Effect of Sambucus ebulus extract on neural stem cell prolifration under oxidative stress condition

Haratizadeh S., MSc[1], Ebrahim Zadeh MA., PhD[2], Nazm Bojnordi M., PhD[3], Ghasemi Hamidabadi H., PhD[4], Abdanipour A., PhD[5], Akhtari J., PhD[6]

1. MSc Student in Anatoimical Sciences, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Associated Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3.Assistant Professor, Department of Anatomy & Cell Biology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
4. Associated Professor, Department of Anatomy & Cell Biology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran,Tel: 011-33542429, E-mail : hatefdr@gmail.com
5. Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
6. Immunogenetics Research Center, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Recently, several studies have indicated that the central nervous system has the capacity for endogenous repair. But, the proliferation capacity of endogenous neural stem cells (NSCs) isn't sufficient for the treatment of neurodegenerative diseases. So, it sounds that stimulation of endogenous NSC proliferation is essential for neuroregeneration. The aim of this study was to examine the effects of Sambucus ebulus extract on the proliferation of neonatal rat hippocampus-derived neural stem cells (NSCs) under oxidative stress condition induced by H2O2.

Material and Methods: The NSCs were isolated from neonatal rat hippocampus. To confirm neural characteristics of neural stem cells, the expression of neural-specific marker, Nestin was investigated by immunocytochemistry technique. 5×10^4 cells were cultured in every well of a 96 well plate and H2O2 was added to induce oxidative stress condition. Then NSCs were exposed to 50 µg Sambucus ebulus extract for 24 hours, at various concentrations (25, 50, 100, 200, 400 and 500 µg/ml). The cell proliferation rate was assessed by MTT colorimetry assay before and after treatment with the extract.

Results: Immunofluorescent studies showed that neural stem cells expressed specific neural marker; Nestin. The proliferation rate of NSCs increased in the treated groups in comparison to that in the control group. The highest rate of survival was observed when Sambucus ebulus was used at the concentration of 500 µg/ml. ($P<0.05$).

Conclusion: The results showed that the methanolic extract of Sambucus ebulus can promote proliferation and survival of NCSs *in vitro* and also after exposure to oxidative stress condition, suggesting its potential beneficial effect on neuroregeneration.

Key Words: Neural stem cells, Sambucus ebulus, Proliferation, Survival**.**

Received: Jan 13, 2018 **Accepted:** Apr 11, 2018

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

Archive of SID

www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست وسوم / مرداد و شهریور ۱۳۹۷/۳۵-۲۶

تاثیر عصاره متانولی گیاه آقطی (Sambucus ebulus) برروند تکثیر سلول های بنیادی عصبی در شرایط آسیب اکسیداتیو پراکسید هیدروژن

سارا هراتی زاده[۱]، محمدعلی ابراهیم زاده[۲]، مریم نظم بجنوردی[۳]، هاتف قاسمی حمیدآبادی[۴] ،علیرضا عبدانی پور[۵] ، جواد اختری[۶]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، متخصص شیمی داروئی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۴. دانشیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران، (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۳۳۵۴۲۴۲۹-۰۱۱ ، hatefdr@gmail.com

۵. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۶. استادیار، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک،گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات متعددی نشان می دهند که سیستم اعصاب مرکزی دارای قابلیت ترمیم انـدوژنوس مـی باشـد. امـا میـزان تکثیر سلول های بنیادی عصبی اندوژنوس جهت درمان بیماریهای نورودژنراتیو کافی نمی باشد. لذا به نظر مـی رسـد کـه تحریـک تکثیر سلول های بنیادی عصبی اندوژنوس جهت ترمیم نورونی الزامی است. هدف از این مطالعه بررسی تـاثیرتکثیری عصـاره گیـاه آقطی بر سلول های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ موش صحرایی تازه بدنیا آمده در شرایط آسیب اکسیداتیو پراکسید هیدروژن است.

روش بررسی: سلول های بنیادی عصبی از هیپوکمپ مغز نوزاد موش صحرایی تازه متولد شده استخراج و کشت شـدند. ماهیـت عصبی این سلولها با استفاده از بیان نشانگر خاص عصبی Nestin و از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی مـورد ارزیابی قـرار گرفـت. جهت ایجاد شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلولی، 5×10^4 سلول را به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه منتقـل و سـپس، هیدروژن پراکسید اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت تست زنده مانی انجام و توسط دستگاه مقدار جذب هر گروه ارزیـابی شـد. سـپس سلول های بنیادی عصبی به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار غلظت هـای مختلـف (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰) میکروگـرم بـر میلـی لیتـر عصاره آقطی به میزان ۵۰ میکرون قرار گرفتند. درصد تکثیر سلولی با استفاده از MTT بررسی شد.

یافته ها: بررسی های ایمونو فلورسنت نشاندهنده بیان مارکر اختصاصی نستین در سلولهای بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ موش صحرایی بود. نتایج تحقیق حاضر موید کاهش میزان زنده مانی سلول ها در غلظت های مختلف H_2O_2 بـود. درصـد تکثیـر سـلول های بنیادی عصبی طی شرایط آسیب اکسیداتیو پراکسید هیدروژن در گروههای تیماربا عصاره گیاه آقطی نسبت به گـروه کنتـرل بیشتر بود. بیشترین میزان تکثیر سلول ها در غلظت 500 µg/ml مشاهده شد.

نتیجه گیری: این یافته ها نشان می دهند که عصاره متانولی آقطی می تواند میزان تکثیر و بقای سـلول هـای بنیـادی عصـبی را در شرایط آزمایشگاهی و طی شرایط آسیب اکسیداتیو بهبود ببخشد و به نظر می رسد که قابلیت بالقوه ای در روند ترمیم عصب داشته باشد.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی عصبی، سامبوکوس ابولوس، تکثیر، زنده مانی

وصول مقاله:۹۶/۱۰/۲۳ اصلاحیه نهایی:۹۶/۱۲/۱۹ پذیرش:۹۷/۱/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

مقدمه

امروزه با گسترش بیماری های نورودژنراتیو و ابتلای جمعیت کثیری از مردم جهان به این دسته بیماری ها نظیر پارکینگسون، آلزایمر و جنون گاوی، علم پزشکی و تحقیقات آزمایشگاهی به سمت یافتن راه درمان و بهبود وضعیت افراد مبتلا سوق پیدا کرده است. عامل اصلی ایجاد کننده بیماری های نورودژنراتیو التهاب است که به دنبال آسیب و مرگ نورونی(neural mortality) اتفاق می افتد که با عدم جایگزینی نورونی (neural replacement) همراه است. تا به حال مکانیسم های بیوشیمیایی و پاتولوژیک متعدد و همچنین راه های درمانی مختلف در علم پزشکی مدرن مطرح شده است. با توجه به اینکه استفاده از داروها تنها از علائم ظاهری بیماری می کاهد و بر سایر عواقب بیماری مثل مرگ نورون ها و جایگزینی آنها بی تاثیرند، درمان های جایگزین مثل پیوند سلول های بنیادی می تواند امیدهای تازه ای را در این زمینه پیش روی محققین قرار دهد و در حوزه درمان بیماری های نورودژنراتیو باعث ارتقای بهبود روند ترمیم در بیماران شود (۴-۱).

سلول های بنیادی عصبی یکی ازانواع سلول های بنیادی هستند که در نواحی از مغز نظیر هیپوکامپ تجمع بیشتری دارند و دارای قدرت تکثیر بالا و قابلیت خودترمیمی هستند. این سلولها می توانند در طی بیماری نورودژنراتیو به محل ضایعه مهاجرت و در روند ترمیم اندوژنوس شرکت کنند. این سلول ها یک گام به سلول نورون و گلیال نزدیکترهستند، توانایی تمایز به اکثر سلول های تخصص یافته مغزی را دارند و بعد از مهاجرت به سمت فنوتیپ سلول های محل متمایز می شوند. سلول های بنیادی عصبی برای تکثیر و تمایز خود همواره به انواعی از محرک ها نیاز دارند تا بتوانند نقش خود را ایفا کنند. این محرک ها شامل فعال کننده های نوروژنزیس، فاکتورهای رشد عصبی ترشح شده از سلول های آسیب دیده، هورمون ها، نوروترنسمیترها و عوامل التهابی ماتریکس خارج سلولی هستند که در این میان فرآورده ها و مشتقات گیاهی هم به علت داشتن موادی مانند آنتی اکسیدان ها می توانند نقش موثری را بازی کنند. علیرغم دستاوردهای مختلف علم مدرن پزشکی، فرآورده های طبیعی متعدد از گیاهان در طب سنتی به علت ارزش اقتصادی و مقبولیت عامه آنها از دیرباز در جوامع و اقوام مختلف مورد توجه بوده و بازنگری به این مقوله ضروری به نظر می رسد (۶-۴و۲).

گیاه آقطی با نام علمی Sambucus ebulus و نام بومی پلم از خانواده Adoxaceae است که در جنگل ها و سواحل شمالی ایران به وفور یافت می شود. در طب سنتی از برگ، ریزوم و میوه این گیاه بصورت موضعی یا خوراکی برای درمان بیماری های مختلف مانند التهاب، تب روماتیسم، عفونت، ادم، گلودرد، آرتریت، نیش زنبور و مار به طور متداول استفاده می شود. مطالعات فارماکولوژیکال بسیاری هم بر روی این گیاه انجام شده است که بیانگر اثرات ضد التهابی، ضد روماتیسم، ضد درد، ضد هموروئید، ضد باکتری وضد ویروس آن است. همچنین اثرات آن در درمان زخم سوختگی، زخم های عفونی، ادم، اگزما، کهیر و سرماخوردگی گزارش شده است (۱۰-۷).

در بیماری های نورودژنراتیو رادیکال های آزاد منجر به آسیب ماکرومولکول هایی مثل DNA، پروتئین ها و لیپیدهای غشای سلولی می شود.به عنوان مثال گونه های اکسیژن واکنش پذیر(ROS) و گونه های نیتروژن واکنش پذیر(RNS) به طور مستقیم و محصولات پراکسیداسیون لیپیدها به طور غیرمستقیم می توانند باعث تغییر در پروتئین ها شوند. همچنین به علت مقادیر زیادی فسفولیپید و اسیدچرب اشباع نشده و میزان بالای متابولیسم در بافت عصبی، حساسیت بیشتری در مقابل استرس اکسیداتیو از خود نشان می دهد. در واقع استرس اکسیداتیو که حاصل عدم تعادل بین رادیکال های آزاد و مکانیسم های آنتی اکسیدان بدن است منجر به اختلال فعالیت مغزی، تخریب نورون ها و نهایتا بروز بیماری های نورودژنراتیوی مثل آلزایمر می شود. در اختلال خود ایمن مولتیپل اسکلروزیس

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

نیز رادیکال های نیترواکساید با اثر بر روی میلین، اکسون و سلول های الیگودندروسیت و نورون باعث بروز اختلالات عصبی می شود (۱۴-۱۱).

مواد آنتی اکسیدان باعث احیا کردن رادیکال های آزاد شرایط استرس اکسیداتیو در بیماری های نورودژنراتیو می شوند. رنگیزه آنتوسیانین در میوه گیاه پلم دارای قدرت آنتی اکسیدانی بوده و باعث حفاظت در مقابل استرس های اکسیداتیو می شود (۱۵-۸). با توجه به ماهیت طبیعی گیاهان و داشتن خواص بسیار مفید و موثر از قبیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آنها، می توانند در این زمینه بسیار حائز اهمیت باشند. تا به حال گزارشی مبنی بر تاثیر گیاه آقطی بر سلول های بنیادی عصبی طی شرایط آسیب اکسیداتیو منتشر نشده است. لذا هدف تحقیق حاضر ایجاد مدل مشابهی از شرایط اکسیداتیو و بررسی اثرات تکثیری گیاه آقطی بر سلول های بنیادی عصبی در شرایط اکسیداتیو است.

روش بررسی

تهیه عصاره متانولی میوه گیاه سامبوکوس ایبولوس:

میوه های این گیاه 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 میوه گیاه به مدت ۲۴ ساعت در متانول خیسانده شده و سپس محلول های جمع آوری شده با دستگاه تبخیر در خلاء مورد تبخیر قرار گرفته و به روش فریزر درای خشک می گردد (۸).

استخراج و کشت سلول های بنیادی عصبی:

جداسازی سلول های بنیادی عصبی از ۵ سر نوزاد موش صحرایی نژاد (Sprague Dawley) صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا بخش هیپوکامپ از دو نیمکره در شرایط استریل جدا شد. سپس با استفاده از هضم آنزیمی و مکانیکی به ترتیب با آنزیم(Gibco, Canada) Trypsin-EDTA و له کردن بافت توسط سرسوزن سرنگ انسولین سوپ سلولی حاصل گردید. 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) Pen/Strep (Penicillin 100 unit/ml & Streptomycin 100 unit/ml, است منتقل و محیط کشت سلول های مورد نظر پس از ۲۴ ساعت تعویض شد و در ادامه روند کشت سلول، قبل از اینکه سلول ها کف فلاسک را بطور کامل بپوشانند تریپسینه شده و به فلاسک دیگری منتقل گردید. در پژوهش مذکور سعی بر این بود که از پاساژ سوم سلولی استفاده شود (۲).

بررسی مورفولوژی:

مورفولوژی سلول ها در گروه های مختلف، توسط میکروسکوپ معکوس (Nikon,Eclipse-TS100) بصورت روزانه مشاهده و بررسی گردید.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی:

جهت تایید هویت سلول های بنیادی عصبی از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا سلول های بنیادی عصبی در محلول بافر سولفات (phosphate buffer solution, PBS) سه مرتبه شستشو و سپس به منظور ثبوت (Fixation) سلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در پارافرمالدئید ۴٪ قرار داده شدند. جهت جلوگیری از واکنش های غیر اختصاصی سلول ها بوسیله محلول مهار کننده سرم به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سلول ها با آنتی بادی اولیه Rabbit polyclonal to Nestin (Abcam, Milton, Cambridge, UK.) انکوبه و در ادامه آنتی بادی ثانویه مناسب (Donkey anti-rabbit phycoerythrin IgG, Abcam Milton, Cambridge, UK.) اضافه شد. سرانجام با میکروسکوپ فلورسنت (Leica, Wetzlar, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۵).

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

جهت بررسی اثر عصاره متانولی میوه گیاه سامبوکوس ایبولوس بر روی سلول های بنیادی عصبی در شرایط اکسیداتیو آزمایشات در دو مرحله مجزا صورت گرفت.

مرحله اول: ایجاد شرایط اکسیداتیو توسط هیدروژن پراکسید:

به منظور بدست آوردن مولاریته مناسب برای ایجاد شرایط اکسیداتیو در محیط کشت سلولی، 5×10^4 سلول را به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه منتقل و پس ازاطمینان از چسبیدن سلول ها به کف پلیت، غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار از هیدروژن پراکسید را به همه گروه ها به جز 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 درصد سمیت پراکسید هیدروژن با استفاده از فرمول زیر بررسی شد.

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

مرحله دوم: تیمار سلول های بنیادی عصبی توسط عصاره گیاهی سامبوکوس ایبولوس:

5×10^4 سلول به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. پس از چسبیدن سلول ها به کف پلیت، به تمامی گروه ها مقدار ۵۰ میکرون پراکسید هیدروژن با غلظت ۵۰ میکرومولار برای ایجاد شرایط اکسیداتیو اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت نوبت به افزودن عصاره متانولی میوه گیاه سامبوکوس ایبولوس بصورت جداگانه با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به میزان ۵۰ میکرون به همه گروه ها به جز گروه کنترل رسید. این مرحله نیز ۲۴ ساعت به طول انجامید.سپس کمیت سلول ها توسط روش رنگ سنجی MTT ارزیابی شد.

در هر مرحله قبل و بعد از تیمار برای مقایسه مورفولوژی سلول‌ها از پلیت های حاوی سلول با دوربین دیجیتال و میکروسکوپ معکوس عکس گرفته شد(۱).

سنجش کمیت سلول‌ها به روش رنگ سنجی MTT (تست زنده مانی):

به منظورارزیابی مقدار تکثیر سلول ها ۵ میلی گرم 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 زردرنگ حاصل به ازای ۲۰۰ میکرون محیط کشت در هر یک از چاهک ها ریخته شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، در اثر فعل و انفعالات آنزیم سوکسینات دهیدروژنازدرمیتوکندری سلول با نمک MTT بلورهای ارغوانی رنگ و نامحلول فورمازون در کف پلیت تشکیل شد. جهت حل کردن بلورهای نامحلول مذکور، محیط روی سلول خالی و به هر یک از ول ها حدود ۲۰۰ میکرون DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma) اضافه شد. سرانجام جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza plate reader محاسبه گردید. لازم به ذکر است که تست MTT با سه بار تکرار انجام شد (۱۶و۱).

روش تجزیه و تحلیل آماری:

روش محاسبه، تجزیه و تحلیل داده ها بر مبنای مقایسه میانگین داده ها بین گروهها از آزمون ANOVA و کی اسکوار و تست تعقیبی Tuky استفاده شد. محاسبات آماری توسط نرم افزا SPSS 16 صورت گرفت.

یافته ها

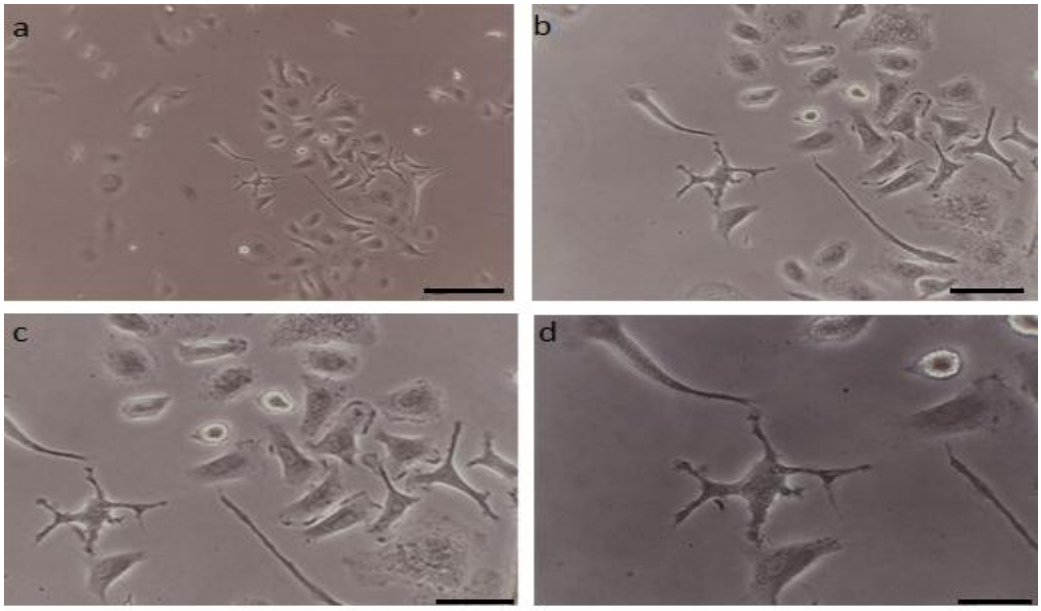
کشت سلول های بنیادی عصبی و بررسی مورفولوژی : سلول های بنیادی عصبی در روز اول پس از استخراج بصورت کلنی با زوائد طویل و ظاهری یکدست به کف پلیت سلولی چسبیده بودند. در روزهای بعدی کشت، سلول ها از هم فاصله گرفته و ظاهر سلول عصبی با قدرت تقسیم را به خود گرفتند. ۷ روز بعد از استخراج، سلول ها کف فلاسک را به طور کامل پر کردند. پس از پاساژ اول سلول

Archive of SID

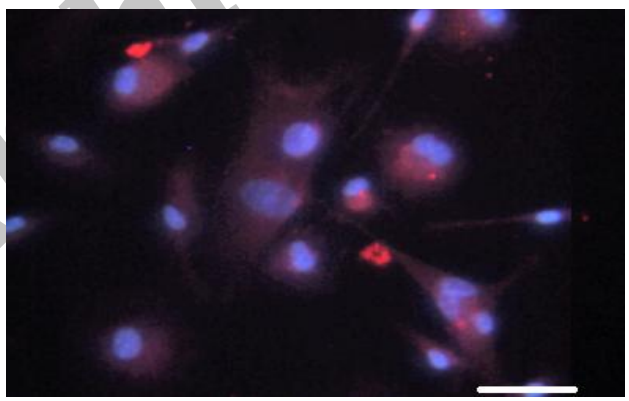
www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

ها دارای ظاهری یکدست، کشیده و دوقطبی و چندقطبی به همراه تشکیل شبکه های گسترده و منظم سلولی بودند (شکل ۱). همچنین جهت اثبات عصبی بودن و خلوص این سلول ها بیان مارکر عصبی Nestin مورد ارزیابی و تایید قرار گرفت(شکل ۲).



شکل۱. مورفولوژی سلول های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ نوزاد موش صحرایی پس از اولین پاساژ. a: مقیاس ۴ میکرومتر، b:۱۰ میکرومتر،c:۴۰ میکرومتر، d:۱۰۰ میکرومتر.



شکل ۲. ایمنوسیتوشیمی سلول های بنیادی عصبی (مارکر عصبی به رنگ قرمز و هسته به رنگ آبی دیده می شود). (مقیاس 40 میکرومتر).

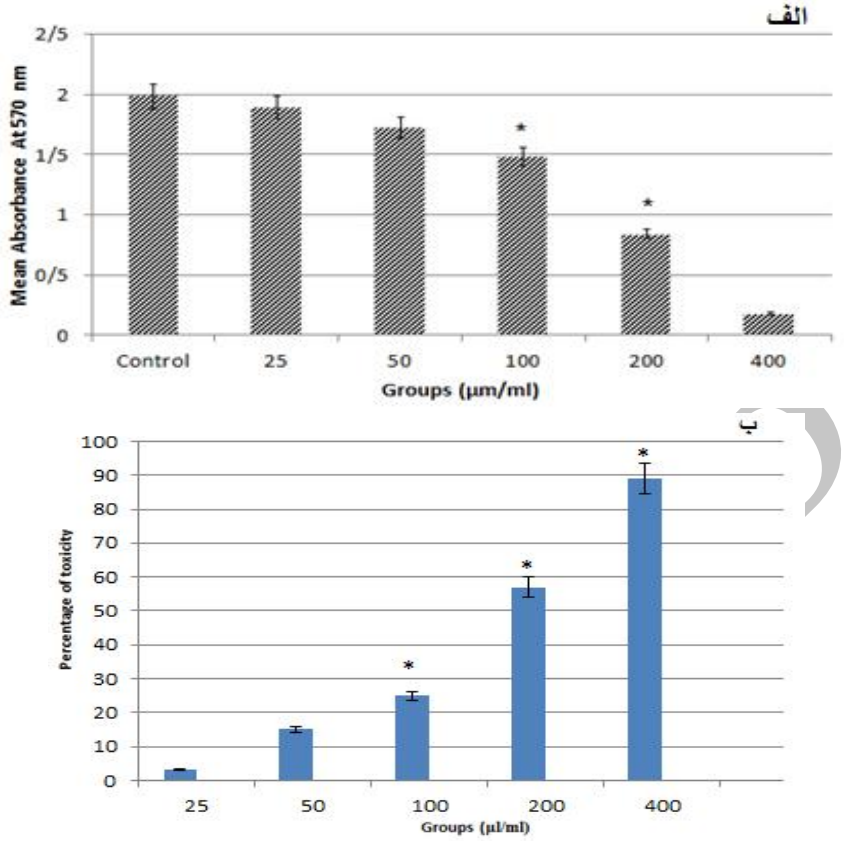
تست زنده مانی (MTT) پراکسید هیدروژن:

نتایج تحقیق حاضر موید کاهش میزان زنده مانی سلول ها در غلظت های مختلف H_2O_2 بود ($P<۰/۰۰۵$)(نمودار ۱ الف). همچنین با استفاده از میانگین جذب گروه های تیمار و مطالعات گذشته (۱) غلظت ۵۰ میکرومولار H_2O_2 جهت اعمال استرس اکسیداتیو مطلوب به نظر رسید. درصد سمیت پراکسید هیدروژن نیز درنمودار ۱ ب نشان داده شده است

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

که گویای اثرات مخرب این ماده بر روی سلول های بنیادی عصبی در محیط کشت است.



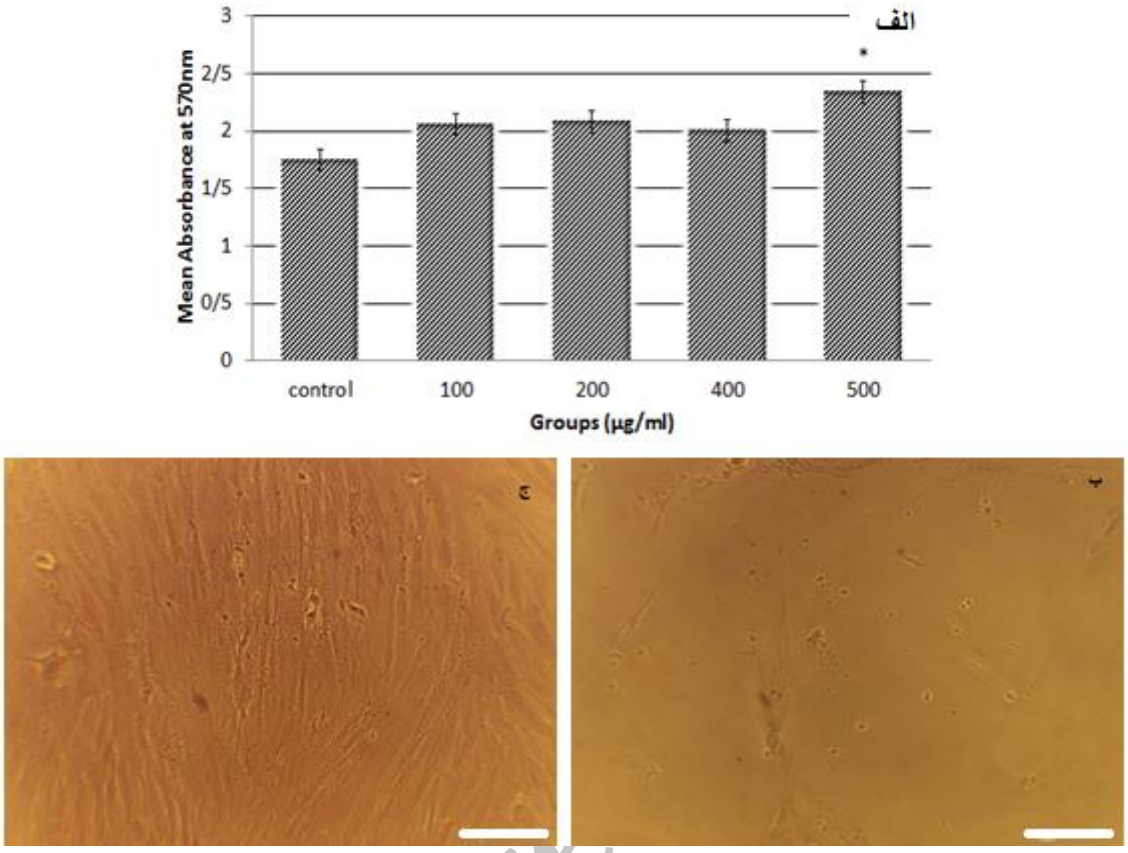
نمودار ۱. الف) تست زنده مانی سلول های بنیادی عصبی در حضور غلظت های مختلف پراکسید هیدروژن جهت بدست آوردن غلظت مناسب برای اعمال استرس اکسیداتیو ب) بیان درصد سمیت H_2O_2 با استفاده فرمول {۱۰۰ ×(میانگین جذب گروه کنترل / میانگین جذب هر گروه). ($P<0/005$) *:اختلاف معنا دار با گروه کنترل.

تست زنده مانی (MTT) عصاره گیاهی:

همانطور که در نمودار۳ قابل رویت است در تمامی گروه ها میزان جذب نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p<0/005$)و همچنین بیشترین میزان تکثیر سلول ها در حضور عصاره گیاهی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اتفاق افتاد. لازم به ذکر است که کمترین میزان زنده مانی سلول های بنیادی عصبی در گروه فاقد عصاره گیاهی یعنی گروه کنترل مشاهده شد.

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018



شکل ۲. ارزیابی سلول های بنیادی عصبی تحت تیمار با غلظت های مختلف عصاره متانولی میوه گیاه آقطی. الف) نمودار تست زنده مانی سلول های بنیادی عصبی در حضور غلظت های مختلف عصاره متانولی میوه گیاه آقطی (وجود اختلاف معنادار بین گروه های تیمار نسبت به گروه کنترل *:اختلاف معنا دار با گروه کنترل($P<۰/۰۰۱$). ب) سلول های بنیادی عصبی در گروه کنترل ج) سلول های بنیادی عصبی در گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (مقیاس ۱۰ میکرومتر).

Archive

بحث

در بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری های نورودژنراتیو، اکسید شدن مولکول های بیولوژیک باعث تولید رادیکال های آزاد گردیده و به دنبال آن به علت کاهش مقدار آنتی اکسیدان های طبیعی و یا افزایش انواع اکسیژن بازفعال استرس اکسیداتیو ایجاد می شود. در نتیجه این شرایط، دژنره شدن سلول ها مخصوصا در مغز به وقوع پیوسته که منجر به ایجاد عوارض بسیاری در مبتلایان می شود.

در سال های اخیر گیاهان به علت دارا بودن پتانسیل فارماکولوژیک، سمیت پایین، حداقل عوارض جانبی، مقبولیت عام و مقرون به صرفه بودن بسیار مورد توجه محققان واقع شده است. همچنین با پیشرفت علم پزشکی وصنعت تولیدات طبیعی مشتق از مواد گیاهی مانند آنتی اکسیدان ها جهت درمان بیماری های مختلف در دسترس بیماران قرار گرفته است (۱۸و۱۷). گیاه پلم حاوی فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، موسیلاژ، تانن، آلکالوئید، رزین، رینورنیک اسید، ساپونین، گلیکوزید قلبی و آنتوسیانین است که این مواد در قسمت های مختلف گیاه مقادیر متفاوتی دارند. در حقیقت ترکیبات فلاونوئیدی، استروئیدی و آنتوسیانین موجود در این گیاه ایجادکننده خواص ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی(anti-

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

(inflammation & anti-oxidation) آن است (۱۹و۸و۷) .

به طور کلی وارد شدن آنتی اکسیدان های طبیعی به محیط داخلی بدن باعث افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدان ذاتی بدن می شود. در سال های اخیر استفاده از آنتی اکسیدان های گیاهی یا پلی فنول ها (polyphenol) به علت ماهیت طبیعی شان سهم قابل توجهی از تحقیقات را به خود اختصاص داده اند (۲۱و۲۰).

در مطالعه حاضر از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) صرفا جهت ایجاد مدل استرس اکسیداتیو در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. این ماده با بالا بردن رادیکال های هیدروکسیل در سلول ها می تواند باعث افزایش سیتوتوکسیسیتی (مطابق نمودار۱ ب) شود که آسیب میتوکندری سلول و ماکرومولکول های حساس به تولیدات حاصل از اکسیداسیون سلولی یعنی اسید نوکلئیک و پروتئین را به دنبال دارد. در سیستم عصبی مرکزی (CNS) فاکتور مهم در اختلالات نورولوژیکال یعنی استرس اکسیداتیو بیشتر سلول های الیگودندروسیت، نورون، میلین و آکسون ها را تحت تاثیر قرار می دهد (۲۲و۳).

سلولهای بنیادی عصبی در مجرای مرکزی نخاع نواحی و زیر بطنی قرار دارند که سلول های ناحیه زیربطنی فعالیت تکثیری گسترده ای دارند (۲۴و۲۳). علاوه بر این سلولهای بنیادی عصبی قابل استخراج ازهیپوکامپ و استریاتوم جنین و نوزاد موش صحرایی هستند که ما دراین مطاله ناحیه هیپوکامپ را برای استخراج انتخاب کردیم. ماهیت عصبی سلولهای بنیادی استخراج شده از طریق ویژگیهای مورفولوژی و ایمونوسیتوشیمی تایید شد. سلول های بنیادی متعاقب آسیب عصبی به محل مهاجرت و با نورون زایی در بافتهای تخریب شده منجر به ایجاد مدار نورونی جدید می شوند که سبب ارتقای ساختمان وفانکشن این مناطق می شود (۲۶و۲۵و۱۹و۴).

مطالعه ای در سال ۲۰۰۶ بر روی خواص ضد درد و ضد التهابی گیاه آقطی صورت گرفت. این محققین عصاره میوه، برگ و ریشه گیاه را استخراج کرده و بر روی موش و موش صحرایی آزمایش کردند و اذعان داشتند عصاره هگزانی میوه پلم دارای قوی ترین اثرات ضد درد و ضد التهاب است. همچنین این پژوهش صحت استفاده ازاندام هوایی و ریشه این گیاه را در طب سنتی تایید کرد (۷). عصاره اتانولی گیاه زنجبیل نیز از طریق تقویت احیای ذاتی رادیکال های آزاد ، باعث حفاظت بدن در برابر استرس اکسیداتیو حاصل از سمیت کبدی القا شده در موش می شود(۱۸).

نتایج حاصل از تست MTT نیز نشان داد که تکثیر سلول ها در حضورعصاره متانولی میوه گیاه پلم بهبود می یابد. به طوریکه دوز موثره عصاره مذکور ۵۰۰µg/ml در محیط کشت بود زیراکه بیشترین میزان تشکیل کریستال های فرومازون در چاهک سلولی در این دوز مشاهده شد. مطالعات نشان می دهد فلاونوئیدهای موجود در ترکیبات بیلوژیک باعث تعدیل برخی آنزیم های مشخص می شوند و مولکول های فعالی مثل نیتریت پراکسید و رادیکال هیدروکسید را غیر فعال می کند ترکیبات بیولوژیک این گیاه نظیر آنتوسیانین، پلی ساکارید، استروئید و لکتین سبب خنثی کردن رادیکال های آزاد و کنترل فعالیت آنزیمی و عناصر فعال نیتریت پراکسید می شوند (۲۲و۱۸). مطالعات قبلی تاثیرات ضد التهابی وآنتی اکسیدانی عصاره متانولی آقطی را نشان داده اند ولی تاثیر مثبت این گیاه بر میزان تکثیر و بقای سلول های بنیادی عصبی در شرایط استرس اکسیداتیو در محیط آزمایشگاهی در تحقیق حاضر موید نواوری این پژوهش و موید پتانسیل گیاه آقطی در روند ترمیم عصب است.

نتیجه گیری

این یافته ها نشان می دهد که عصاره متانولی آقطی می تواند میزان تکثیر و بقای سلول های بنیادی عصبی را در شرایط استرس اکسیداتیو در محیط آزمایشگاهی بهبود ببخشد چراکه توانایی تعدیل شرایط اکسیداتیو در محیط کشت

www.SID.ir

سلول های بنیادی عصبی را داراست و به نظر می رسد که دارای قابلیت بالقوه ای در روند ترمیم عصب داشته باشد.

تشکر و قدردانی

تقدیر و تشکراین مقاله از پروژه مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به کد ۱۶۰۳ استخراج شده است و نویسندگان بدینوسیله ازکارشناسان محترم آزمایشگاه دانشکده داروسازی و گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تقدیر وتشکر می نمایند.

Reference

1. Alizadeh R, Hassanzadeh G, Joghataei MT, Soleimani M, Moradi F, Mohammadpour S, et al. In vitro differentiation of neural stem cells derived from human olfactory bulb into dopaminergic-like neurons. Eur J Neurosci 2017; 45: 773-84.
2. Abdanipour A, Khatami S, Sagha M, Salimi N, Naghizadeh D, Bonabi R. Investigating the effect of Cirsium vulgare hydroethanolic extract on neural stem cells proliferation. J Cell Tissue 2015; 5: 385-91.
3.Azimi Alamouti M, Bakhtiyari M, Moradi F, Mokhtari T, Hedayatpour A, Zafari F, Barbarestani M. Remyelination of the Corpus Callosum by Olfactory Ensheathing Cell in an Experimental Model of Multiple Sclerosis. Acta Med Iran 2015;53:533-9.
4. Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. A simple co-culture system for generation of embryonic stem-like cells from testis, Iran. Red Crescent Med J 2012; 14: 811-5.
5. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Runge U, Schroeder H, Hermann A, et al. Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. BMC Neuroscience 2010; 1: 48.
6. Song H, Charles S, Fred G. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. Nat Neurosci 2002; 5: 438-45.
7. Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M, Saiednia S, Pourmorad F, E Salimi E. Anti inflammatory and anto nociceptive properties of fractionated extracts in different parts of Sambucus ebulus. J Mazandaran Univ Med Sci 2006; 16: 35-47. [In Persian]
8. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activity of methanol extract of Sambucus ebulus. L flower. Pak J Biol Sci 2009; 12: 447-50.
9. Mazandarani M, Jamshidi M, Azad A. Investigation of secondary metabolites of sambucus ebulus L. in two natural regions of Mazandaran province, North of Iran. Journal of Plan Science Researches 2011; 6: 58-67. [In Persian]
10. Shokrzadeh M, Saravi SS. The chemistry, pharmacology and clinical properties of Sambucus ebulus: A review. J Med Plant Res 2010; 2: 95-103.
11. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. Brain 2011; 134: 1914-24.
12. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Niapour A, Bakhtiari M. Hamidabadi HG. Improvement of neuroglial differentiation from human dental pulp stem cells using CSF. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26: 1-14. [In Persian]
13. Nazm Bojnordi M, Ghasemi H, Akbari E. Remyelination after lysophosphatidyl choline-induced demyelination is stimulated by bone marrow stromal cell-derived oligoprogenitor cell transplantation. Cells Tissues Organs 2015; 200: 300-6.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:40 +0330 on Tuesday November 20th 2018

14. 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. Anat Cell Biol 2017; 50: 107-14.
15. Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M, Salimi E. Antiinflammatory activity of Sambucus ebulus hexane extracts. Fitoterapia 2006; 77: 146-8.
16. Nabiuni M, Rasouli J, Parivar K, Kochesfehani HM, Irian S, Miyan J. In vitro effects of fetal rat cerebrospinal fluid on viability and neuronal differentiation of PC12 cells. Fluids Barriers CNS 2012; 9: 8.
17. Auddy B, Ferreira M, Blasina F, Lafon L, Arredondo F, Dajas F, et al. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. J Ethnopharmacol 2003; 84: 131-8.
18. El-Sharaky AS, Newairy A, Kamel M, Eweda S. Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats. Food Chem Toxicol 2009, 47:1584-90.
19. Soltanian A, Ghorbanian M, 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. J Gorgan Univ Med Sci 2013; 15: 55-63. [In Persian]
20. Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S. Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale). Food Chem 2007; 102: 764-70.
21. Jafarzadeh A, Ahangar-Parvin R, Azizi SV, Ayobi F, Taghipour Z, Shamsizadeh A, et al. Evaluation of the Effect of Vitamin D3 and Ginger Extract on the Clinical Symptoms and the Severity of Inflammation in EAE. JRUMS 2015; 13: 683-94. [In Persian]
22. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative. Disorders Mol Cell Biochem 2010; 345: 91-104.
23. Ghasemi N. Evaluation of astaxanthin effects on the survival and proliferation of human adipose derived stem cells. SJKU 2017; 22: 84-92. [In Persian]
24. Ghasemi N. Comparison of two protocols for induction of differentiation of human adipose derived stem cells into oligodendrocyte progenitor cells. SJKU 2017; 22: 93-102. [In Persian]
25. Bojnordi MN, Azizi H, Skutella T, Movahedin M, Pourabdolhossein F, Shojaei A, et al. Differentiation of spermatogonia stem cells into functional mature neurons characterized with differential gene expression. Mol Neurobiol 2017; 54: 5676-82.
26. 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: 97–104.

Archive of SID

www.SID.ir