Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷

بررسی تاثیر تکثیری عصاره متانولی برگ گیاه گزنه بر سلول‌های بنیادی عصبی در محیط اکسیداتیو

سارا هراتی زاده .M.Sc[۱]، مریم نظم بجنوردی .Ph.D[۲]، محمدعلی ابراهیم زاده .Ph.D[۳]، کسری احمدی مقدم .MD[۴]، غزاله گودرزی .M.Sc [۱]، هاتف قاسمی حمیدآبادی .Ph.D[۵*]

۱- دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی،کمیته تحقیقات دانشجویی، کارشناسی ارشد علوم تشریح، ساری، ایران
۲- دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، ساری، ایران
۳- دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، مرکزتحقیقات علوم داروئی متخصص شیمی داروئی، ساری، ایران
۴- دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، واحد ساری، ساری، ایران
۵- دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، ساری، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: hatefdr@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش ایجاد شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی و تیمار این سلول‌ها با عصاره متانولی برگ گیاه گزنه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی استخراج سلول‌های بنیادی عصبی از ناحیه هیپوکامپ نوزاد یک روزه موش صحرایی نر انجام شد. شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلولی، با افزودن هیدروژن پراکسید ایجاد شد. پس از تایید هویت سلول‌های عصبی به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط اکسیداتیو و سپس در معرض دوزهای مختلف ۲۰،۱۰،۲/۵ ،۵ و ۴۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی برگ گزنه قرار گرفتند. بررسی نهایی مقدار تکثیر سلول‌ها با استفاده از تست زنده مانیMTT انجام شد. گروه‌های تحقیق شامل گروه تجربی: شرایط اکسیداتیو ودریافت عصاره گزنه و گروه کنترل: شرایط اکسیداتیو بدون عصاره بود.

نتایج: سلول‌های بنیادی عصبی دارای مورفولوژی عصبی و بیان کننده‌ی نشانگر نستین بودند. درصد تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل بیشتر بود به‌طوری‌که تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بود $p<۰/۰۵$.

نتیجه گیری: عصاره متانولی برگ گیاه گزنه دارای اثرات محافظتی و نورروپروتکتیو بوده و می‌تواند شرایط آسیب اکسیداتیو اعمال شده در شرایط آزمایشگاهی را تعدیل و اختلال عملکرد سیستم عصبی به‌دنبال تولید رادیکال‌های آزاد را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: عصاره، سلول بنیادی عصبی، هیپوکامپ،گزنه، اکسیداتیو

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

به‌طورکلی در بیماری‌های نورودژنراتیو از دست رفتن پیشرونده نورون‌ها رخ می‌دهد که علت دقیق آن هنوز در دست بررسی است اما استرس اکسیداتیو (حاصل تولید رادیکال آزاد) به‌عنوان یکی ازعلل اصلی بروز انواع این بیماری‌ها مطرح شده است. رادیکال‌های آزاد و دیگر انواع اکسیژن باز فعال به‌طور مداوم در طی فرآیندهای فیزیولوژیک طبیعی و همچنین در وضعیت‌های پاتولوژیک تولید می‌شوند که توسط سیستم آنتی اکسیدانت ذاتی بدن با مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی به‌شکل غیر فعال در می‌آیند اما در شرایطی مانند آن‌چه در هنگام بیماری‌های نورودژنراتیو اتفاق می‌افتد تعادل بین رادیکال‌های آزاد و مکانیسم‌های آنتی اکسیدانت بدن به‌هم می‌خورد. لذا استفاده از آنتی اکسیدانت‌های کمکی به‌ویژه انواع طبیعی آن‌ها می‌تواند به بهبود یا توقف روند بیماری کمک کنند. یکی از ماکرومولکول‌هایی که در اثر استرس اکسیداتیو آسیب می‌بیند داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) است که متعاقب این آسیب القای آپوپتوزیس و جلوگیری از تقسیم سلولی رخ می‌دهد (۱-۴).

به‌منظور ترمیم آندوژنوس اعصاب، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی از طریق محرک‌هایی مانند هورمون‌ها، نوروترنسمیترها و عوامل رشدی صورت می‌گیرد. همچنین عناصر گیاهی هم به‌علت داشتن موادی مانند آنتی اکسیدانت‌ها در این میان دارای نقش موثری دارند و به لحاظ مقرون به‌صرفه بودن و مقبولیت عامه آن‌ها مورد توجه بوده اند (۵, ۶)

گیاه گزنه با نام علمی *UrticaDioica* به‌فراوانی در شمال کشور یافت می‌شود و از جمله گیاهان پرمصرف در طب سنتی محسوب می‌شود. در طب گیاهی از برگ این گیاه جهت درمان برخی بیماری‌های پوست و مو مانند اگزما و بیماری‌های التهابی استفاده می‌شود. همچنین پایین آورنده قندخون، اسید اوریک است. برگ گیاه گزنه دارای ترکیبات بیولوژیک فراوانی از جمله آلکالوئیدها است که برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله فشارخون، سرطان و بیماری‌های التهابی کاربرد دارد. در برگ و میوه آن ترکیبات تانن، فلاونوئید و آنتوسیانین شناخته شده است. ریزوم این گیاه نیز حاوی آلکالوئید، فلاونوئید، تانن، گلیکوزید قلبی، ترپنوئیدها، آنتراکینون و ساپونین می‌باشد و در درمان هیپرتیروئیدی، روماتیسم و آلرژی به‌کار می‌رود. به‌علاوه عصاره متانولی میوه، برگ و ریزوم این گیاه (پس از استخراج با هگزان و اتیل استات) و همچنین عصاره هگزانی اندام هوائی آن اثر ضد التهابی مناسبی از خود نشان داده‌اند. فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌های آبی و متانولی میوه و گل این گیاه نیز اخیرا به چاپ رسیده است. ترکیبات گیاهی با ویژگی‌های مختلفی از جمله خاصیت آنتی اکسیدانتی خود با اثر بر روی سلول‌های بنیادی عصبی می‌توانند روند اکسیداسیون را به تاخیر انداخته یا مهار کند و نقش به‌سزایی در روند ترمیمی بیماری‌های نورودژنراتیو ایفا نماید (۷-۱۱)

سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells,NSCs) (دارای توانایی تمایز به تمامی رده‌های نورواکتودرمال از جمله نورون، آستروگلیا و الیگودندروگلیا است و می‌توانند با مهاجرت به نواحی آسیب دیده مغزی باعث بهبود شرایط بیماری شوند. به‌علاوه سلول‌های بنیادی عصبی تحت تاثیر عوامل محیطی نظیر شرایط اکسیداتیو حاصل از بیماری‌های تحلیل عصبی رفتار متفاوتی از خود بروز می‌دهند و دچار نقص عملکردی می‌شوند. به‌عنوان مثال در بیماری آلزایمر افزایش یون آهن و مس در مغز، تشکیل رادیکال‌های آزاد را تحریک می‌کند و سطح استرس اکسیداتیو افزایش یافته و علایم بیماری نمایان می‌شود. درنتیجه تعدیل یا خنثی سازی محیط بیولوژیک این سلول‌ها در شرایط بیماری می‌تواند در روند بهبود اختلالات عصبی مفید واقع شود (۵, ۶, ۱۲-۱۴).

در قرن اخیر بررسی خواص آنتی اکسیدانتی مواد گوناگون از جمله ترکیبات گیاهی به‌عنوان عامل موثر بر سلامت انسان مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون بیش از ۳۰ درصد داروهای مصرفی در بیمارستان‌ها و کلینیک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

درمانی را داروهای گیاهی تشکیل می‌دهد و عصاره‌های گیاهی به‌عنوان مکمل طب مدرن به‌طور وسیع استفاده می شود. علی‌رغم وجود داروهای استروئیدی و غیر استروئیدی فراوان برای درمان بیماری‌های التهابی، تمایل به‌سمت داروهای طبیعی به‌علت ارزش استراتژیک و اقتصادی و به‌ویژه عوارض کمتر و دسترسی آسان‌تر وجود دارد (۱۰, ۱۵).

با این‌که مطالعات زیادی بر روی خواص آنتی اکسیدانتی گیاه گزنه انجام شده است، اطلاعات در مورد خواص و پتانسیل آن در جلوگیری یا مدیریت بیماری‌های نورودژنراتیو مربوط به استرس اکسیداتیو محدود است (۱۶). لذا هدف از این مطالعه تاثیر آنتی اکسیدانتی عصاره متانولی برگ گیاه گزنه بر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط آزمایشگاهی مملو از رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره متانولی برگ گیاه گزنه: برگ‌های گیاه گزنه از ۱۰ کیلومتری جاده سری-قائم‌شهر جمع آوری و به آزمایشگاه شیمی دارویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل شد. پس از خشک کردن آن، قطعات خشک شده برگ گیاه به‌مدت ۲۴ ساعت در متانول خیسانده شده و سپس محلول‌های جمع آوری شده با دستگاه تبخیر در خلا مورد تبخیر قرار گرفته و به‌روش خشک کردن در خلا توسط انجماد آماده شد (۱۷).

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی عصبی: مطالعات حیوانی این تحقیق پس از تصویب کد اخلاق به‌شماره ۱۶۰۳ در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از نوزاد موش یک روزه صحرایی نر نژاد اسپراگو داولی صورت گرفت. بدین‌ترتیب که ابتدا بخش هیپوکامپ از دو نیمکره در شرایط استریل جدا شد. سپس با استفاده از هضم آنزیمی و مکانیکی به‌ترتیب با آنزیم (Gibco, Canada)Trypsin-EDTA و له کردن بافت توسط سرسوزن سرنگ انسولین سوپ سلولی حاصل شد. در ادامه با سانتریفیوژ، رسوب سلولی حاصل جهت کشت سلولی به فلاسکی که حاوی محیط کشت پایه DMEM/F12 (Gibco, Canada)، FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, Canada)و Pen/Strep (Penicillin 100 unit/ml & Streptomycin 100 unit/ml) است منتقل و محیط کشت سلول‌های مورد نظر پس از ۲۴ ساعت تعویض شد و در ادامه روند کشت سلول، قبل از این‌که سلول‌ها کف فلاسک را به‌طور کامل بپوشانند تریپسینه شده و به فلاسک دیگری منتقل شد. در پژوهش مذکور سعی بر این بود که از پاساژ سوم سلولی استفاده شود (۱۸). گروه‌های تحقیق شامل گروه تجربی: شرایط اکسیداتیو و دریافت عصاره گزنه و گروه کنترل: شرایط اکسیداتیو بدون عصاره بود.

بررسی مورفولوژی: مورفولوژی سلول‌ها در گروه‌های مختلف، توسط میکروسکوپ معکوس (Nikon,Eclipse-TS100) به‌صورت روزانه مشاهده و بررسی شد. همچنین جهت رنگ‌آمیزی گیمسا ابتدا ۲×۱۰^{۵} سلول به‌هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای حاوی لامل استریل اضافه و پس از گذشت یک شبانه روز، لامل ۳ بار با PBS شستشو و به‌وسیله محلول پارافرمالدئید ۴ درصد (Paraformaldehyde, PFA, Sigma-Aldrich) به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شد. پس از شستشو با محلول بافر فسفات (Phosphate-buffered Saline, PBS)، رنگ گیمسا به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه بر روی سلول‌ها ریخته و رنگ اضافی با کمک PBS از محیط سلولی خارج و سلول‌ها با میکروسکوپ بررسی شدند (۱۹).

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی: جهت تایید هویت سلول‌های بنیادی عصبی از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا سلول‌های بنیادی عصبی در محلول PBS سه مرتبه شستشو و سپس به‌منظور ثبوت (Fixation) سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در پارافرمالدئید

www.SID.ir

Archive of SID

۴ درصد قرار داده شدند. جهت جلوگیری از واکنش‌های غیر اختصاصی سلول‌ها به‌وسیله محلول مهار کننده سرم به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با آنتی بادی‌های اولیه Nestin (abcam) انکوبه و در ادامه آنتی بادی ثانویه مناسب اضافه شد. سرانجام با میکروسکوپ فلورسانس (Leica, Wetzlar, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۸).

تیمار سلول‌های بنیادی عصبی توسط عصاره گیاهی: این ارزیابی در دو مرحله مجزا صورت گرفت. در مرحله اول به‌منظور به‌دست آوردن مولاریته مناسب برای ایجاد شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلولی، 5×10^4 سلول را به‌هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل و پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار از هیدروژن پراکسید را به همه گروه‌ها به‌جز گروه کنترل اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت تست زنده مانی بر روی پلیت ۹۶ خانه انجام و توسط دستگاه Eliza plate reader (Synergy H11, Bio Tek, USA) با طول موج ۵۷۰ نانومتر مقدار جذب هر گروه برآورد شد. در ادامه با استفاده از نرم افزار calcusyn میزان تجمع مهارکننده (IC50) پراکسید هیدروژن محاسبه شد. همچنین درصد سمیت پراکسید هیدروژن با استفاده از فرمول زیر بررسی شد.

۱۰۰ ×(میانگین جذب گروه کنترل / میانگین جذب هر گروه) -۱

در مرحله دوم 5×10^4 سلول به‌هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، به‌تمامی گروه‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن با غلظت ۵۰ میکرومولار برای ایجاد شرایط اکسیداتیو اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت عصاره متانولی برگ گیاه گزنه به‌صورت جداگانه با دوزهای ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌میزان ۵۰ میکرولیتر به همه گروه ها به‌جز گروه کنترل منفی اضافه شد. این مرحله نیز ۲۴ ساعت به‌طول انجامید. سپس کمیت سلول‌ها توسط روش رنگ سنجی MTT ارزیابی شد. در هر مرحله قبل و بعد از تیمار برای مقایسه مورفولوژی سلول‌ها از پلیت‌های حاوی سلول با دوربین دیجیتال و میکروسکوپ معکوس عکس گرفته شد.

سنجش کمیت سلول‌ها به‌روش رنگ سنجی MTT (تست زنده مانی): به‌منظور ارزیابی مقدار تکثیر سلول‌ها ۵ میلی‌گرم از پودردی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم (Dimethylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide ,MTT ,Sigma-Aldrich) در یک میلی لیتر PBS استریل حل شده و ۲۰ میکرون از محلول زرد رنگ حاصل به‌ازای ۲۰۰ میکرون محیط کشت در هر یک از چاهک‌ها ریخته شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، به‌منظور حل کردن بلورهای نامحلول فورمازون در کف پلیت سلولی به‌هر یک از چاهک‌ها حدود ۲۰۰ میکرون Dimethyl DMSO (Sulfoxide, Sigma) اضافه شد. سرانجام جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza plate reader محاسبه گردید. لازم به‌ذکر است که تست MTT با سه بار تکرار انجام شد (۱۷, ۱۸).

روش تجزیه و تحلیل آماری: روش محاسبه، تجزیه و تحلیل داده‌ها بر مبنای مقایسه میانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروه‌ها از آزمون ANOVA و کی اسکوا استفاده شد. محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS 16 صورت گرفت. علاوه بر این سطح معنی‌داری $p\geq0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

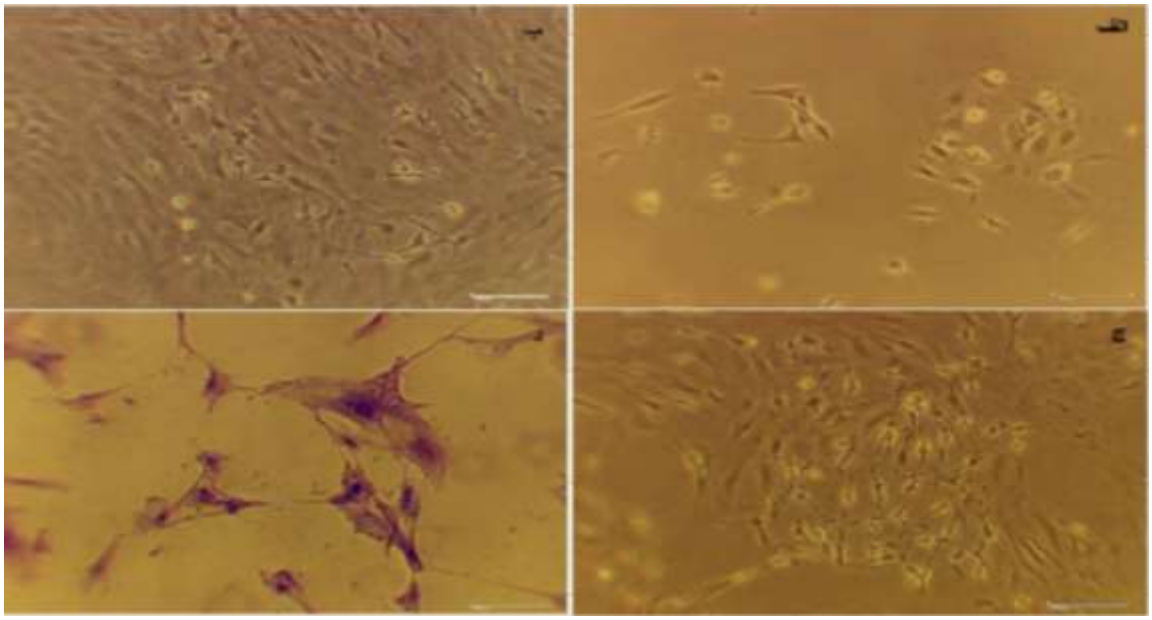
کشت سلول‌های بنیادی عصبی و بررسی مورفولوژی

در روز اول پس از استخراج سلول‌های بنیادی عصبی به‌صورت کلنی با زوائد طویل به کف پلیت سلولی چسبیده بودند (شکل ۱ الف) و به‌مرور زمان از هم جدا شدند و ظاهر سلول عصبی با قدرت تقسیم را به‌خود گرفتند. ۷ روز بعد از استخراج، سلول‌ها کف فلاسک را به‌طور کامل پر کردند و به‌طور کامل به دیش چسبیدند (شکل ۱ ب). پس از پاساژ اول سلول‌ها دارای ظاهری یک‌دست، کشیده

www.SID.ir

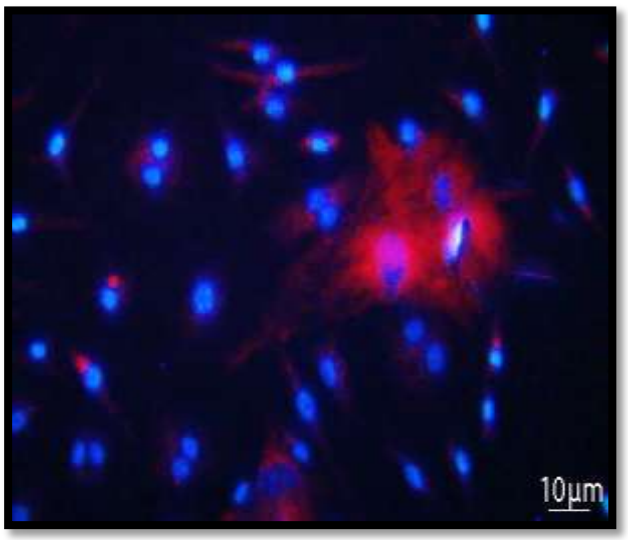
Archive of SID

و دوقطبی و چندقطبی به‌همراه تشکیل شبکه‌های گسترده و منظم سلولی بودند (شکل ۱ ج). اما مورفولوژی NSCs به‌طور اختصاصی با رنگ آمیزی گیمسا انجام شد که تاییدکننده واکنش مثبت و موید ظاهر عصبی این سلول‌ها بود (شکل ۱ د).



شکل۱: مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ نوزاد موش صحرایی. الف) ۲۴ ساعت پس از استخراج. ب) ۷ روز پس از استخراج. ج) پس از اولین پاساژ، د) رنگ آمیزی گیمسا، (مقیاس ۱۰۰ میکرومتر)

نتایج رنگ امیزی فلورسنت برای مارکر عصبی Nestin موید بیان واکنش مثبت این مارکر و تایید ماهیت عصبی و خلوص این سلول‌ها بود (شکل ۲).



شکل ۲: ایمنوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی عصبی (مارکر عصبی به رنگ قرمز و هسته به رنگ آبی دیده می‌شود). (مقیاس ۱۰ میکرومتر).

www.SID.ir

Archive of SID

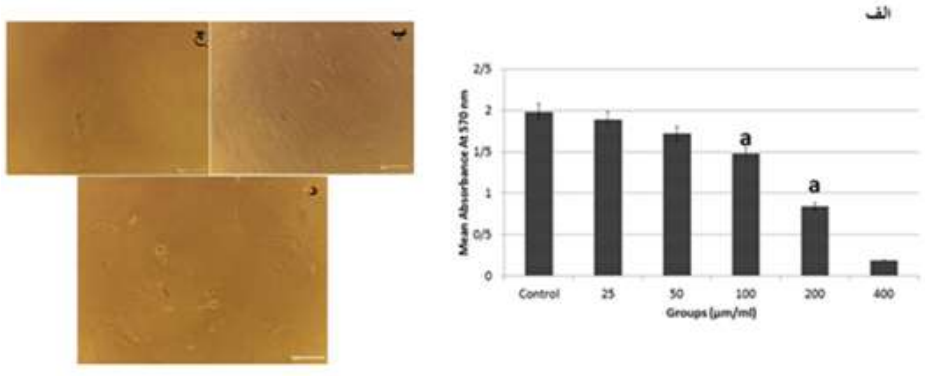
تست زنده مانی MTT

نتایج این تست نشان داد که میزان زنده مانی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف H_2O_2 کاهش می‌یابد (جدول ۱). همچنین با استفاده از میانگین جذب گروه‌های تیمار، مقدار تجمع مهارکننده (IC_{50}) پراکسید هیدروژن ۱۲۰ به‌دست آمد که با توجه به‌مقدار IC50 و مطالعات گذشته (۱۳) غلظت ۵۰ میکرومولار H_2O_2 جهت اعمال استرس اکسیداتیو مطلوب به‌نظر رسید. درصد سمیت پراکسید هیدروژن نیز درجدول ۱ نشان داده شده است که گویای اثرات مخرب این ماده بر روی سلول‌های بنیادی عصبی در محیط کشت است.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار پراکسید هیدروژن در گروه‌های مختلف $p<۰/۰۵$

گروه (میکروگرم بر میلی لیتر)	میانگین جذب
کنترل	۱/۹۸±۰/۰۱۳۲
غلظت ۲۵	۱/۸۹±۰/۰۱۸۶
غلظت ۵۰	۱/۷۲±۰/۰۴۰۲
غلظت ۱۰۰	۱/۴۸±۰/۰۳۱۴
غلظت ۲۰۰	۰/۸۴±۰/۰۲۹۱
غلظت ۴۰۰	۰/۱۸±۰/۰۰۱۱

شکل ۳ الف نیز نتایج تست زنده مانی را در مرحله دوم یعنی بررسی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ گیاه گزنه را نشان می‌دهد. در تمامی گروه‌ها میزان جذب نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش یافت و همچنین بیشترین میزان تکثیر سلول‌ها در حضور عصاره برگ گیاه در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر اتفاق افتاد. شکل ۳: ب مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی در گروه فاقد H_2O_2 و عصاره گیاهی شکل ۳ ج مورفولوژی‌سلول‌های بنیادی عصبی در گروه H_2O_2و بدون عصاره گیاهی و شکل ۳ د مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی در گروه تحت تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد. لازم به‌ذکر است که کم‌ترین میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی عصبی در گروه فاقد عصاره گیاهی یعنی گروه کنترل مثبت مشاهده شد (جدول ۲).



شکل ۳: ارزیابی سلول‌های بنیادی عصبی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ گیاه گزنه. الف) نمودار تست زنده‌مانی سلول‌های بنیادی عصبی در حضور غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ گیاه گزنه (a: وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار نسبت به گروه‌های کنترل ($p\leq۰/۰۵$). ب) سلول‌های بنیادی عصبی در گروه فاقد H_2O_2 و عصاره گیاهی. ج) سلول‌های بنیادی عصبی در گروه H_2O_2و بدون عصاره گیاهی. د) سلول‌های بنیادی عصبی در گروه تحت تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (مقیاس ۱۰ میکرومتر).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار عصاره برگ گیاه گزنه در گروه‌های مختلف ($p\leq ۰/۰۵$).

گروه (میکروگرم بر میلی لیتر)	میانگین جذب
کنترل	۰/۱۶±۰/۰۰۰۶
غلظت ۲/۵	۰/۲۶±۰/۰۰۴۶
غلظت۵	۰/۳۰±۰/۰۰۳۳
غلظت۱۰	۰/۳۲±۰/۰۰۵۳
غلظت۲۰	۰/۳۹±۰/۰۰۴۲
غلظت۴۰	۰/۲۸±۰/۰۰۱۳

بحث

نتایج تحقیق حاضرنشان دهنده افزایش میزان تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی عصبی در حضورعصاره متانولی گزنه در شرایط استرس اکسیداتیو در محیط آزمایشگاهی می‌باشد و این نتیجه موید قابلیت بالقوه این گیاه در روند ترمیم عصبی می‌باشد.

از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی در اکثر مناطق جهان مرسوم بوده و تاکنون توانسته گام‌های مهمی در درمان انواع مختلف بیماری‌ها در طب سنتی بردارد. امروزه پتانسیل فارماکولوژیک و محبوبیت و مقبولیت عام گیاهان دارویی و بسیاری ویژگی برجسته دیگر موجب نفوذ طب سنتی در علم نوین پزشکی شده است (۲, ۲۰). از طرفی اکسید شدن مولکول‌های بیولوژیک در بسیاری از بیماری‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد شده و مشکلاتی را در نواحی مختلف بدن ایجاد می‌کند. آنتی اکسیدانت‌های صناعی (Synthetic) مانند گروه فنول‌های سنتتیک که به‌طور گسترده استفاده می‌شود از نقطه نظر ایمنی این ترکیبات اختلاف نظر وجود دارد. لذا در سال‌های اخیر استفاده از آنتی اکسیدانت‌های گیاهی یا پلی فنول‌ها (polyphenol) در صدر تحقیقات دانشمندان قرار گرفته است. لازم به‌ذکر است که با تجویز آنتی اکسیدانت‌های گیاهی، سیستم آنتی اکسیدانت ذاتی بدن تحت تاثیر آنتی اکسیدانت‌های طبیعی قرار گرفته و موجب هم افزایی یکدیگر در محیط داخلی بدن می‌شوند. در همین راستا مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر آنتی اکسیدانتی عصاره اتانولی گیاه زنجبیل انجام شد و نشان داد این گیاه از طریق تقویت احیای ذاتی رادیکال‌های آزاد، باعث حفاظت بدن در برابر استرس اکسیداتیو حاصل از سمیت کبدی القا شده در موش می‌شود (۱۶, ۲۰-۲۳)

در طب سنتی برگ گیاه گزنه به‌عنوان بخش دارویی گیاه محسوب می‌شود که از طرق مختلف فعالیت آنتی اکسیدانتی خود را اعمال می‌کند. یکی از مکانیسم‌های مولکولی ضد التهابی عصاره برگ گیاه گزنه در درون سلول، مهار رونویسی فاکتور NF-KB است. این فاکتور در بیماری‌های التهابی مزمن افزایش می‌یابد و از طریق بیان بسیاری از ژن‌های دخیل در پاسخ‌های التهابی باعث تشدید التهاب می‌شود (۲۴, ۲۵).

در بیماری نورودژنراتیو نکروز و دژنره شدن عصبی رخ می‌دهد و سیستم عصبی مرکزی قادر به تولید نورون جدید نمی‌باشد. بنابراین سلول‌های بنیادی عصبی با قابلیت‌های خود می‌توانند نقش حائز اهمیتی در درمان این بیماری‌ها ایفا کنند (۲۶-۲۸). NSCs در نواحی ساب گرانولار (sub

www.SID.ir

Archive of SID

(granular zoneو ساب ونتریکولار (sub ventricular zone) CNS، هیپوکامپ (hippocampus) و استریاتوم (striatum) و مجرای مرکزی نخاع تجمع دارند. در این پژوهش سلول‌های مذکور از ناحیه هیپوکامپ استخراج شدند و مورفولوژی و ماهیت عصبی آن‌ها به اثبات رسید (۲۹-۳۳).

در مطالعه حاضر به‌منظور القای سایتوتوکسیسیتی در سلول‌ها و ایجاد شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلولی از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) استفاده شد. زیرا که در سیستم عصبی مرکزی (CNS) هم شرایطی مشابه موجب آسیب و بروز اختلالات نورولوژیکال می‌شود. مطالعه‌ای جامع توسط Goen Ha Kim و همکارانش بر روی نقش استرس اکسیداتیو بر روی بیماری‌های نورودژنراتیو صورت گرفت که موید تاثیر سوء انواع رادیکال‌های آزاد تولید شده در سیستم عصبی بر روی عملکرد نورونی است (۵ و ۳۲).

در همین زمینه نتایج حاصل از تست MTT نیز نشان داد که عصاره متانولی برگ گیاه گزنه بر روی NSCs دارای اثرات مثبتی می‌باشد. به‌طوری‌که دوز موثره عصاره مذکور ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت این سلول‌ها بود زیرا که بیشترین میزان تکثیر سلول‌ها در این دوز مشاهده شد. اما همان‌طور که قابل مشاهده است دوز ۴۰µg/ml میزان تکثیر سلول‌ها کاهش یافته است. در همین راستا مطالعه‌ای بر روی عصاره آبی گیاه Musk (She Xiang) نشان داد که عصاره این گیاه باعث تکثیر و تمایز NSCs در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و در غلظت بالای ۳ درصد منجر به سمیت محیط کشت سلول‌ها شد (۲۹).

ترکیبات بیولوژیک گیاه گزنه شامل پلی ساکارید (polysaccharide)، لکتین (lectin)، استروئید (steroid)، تریپنوئید (Terpenoid)، Phenylpropanoid و Coumarin می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها فلاونوئیدها هستند که با تعدیل برخی آنزیم‌های مشخص و فعالیت آنتی اکسیدانتی قوی، مولکول‌های فعالی مثل نیتریت پراکسید و رادیکال هیدروکسید را غیرفعال می‌کند. علاوه بر این تحقیقات بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان می‌دهد ریشه این گیاه با افزایش اکسید نیتریک باعث اتساع عروق و خون رسانی بهتر و بهبود وضعیت پاتولوژیک سلول‌های عصبی می‌شود (۳۰, ۳۲). اگرچه برخی تحقیقات نقش آنتی اکسیدانتی عصاره گزنه را اثبات کرده‌اند ولی نقش محافظتی این گیاه بر بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط اسیب اکسیداتیو تا کنون بررسی نشده که خود یک جنبه نوآوری تحقیق حاضر بوده و به‌کارگیری گیاه گزنه می‌تواند چشم انداز جدیدی در ترمیم اعصاب و حتی درمان ضایعات نورودژنراتیو باشد.

نتیجه‌گیری

گیاه گزنه علاوه بر توانایی تعدیل شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی، قادر است روند تکثیر و زنده مانیNSCs را بهبود ببخشد و می‌تواند در آینده‌ی نزدیک به‌عنوان داروی گیاهی موثر در پیشگیری و درمان اختلالات عصبی ایفای نقش کند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل پروژه مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به کد ۱۶۰۳ است که نویسندگان بدین‌وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه دانشکده داروسازی و گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Shahram S, Maryam K. Effect of hydroalcoholic extract of Salvia officinalis L. on the activity of catalase and superoxide dismutase in an oxidative stress model created by intracerebroventricular STZ injection in male rats. Physiology and Pharmacology. 2013; 17: 176-84.

2. Auddy B, Ferreira M, Blasina F, Lafon L, et al. Screening of antioxidant activity of

www.SID.ir

Archive of SID

three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 84(2-3): 131-8.
3. Hassan W, Noreen H, Rehman S, Gul S, et al. Oxidative stress and antioxidant potential of one hundred medicinal plants. Current topics in medicinal chemistry. 2017; 17(12): 1336-70.
4. Patel SS, Ray R, Sharma A, Mehta V, et al. Antidepressant and anxiolytic like effects of Urtica dioica leaves in streptozotocin induced diabetic mice. Metabolic brain disease. 2018: 33(4): 1-12.
5. Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. A simple co-culture system for generation of embryonic stemlike cells from testis. Iran Red Crescent Med J. 2012; 14(12): 811-815.
6. Soltanian A, Ghorbanian MT, Lashkarbolouki T. Comparison of the proliferation potential and neurotrophic factors expression in the adherent neural stem cells culture of the Subgranular, Subventricular zone and the central canal of the spinal cord of the adult rats. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2013; 15(3).
7. Bisht R, Joshi BC, Kalia AN, Prakash A. Antioxidant-Rich Fraction of Urtica dioica Mediated Rescue of Striatal Mito-Oxidative Damage in MPTP-Induced Behavioral, Cellular, and Neurochemical Alterations in Rats. Molecular neurobiology. 2017; 54(7): 5632-45.
8. Hadizadeh I, Peivastegan B, Kolahi M. Antifungal activity of nettle (Urtica dioica L.), colocynth (Citrullus colocynthis L. Schrad), oleander (Nerium oleander L.) and konar (Ziziphus spina-christi L.) extracts on plants pathogenic fungi. Pakistan journal of biological sciences: PJBS. 2009; 12(1): 58-63.
9. Ahangarpour A, Mohammadian M, Dianat M. Antidiabetic effect of hydroalcholic Urtica dioica leaf extract in male rats with fructose-induced insulin resistance. Iranian journal of medical sciences. 2012; 37(3): 181.
10. Shokrzadeh M, Saravi SS. The chemistry, pharmacology and clinical properties of Sambucus ebulus: A review. Journal of medicinal plants research. 2010; 4(2): 095-103.
11. Daci-Ajvazi M, Zeneli L, Daci N, Krasniqi A, et al. CHEMICAL EFFECTS AND ANTIOXIDANT RESPONSES OF URTICA DIOICA L. EXTRACTS GROWING ALONG HIGHWAY. 2018.
12. Bojnordi MN, Azizi H, Skutella T, Movahedin M, et al. Differentiation of spermatogonia stem cells into functional mature neurons characterized with differential gene expression. Molecular neurobiology. 2017; 54(7): 5676-82.
13. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Runge U, et al. Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. BMC neuroscience. 2010; 11(1): 48.
14. Ghasemi N, Razavi S. Transdifferentiation potential of adipose-derived stem cells into neural lineage and their application. Journal of Histology & Histopathology. 2014; 1(1):12.
15. Hamedi A, Zarshenas MM, Sohrabpour M, Zargaran A. Herbal medicinal oils in traditional Persian medicine. Pharmaceutical biology. 2013; 51(9): 1208-18.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Oboh G, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Antioxidant and inhibitory effect of red ginger (Zingiber officinale var. Rubra) and white ginger (Zingiber officinale Roscoe) on Fe2+ induced lipid peroxidation in rat brain in vitro. Experimental and Toxicologic Pathology. 2012; 64(1-2): 31-6.

17. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S. Antioxidant activities of methanol extract of Sambucus ebulus L. flower. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2009; 12(5): 447.

18. Abdanipour A, Khatami SM, Tiraihi T, Satari MJ. Effect of hydro-ethanolic extract of Chamaemelum nobile on cell proliferation and apoptosis of rat hipocample neural stem cells in the oxitative stress condition. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2015; 16(4): 14-9.

19. Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, et al. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. Laboratory investigation. 2003; 83(7): 949.

20. El-Sharaky A, Newairy A, Kamel M, Eweda S. Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47(7): 1584-90.

21. M. Nazm Bojnordi M, Movahedin T. Tiraihi, M. Javan, Alteration in genes expression patterns during in vitro differentiation of mouse spermatogonial cells into neuroepithelial-like cells, Cytotechnology. 2013; 65(1): 97–104.

22. Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, et al. Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale). Food chemistry. 2007; 102(3): 764-70.

23. Golalipour M, Mohammad Gharravi A, Ghafari S, Azarhoush R. Protective Effect of URTICA DIOICA on renal morphometric and histologic alterations in streptozotocin diabetic Rats. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2009; 10(6): 14-22.

24. Nobakht A, Rahimzadeh M, Safamehr A. Effects of different levels of mixed medicinal plants of Urtica dioica L., Mentha pulegium L. and Ziziphora tenuior L. on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2013; 29(1).

25. Babashpour-Asl M, Baleghi M, Sajadi P, Golalipour MJ. Different Aspects and Results of Modern Studies of Urtica Dioica: A Review. Babol University of medical Sciences. 2014; 16(1): 47-54.

26. Nazm Bojnordi M, Ghasemi HH, Akbari E. Remyelination after lysophosphatidyl choline-induced demyelination is stimulated by bone marrow stromal cell-derived oligoprogenitor cell transplantation. Cells Tissues Organs. 2015; 200(5): 300–306.

27. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Niapour A, Bakhtiari M, et al. Improvement of neuroglial differentiation from human dental pulp stem cells using CSF. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2016; 26(140): 1-14.

28. Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. Alteration in genes expression patterns during in vitro differentiation of mouse spermatogonial cells into neuroepithelial-like cells, Cytotechnology. 2013; 65(1): 97–104.

29. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Darabi S, Karimi N, et al. Condition

www.SID.ir

Archive of SID

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): 107-114.

30. Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. Ghasemi Hamidabadi H.Oligoprogenitor cells derived from spermatogonia stem cells improve remyelination in demyelination model.Mol Biotechnol. 2014; 56(5): 387-93.

31. JM C, E T-C. Culturing and cryobanking human neural stem cells. Stem Cell Banking: Concepts and Protocols. 2017: 199-206.

33. Cebrián-Silla A, Alfaro-Cervelló C, Herranz-Pérez V, Kaneko N, et al. Unique organization of the nuclear envelope in the post-natal quiescent neural stem cells. Stem Cell Reports. 2017; 9(1): 203-16.

32. Si Y-c, Li Q, Xie C-e, Niu X, et al. Chinese herbs and their active ingredients for activating xue (blood) promote the proliferation and differentiation of neural stem cells and mesenchymal stem cells. Chinese medicine. 2014; 9(1): 13.

33. Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T. Genetic changes during differentiation of spermatogonial stem cells into oligoprogenitor cells. Babol Univ Med Sci. 2017; 19(10): 35-41.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2019; 9(4)

Evaluation proliferative effect of nettle leaf extract on the neural stem cell in oxidative stress condition

Haratizadeh S, M.Sc.[1], Nazm Bojnordi M, Ph.D.[2], Ebrahim Zadeh MA, Ph.D.[3], Ahmadi Moghaddam K, MD.[4], Goodarzi G, M.Sc.[1], Ghasemi Hamid abadi H, Ph.D.[5]*

1. MSc in Anatoimical Sciences, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Immunogenetic Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
4. Student Research Committee, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
5. Immunogenetic Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

* Email corresponding author:hatefdr@gmail.com

Received: 28 Oct. 2018 Accepted: 13 Jan. 2019

Abstract

Aim: An endogenous repairman of the central nervous system is possible via neural stem cells. Some researchers have suggested the neural protective of some medicinal herbs such as; *Urtica dioica*. The purpose of this study is creating an oxidative condition in the neural stem cell cultures and then treated the cells with methanolic extract of nettle leaves *in vitro*.

Material and Methods: In this experimental study, the hippocampal neural stem cells extraction was performed by enzymatic digestion in newborn rats. The verification of these cells as nerve cells was carried out by the morphological and immunocytochemistry examinations. Before treatment, the cells were exposed for 24 hours to oxidative stress condition and then nettle leaf extract was added to the cell plates at of 2.5, 5, 10, 20 and 40 µg/ml and cells were maintained for 24 hours, separately. The final evaluation of the cell proliferation was performed by MTT viability test. The groups included; an experimental group that was treated with extract and the control group.

Results: Neural stem cells had neural morphology and expressed nestin marker. Proliferation percentage of the neural stem cells was higher in the treatment groups than the control group. In addition, MTT assay results showed that the percentage of live cells in the treated groups increased, as the proliferation of the neural stem cells significantly increased (P<0/05) at 20µg/ml.

Conclusion: Methanolic extract of nettle leaf have neuroprotective effects and could adjust oxidative stress condition *in vitro*. It was able to improve the dysfunction of the central nervous system, following the production of free radicals.

Keywords: methanol extract of nettle leaf**,** hippocampus neural stem cell, MTT assay

www.SID.ir