ای ریخته شد. پس از اتصال سلول ها به کف پلیت، مراحل بررسی ایمونوسیتوشیمی انجام گردید. سلول‌ها در محلول پارافرمالدهید 4% به مدت 20 دقیقه قرار داده شد، پس از شستشو با PBS، سلول ها درون تریتون ایکس $0/3\%$ به مدت 15 دقیقه قرار داده شد. سپس سلول ها با PBS شستشو گردید. سلول ها در آنتی بادی اولیه به مدت 24 ساعت در دمای 4°C قرار گرفتند. آنتی‌بادیهای اولیه nestin (Abcam; $1:300$) و GABA (Abcam; $1:500$) بودند. سلول‌ها بوسیله PBS شسته شده و در آنتی بادی ثانویه کنژوگه به FITC ($1:100$; Chemicon) که به رنگ سبز دیده می شود به مدت 2 ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. برای شمارش سلول ها از رنگ پروپیدیوم آیوداید که هسته سلول ها قرمز می شود، استفاده شد. سلول‌های با واکنش ایمنی مثبت با میکروسکوپ فلورسنت شمارش گردید.

RT-PCR: برای انجام RT-PCR ژن های LC3، p62، GAPDH و GABARAP ابتدا پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم افزار Gene Runner و طراحی گردید (جدول ۱). در این تکنیک RNA کل از سلول های هر گروه به وسیله کیت استخراج (RNA extraction kit)، استخراج گردید. به منظور حذف DNA ناخواسته با استفاده از کیت DNase I amplification (grade kit) صورت گرفت. سپس RNA با استفاده از کیت تولید cDNA (synthesis kit) و آنزیم کپی برداری معکوس به DNA مکمل (cDNA) تبدیل شد. سپس cDNA حاصله به روش RT-PCR تکثیر شده، مورد بررسی قرار گرفت. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. تجزیه تحلیل آماری: اطلاعات بدست آمده از بررسی زنده بودن سلول‌ها و شمارش سلولی توسط Student T-Test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مورد مقایسه قرار گرفت و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

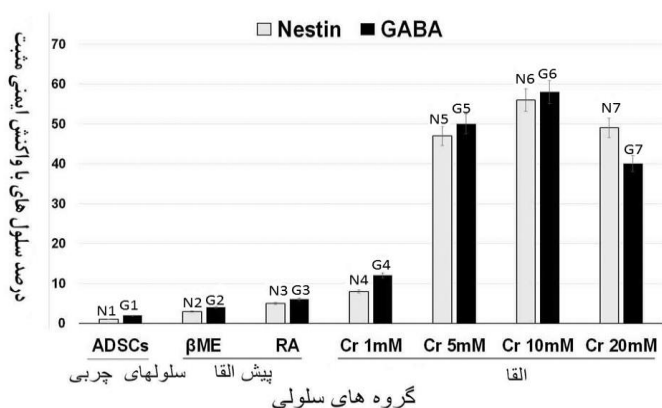
جدول ۱. پرایمر ها

Gene	Primer (5' --> 3')	Sequence size
GAPDH	F: GTTGTCTCTGCGACTTCA R: GGTGGTCCAGGGTTCTTA	۱۹۰ bp
LC3	F: TGTTAGGCTTGCTCTTTTGG R: GCAGAGGAAATGACCACAGAT	۲۱۹bp
p62	F: TCCTACAGACCAAGAATTATGAC R: TTCTCATGCACTTTCTACTG	۲۳۲bp
GABARAP	F: TTGATGTGCCTCCTACCTCC R: TGTTTACCCTCCATTCAC	۲۰۰bp

یافته‌ها

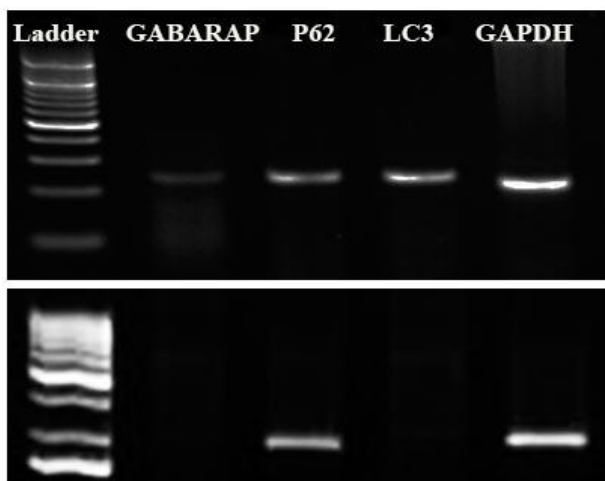
جداسازی و کشت سلول های بنیادین چربی: در مطالعه با میکروسکوپ نوری سلول های بنیادین چربی در محیط کشت از لحاظ مورفولوژی پس از سه پاساژ،

میکرومولار به مدت ۲ روز ژنهای LC3، p62 و GABARAP بیان شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در تمامی گروه ها بیان گردید (شکل ۲).



نمودار ۲. میزان بیان نستین و گابا در گروههای مختلف سلولی با استفاده از آنتی بادی اختصاصی

در بیان نستین از N1 تا N6 پیوسته بر بیان افزوده می شود اما در گروه N7 بیان به سطحی مشابه N5 می رسد. بین تمامی گروهها به استثنای N5 با N7 اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). در بیان گابا از G1 تا G6 پیوسته بر بیان افزوده می شود اما در گروه G7 بیان به سطحی مشابه G5 می رسد. بین تمامی گروهها بجز G5 با G7 اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). بیشترین میزان بیان nestin و GABA در گروهی مشاهده گردید که در مرحله القا، به مدت ۵ روز کریاتین ۱۰ میلی مولار دریافت کردند، که با سایر گروهها اختلاف معنی دار در بیان آنتی ژنهای شبه عصبی داشتند.

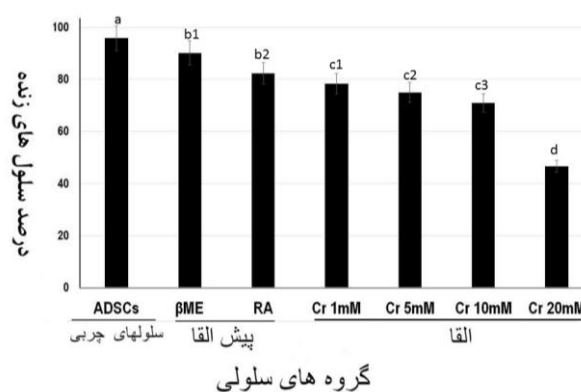


شکل ۲. تصویر بالا RT-PCR در سلول های شبه عصبی پس از مرحله پیش القا و استفاده از اسیدرتینوتیک ۱۰ میکرومولار به مدت ۲ روز ژنهای LC3، p62 و GABARAP بیان شد

تصویر پایین RT-PCR در سلول های بنیادین چربی ژن های اتوفازی LC3 و GABARAP بیان نشد، اما ژن p62 بیان شد. ژن GAPDH در دو گروه سلولی بیان گردید.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق که از روش مستقیم برای ایجاد سلول های شبه عصبی استفاده گردید، پس از پاساژ سوم سلول های بنیادین چربی به وسیله βME یک



نمودار ۱. درصد بقا سلول ها در گروههای چربی، پیش القا، القا

ADSCs: سلولهای بنیادین چربی به عنوان شاهد، βME: گروهی که بتامرکاپتاتانل با دوز یک میلی مولار به مدت یک ساعت دریافت کردند، RA: گروهی که اسیدرتینوتیک با دوز ۱۰ میکرومولار به مدت ۲ روز دریافت کردند. Cr: گروههایی که کریاتین با دوزهای ۰.۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار به مدت ۵ روز قرار گرفتند. گروهها با حروف لاتین مشخص شده اند و گروه a به جز b1 با بقیه گروهها اختلاف معنی دار داشت. همچنین گروه d با تمامی گروهها اختلاف معنی دار داشت و نیز c3 با b1 اختلاف معنی دار داشتند ($p < 0.05$). بقیه گروهها در مقایسه با هم اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($p > 0.05$).

تعیین میزان تمایز به روش ایمونوسیتوشیمی: در بررسی ایمونوسیتوشیمی سلولهای بنیادین چربی بعد از مراحل پیش القا و القا با آنتی بادی های nestin (نشانگرشبه عصبی) و GABA (نشانگرشبه گابارژیکی) درصدهای متفاوتی از مثبت بودن سلول ها بوسیله میکروسکوپ فلورسنت تشخیص داده شد. به منظور تعیین درصد سلول های ایمونوپوزیتو شبه عصبی و همچنین شبه گابارژیکی شمارش سلولی صورت گرفت. در روز پنجم القا، میزان بیان آنتی بادی nestin در گروه سلولهای بنیادین چربی ۱٪، در گروه βME 3 ± 2 ٪، در گروه RA 5 ± 2 ٪ و در گروههای کریاتین، ۱ میلی مولار 8 ± 2 ٪، ۵ میلی مولار 47 ± 4 ٪، ۱۰ میلی مولار 56 ± 5 ٪ و ۲۰ میلی مولار 49 ± 2 ٪ بود (نمودار ۲). در روز پنجم القا، میزان بیان آنتی بادی GABA در گروه سلولهای بنیادین چربی 2 ± 1 ٪، در گروه βME 4 ± 1 ٪، در گروه RA 6 ± 1 ٪ و در گروههای کریاتین، ۱ میلی مولار 12 ± 1 ٪، ۵ میلی مولار 50 ± 2 ٪، ۱۰ میلی مولار 58 ± 2 ٪ و ۲۰ میلی مولار 40 ± 3 ٪ بود (نمودار ۲). در روز پنجم القا به وسیله کریاتین در دوز ۱۰ میلی مولار بیان نشانگرهای nestin با میانگین 56 ± 5 ٪ و GABA به میزان 58 ± 2 ٪ عمدتاً به طور معنی داری ($p < 0.05$) نسبت به دوزهای دیگر بیشتر بود (نمودار ۲). در مقایسه بین گروههای القا در دوز ۱ و ۲۰ میلی مولار اختلاف بیان بین آنتی بادی nestin و GABA معنی دار بود، اما در دوز ۵ و ۱۰ میلی مولار اختلاف بیان بین آنتی بادی nestin و GABA معنی دار نبود. از طرفی تمایز به سلول های شبه نورونی و شبه گابارژیکی در مرحله پیش القا کمتر از ۶ درصد بود، که نشان داد مرحله پیش القا به تنهایی قادر به ایجاد سلول های نورونی و گابارژیکی نمی باشد (نمودار ۲).

بررسی سلول ها به وسیله RT-PCR: در سلول های بنیادین چربی ژن های اتوفازی LC3 و GABARAP بیان نشد، اما ژن p62 بیان شد. در سلول های شبه عصبی پس از مرحله پیش القا و استفاده از اسیدرتینوتیک ۱۰

کلسیمی میتوکندریایی و حفظ تعادل ATP، از نکرور و آپوپتوز در سلول های عصبی، تا حد زیادی جلوگیری می کند (۴۲). کریاتین به وسیله مواد غذایی و همچنین بصورت آندوژن در بدن تأمین می شود. کریاتین اثرات مستقیم ضد آپوپتوزی دارد (۴۳). کمبود کریاتین در بیماران مبتلا به آسیب سیستم عصبی در اثر صدمات مشاهده گردیده است (۴۳). در مطالعات قبلی کریاتین باعث افزایش تمایز سلول های بنیادی به سلول های شبه گابارژیکی شده است (۲۶، ۲۷). همچنین گزارش شده است که کریاتین دارای اثرات محافظت نورونی در موش مدل ضایعات نخاعی است (۴۴). پس از آسیب نخاعی، کریاتین جلوی تخریب بیش از حد نورون ها را به وسیله بهبود عملکرد متابولیسم انرژی، می گیرد (۴۵)، همچنین کریاتین باعث ایجاد سلول های گابارژیکی از استریاتوم (۲۶) و نخاع جنین موش (۴۶) می شود.

نورون های گابارژیگ مهمترین منبع تولید نوروترانسمیتر گابا هستند. همچنین سلول های عصبی و گلیال در مغز در حال تکامل گابا را تولید و رها می کنند. گابا از گلوتمات به وسیله آنزیم گلوتمات اسید دکربوکسیلاز ایجاد می شود. گابا علاوه بر اینکه نوروترانسمیتر مهاری و تحریکی است، همچنین به عنوان یک مولکول سیگنالی می باشد که اثرات اتوکراین و پاراکراین دارد و در تشکیل سیستم عصبی در دوره جنینی، نقش مهمی بازی می کند. گابا مانند فاکتورهای رشد عصبی باعث رشد آکسون می شود (۴۷). گابا فاکتوری است که به وسیله دیپلایزه کردن غشای سلولی و افزایش کلسیم آزاد درون سلول، باعث رها شدن فاکتورهای رشد می شود (۴۸). سلول های گابارژیکی در کاهش درد نقش دارند، آسیب نخاعی سبب فعال شدن عوامل آپوپتوزی، بدنبال آن افزایش اکسیداسیون، التهاب و در نهایت منجر به مرگ سلول های گابارژیکی در نخاع می شود و درد دیگر مهار نمی شود (۴۹). در دوره جنینی اگر سلولهای گابارژیکی دچار آسیب شوند، سلول های تحریکی گلوتامینرژیکی افزایش یافته باعث افزایش تحریک پذیری کورتکس و بیماری صرع می شود (۵۰).

سلول های بنیادین چربی در مرحله پیش القا تحت اثر β ME و اسیدرتینوئیک در محیط کشت به سلولهای شبه نورونی متمایز شدند، در حالی که میزان تمایز به سلول های شبه گابارژیک بسیار کم بود. این سلول ها، پس از مرحله القا به وسیله کریاتین ۱۰ میلی مولار پس از ۵ روز، درصد زیادی نورون های شبه گابارژیک ایجاد گردید. ژنهای اتوفازی در سلول های پیش القا شده، بیان شد و احتمالاً اتوفازی در القا سلولی نقش دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت حمایت مالی از تحقیق و کارشناسان خانمها فهیمه حاج آقایی و هاجر صادقی تقدیر و تشکر می گردد.

میلی مولار به مدت یک ساعت و اسید رتینوئیک ۱۰ میکرومولار، به مدت دوروز به سلول های شبه عصبی تبدیل شدند و به دنبال آن به وسیله (۳۰) کریاتین ۱۰ میلی مولار، به مدت ۵ روز بیشترین میزان نورونهای شبه گابارژیکی ایجاد گردید. امروزه در درمان بیماری های سیستم عصبی از سلول درمانی و سلولهای بدن خود بیمار استفاده می شود، زیرا سلول های بدن بیمار مشکل رد شدن توسط سیستم ایمنی را ندارند. سلولهای بنیادین عصبی در هیپوکامپ و نواحی اطراف بطنی قرار دارند (۳۱). استخراج این سلول ها و استفاده از آنها در درمان بیماری خود بیمار تقریباً غیر ممکن است. آسانترین ایده در درمان این بیماران، استخراج سلول های بنیادی مزانشیمی مانند چربی از خود شخص و تمایز آنها به سلول های بنیادین عصبی است. ایجاد سلول های شبه عصبی از سلول های بنیادین چربی به وسیله اسید رتینوئیک احتمالاً از طریق فعال سازی اتوفازی می باشد. علاوه بر مکانیسم اثر کلاسیک اسیدرتینوئیک از طریق گیرنده های هسته ای، اخیراً مکانیسم اثر تمایزی دیگر آن، از طریق فعال کردن اتوفازی شرح داده شده است (۲۰).

مطالعه مسیر های بیوشیمیایی، سلولی و مولکولی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سطح وسیعی برای مطالعه بیماری های عصبی متفاوتی در جریان است (۳۰، ۳۲-۳۴). یکی از کاربردهای هدفمند این مطالعات استفاده در مطالعات درمانی به روش های سلول درمانی و ژن درمانی است (۳۵-۳۸). از مسیرهای بیوشیمیایی مهم مورد مطالعه در بیماری های عصبی اتوفازی می باشد. پروتئین های زیادی در شروع و ادامه و اتمام اتوفازی دخیل هستند (۳۹، ۴۰). پروتئین LC3 برای شروع اتوفازی و تشکیل اتوفاگوزوم نیاز است. در مطالعات بیان LC3 و p62 نشان دهنده فعالیت اتوفازی می باشد و میزان بیشتر LC3-II بیانگر افزایش تشکیل واکوئول های اتوفازی در سلول می باشد (۱۹). GABARAP نیز نقشی مانند LC3 دارد. هر دو جز یک خانواده هستند و ظرفیت اتصال به اتوفاگوزومها را بهبود می بخشند (۱۹). p62 یک پروتئین داخل سلولی است که در اثر استرس سلولی، القاء شده و در تنظیم مسیرهای سیگنالی حیات و مرگ سلول نقش دارد. عملکرد p62 آن در انتقال سیگنال، تکثیر، بقای سلول، مرگ، تورم، تشکیل تومور و در پاسخ به استرس اکسیداتیو می باشد و این پروتئین در اثر القای اتوفازی بیان می شود (۴۱). در این مطالعه در در سلول های بنیادین چربی ژن LC3 بیان نشد، اما در سلول های شبه عصبی پس از مرحله پیش القا و استفاده از اسیدرتینوئیک ۱۰ میکرومولار به مدت ۲ روز ژنهای LC3، p62 و GABARAP بیان شد که نشان دهنده فعال شدن اتوفازی در این سلول ها است. در مرحله القا برای تمایز سلول های شبه عصبی به نورون های شبه گابارژیک از کریاتین ۱۰ میلی مولار استفاده گردید و بیشترین میزان نورون های شبه گابارژیک ایجاد گردید. کریاتین دارای خواص حفاظت نورونی در سلولهای عصبی در مقابل صدمات ناشی از ایسکمی و هایپوکسی است (۴۲). در مدل های ضایعات مغزی و نخاعی، کریاتین جلوی افزایش آسیب را می گیرد. کریاتین پس از ضایعه از طریق ثابت نگاه داشتن پتانسیل غشای میتوکندری، کاهش سطح

Creatine and retinoic acid effects on the induction of autophagy and differentiation of adipose tissue-derived stem cells into GABAergic-like neurons

Sh. Darabi (PhD)^{*1}, T. Tiraihi (PhD)², A. Noori-Zadeh (PhD)³, F. rajaei(PhD)¹,
L. Darabi (MD)¹, H. A. Abbaszadeh (PhD)⁴

1.Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, I.R.Iran

2.Department of Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran. I.R.Iran

3.Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, I.R.Iran

4.Hearing Disorder Research center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(8); Aug 2017; PP: 41-9

Received: Mar 11th 2017, Revised: Apr 4th 2017, Accepted: May 6th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Deficit of inhibitory GABAergic neurons as a part of central nervous system (CNS) pathogenesis was reported in neurodegenerative disorders; and adipose-derived stem cells (ADSCs) were shown to be a feasible option for cell transdifferentiation in neuronal disorders therapy. In this study, the role of autophagy in differentiation was considered by evaluating the expression of the autologous genes of LC3, P62 and GABARAP in fatty stem cells and after the pre-induction stage.

METHODS: In this experimental study, under sterile conditions ADSCs were obtained from pararenal fat of two male adult rats. The cells were divided into three groups of fatty stem cells, pre-induction and induction. Following third passages of cell culture, ADSCs were preinduced to neural-like cells (NLCs) using 1mM β -mercaptoethanol (β ME) and 10 μ M retinoic acid (RA), and then NLCs were induced by creatine(Cr) in 1, 5, 10, 20 millimolar for 5 days. In induction stage, the effects of creatine on differentiation were studied by anti nestin and GABA antibody immunostainig. The roles of GABARAP, LC3 and p62 autophagy genes in transdifferentiation were assessed by RT-PCR.

FINDINGS: Immunocytochemical studies on ADSCs using CD49d indicated that cultured cells were ADSCs. In the immunochemical studies of the induction stage, at a dose of 10 mM creatinine for 5 days, the expression of the GABA neurons and the nestin-like neuronal cell marker were 58 $\pm$ 2% and 56 $\pm$ 5%, respectively which had a significant difference with other doses and control group ($p < 0.05$). RT-PCR results indicated that in pre-induced cells autophagy genes of GABARAP, LC3 and p62 were expressed but only P62 gene was expressed in fatty stem cells.

CONCLUSION: This study demonstrated that fatty stem cells after induction are able to express nestin and GABA neuronal markers. GABARAP, LC3 and p62 autophagy genes were expressed in pre-induced cells, which indicates the potential role of autophagy in the differentiation of fatty stem cells into nerve-like cells.

KEY WORDS: GABAergic-like neurons, Adipose derived stem cells, Creatine, Autophagy.

Please cite this article as follows:

Darabi S, Tiraihi T, Noori-Zadeh A, Rajaei F, Darabi L, Abbaszadeh HA. Creatine and retinoic acid effects on the induction of autophagy and differentiation of adipose tissue-derived stem cells into GABAergic-like neurons. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(8):41-9.

*Corresponding author: Sh. Darabi (PhD)

Address: Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.

Tel: +98 28 33336001

Email: shahram2005d@yahoo.com

References

1. Waldvogel HJ, Faull RL. The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv Pharmacol.* 2015;73:223-64.
2. Lanctot KL, Herrmann N, Mazzotta P, Khan LR, Ingber N. GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia. *Can J Psychiatry.* 2004;49(7):439-53.
3. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron.* 2001;31(1):47-58.
4. Balan S, Yamada K, Iwayama Y, Hashimoto T, Toyota T, Shimamoto C, et al. Comprehensive association analysis of 27 genes from the GABAergic system in Japanese individuals affected with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2017.
5. Rubenstein JL, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2003;2(5):255-67.
6. Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15(5):27.
7. Mohammad-Gharibani P, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Taheri T. Improvement of contusive spinal cord injury in rats by co-transplantation of gamma-aminobutyric acid-ergic cells and bone marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 2013;15(9):1073-85.
8. Darabi S, Tiraihi T, Delshad A, Sadeghizadeh M, Taheri T, Hassoun HK. Creatine Enhances Transdifferentiation of Bone Marrow Stromal Cell-Derived Neural Stem Cell Into GABAergic Neuron-Like Cells Characterized With Differential Gene Expression. *Mol Neurobiol.* 2017;54(3):1978-91.
9. Darabi S, Tiraihi T, Delshad A, Sadeghizadeh M. A new multistep induction protocol for the transdifferentiation of bone marrow stromal stem cells into GABAergic neuron-like cells. *Iran Biomed J.* 2013;17(1):8-14.
10. Lee SY, Kwon B, Lee K, Son YH, Chung SG. Therapeutic Mechanisms of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Tendon Injury Model. *Am J Sports Med.* 2017;363546517689874.
11. Shi J, Liang J, Guo B, Zhang Y, Hui Q, Chang P, et al. Adipose-Derived Stem Cells Cocultured with Chondrocytes Promote the Proliferation of Chondrocytes. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1709582.
12. Scioli MG, Bielli A, Gentile P, Cervelli V, Orlandi A. Combined treatment with platelet-rich plasma and insulin favours chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in three-dimensional collagen scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016.
13. Xie S, Lu F, Han J, Tao K, Wang H, Simental A, et al. Efficient generation of functional Schwann cells from adipose-derived stem cells in defined conditions. *Cell Cycle.* 2017;1-11.
14. Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, Delshad A, Taheri T. Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013;49(8):638-52.
15. Darabi S, Tiraihi T, Delshad A, Sadeghizadeh M, Khalil W, Taheri T. In vitro non-viral murine pro-neurotrophin 3 gene transfer into rat bone marrow stromal cells. *J Neurol Sci.* 2017;375:137-45.
16. Darvishi M, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Delshad A, Taheri T. Motor Neuron Transdifferentiation of Neural Stem Cell from Adipose-Derived Stem Cell Characterized by Differential Gene Expression. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37(2):275-89.
17. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo KI, Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6737345.
18. Hu Z, Yang B, Mo X, Xiao H. Mechanism and Regulation of Autophagy and Its Role in Neuronal Diseases. *Mol Neurobiol.* 2015;52(3):1190-209.
19. Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 2016;30(12):3961-78.
20. Rajawat Y, Hilioti Z, Bossis I. Autophagy: a target for retinoic acids. *Autophagy.* 2010;6(8):1224-6.
21. Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol.* 2001;209:1-77.
22. Chatzi C, Brade T, Duester G. Retinoic acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the basal ganglia. *PLoS Biol.* 2011;9(4):e1000609.
23. Ryu JH, Kong HJ, Park JY, Lim KE, An CM, Lee J, et al. Generation of late-born neurons in the ventral spinal cord requires the coordination of retinoic acid and Notch signaling. *Neurosci Lett.* 2015;602:95-8.

24. Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull*. 2008;76(4):329-43.
25. Nersesova LS. [Role of creatine kinase and its substrates in the central nervous system in norm and in various pathologies]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*. 2011;47(2):120-7.
26. Andres RH, Ducray AD, Huber AW, Perez-Bouza A, Krebs SH, Schlattner U, et al. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J Neurochem*. 2005;95(1):33-45.
27. Mohammad-Gharibani P, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Arabkheradmand J, Kazemi H. Induction of bone marrow stromal cells into GABAergic neuronal phenotype using creatine as inducer. *Restor Neurol Neurosci*. 2012;30(6):511-25.
28. Fisher C, Grahovac TL, Schafer ME, Shippert RD, Marra KG, Rubin JP. Comparison of harvest and processing techniques for fat grafting and adipose stem cell isolation. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(2):351-61.
29. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;282(1):148-52.
30. Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Bistoon-Beigloo S, Bakhtiyari S, Abbaszadeh HA, Darabi S, et al. Regulatory T cell number in multiple sclerosis patients: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;5:73-6.
31. He Z, Cui L, Paule MG, Ferguson SA. Estrogen Selectively Mobilizes Neural Stem Cells in the Third Ventricle Stem Cell Niche of Postnatal Day 21 Rats. *Mol Neurobiol*. 2015;52(2):927-33.
32. Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Saboor-Yaraghi AA. Epigenetic and gene expression alterations of FOXP3 in the T cells of EAE mouse model of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2017;375:203-8.
33. Shojaei F, Tavakolinia N, Divsalar A, Haertlé T, Saboury AA, Nemat-Gorgani M, et al. Biochemical and immunological aspects of protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2014;11(6):1503-12.
34. Abdanipour A, Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Bakhtiyari S, Nejatbakhsh R, Anarkooli IJ. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Hippocampus-Derived Neural Stem Cells Proliferation. *Cell journal*. 2017;19(1):166-72.
35. Naghdi P, Tiraihi T, Ganji F, Darabi S, Taheri T, Kazemi H. Survival, proliferation and differentiation enhancement of neural stem cells cultured in three-dimensional polyethylene glycol-RGD hydrogel with tenascin. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(3):199-208.
36. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Delshad A, Saghedizadeh M, Taheri T, Kazemi H, et al. Differentiation of neurosphere-derived rat neural stem cells into oligodendrocyte-like cells by repressing PDGF-alpha and Olig2 with triiodothyronine. *Tissue & cell*. 46(6):462-9.
37. Abdanipour A, Schluesener HJ, Tiraihi T, Noori-Zadeh A. Systemic administration of valproic acid stimulates overexpression of microtubule-associated protein 2 in the spinal cord injury model to promote neurite outgrowth. *Neurological research*. 2015;37(3):223-8.
38. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Darabi S, Karimi N, Naghikhani M, Ghasemi Hamidabadi H, et al. Condition medium of cerebrospinal fluid and retinoic acid induces the transdifferentiation of human dental pulp stem cells into neuroglia and neural like cells. *Anatomy & Cell Biology*. 2017;50(2):107-14.
39. Shams Nooraei M, Noori-Zadeh A, Darabi S, Rajaei F, Golmohammadi Z, Abbaszadeh HA. Low Level of Autophagy-Related Gene 10 (ATG10) Expression in the 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. *Iran Biomed J*. 2017;23:23.
40. Guo F, Liu X, Cai H, Le W. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol*. 2017;13(10):12545.
41. Gomez-Sanchez R, Yakhine-Diop SM, Rodriguez-Arribas M, Bravo-San Pedro JM, Martinez-Chacon G, Uribe-Carretero E, et al. mRNA and protein dataset of autophagy markers (LC3 and p62) in several cell lines. *Data Brief*. 2016;7:641-7.
42. Rabchevsky AG, Sullivan PG, Fugaccia I, Scheff SW. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. *J Neurotrauma*. 2003;20(7):659-69.
43. Braissant O, Henry H, Beard E, Uldry J. Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids*. 2011;40(5):1315-24.

- 44.Klivenyi P, Calingasan NY, Starkov A, Stavrovskaya IG, Kristal BS, Yang L, et al. Neuroprotective mechanisms of creatine occur in the absence of mitochondrial creatine kinase. *Neurobiol Dis.* 2004;15(3):610-7.
- 45.Hausmann ON, Fouad K, Wallimann T, Schwab ME. Protective effects of oral creatine supplementation on spinal cord injury in rats. *Spinal Cord.* 2002;40(9):449-56.
- 46.Ducray AD, Qualls R, Schlattner U, Andres RH, Dreher E, Seiler RW, et al. Creatine promotes the GABAergic phenotype in human fetal spinal cord cultures. *Brain Res.* 2007;1137(1):50-7.
- 47.Jelitali M, Madarasz E. The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol.* 2005;71:27-62.
- 48.Marty S, Berninger B, Carroll P, Thoenen H. GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron.* 1996;16(3):565-70.
- 49.Gwak YS, Hulsebosch CE. GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology.* 2011;60(5):799-808.
- 50.Wang DD, Kriegstein AR, Ben-Ari Y. GABA regulates stem cell proliferation before nervous system formation. *Epilepsy Curr.* 2008;8(5):137-9.