

## عصاره برگ رزماری، مکمل سرم و القاکننده تکثیر سلول‌های بنیادی چربی انسانی در شرایط کشت آزمایشگاهی

مریم ایزدی تلسرخ<sup>۱</sup>، مریم حاجی قاسم کاشانی<sup>۲\*</sup>، محمدتقی قربانیان<sup>۲</sup>

۱. کارشناسی ارشد بافت‌شناسی - جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی - مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران  
۲. استادیار علوم تشریح، گروه زیست‌شناسی سلولی - مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۴

**زمینه و هدف** عصاره برگ رزماری که گیاه دارویی شناخته شده است، تکثیر سلول‌های بنیادی را تحریک می‌کند. سلول‌های بنیادی چربی انسانی (HASCs) به آسانی در دسترس بوده و دستیابی به آن‌ها با آسب کمتری همراه است و کاربرد درمانی فراوانی دارد.

**مواد و روش‌ها** در این پژوهش، بافت چربی از خانم‌های سزارینی بیمارستان دامغان جدا شد. پس از هضم مکانیکی و آنزیمی، سلول‌های استخراج‌شده در محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. بنیادی بودن سلول‌ها با روش فلو سایتومتری و پتانسیل تمایزی آن‌ها تأیید شد. میزان بقا و تکثیر سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره رزماری حاوی ۴۰ درصد کارنوسیک اسید به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از تکنیک‌های هموسایتومتری، MTT و PCR ارزیابی شد.

**یافته‌ها** سلول‌های HASCs کشت‌شده در بررسی میکروسکوپی ظاهری دوکی‌شکل و فیبروبلاستی از خود نشان دادند و پاسخ مثبت به مارکرهای CD44، CD73، CD90، CD105 و پاسخ منفی به مارکرهای CD34 و CD45 دادند. همچنین قابلیت تمایز به سلول‌های چربی و استخوانی در آن‌ها اثبات شد. سرعت تکثیر و میزان بقای سلول‌های تیمار شده با رزماری در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به مدت ۴۸ ساعت افزایش معناداری را در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط فاقد رزماری و حاوی سرم کشت‌شده بودند، نشان داد.

**نتیجه‌گیری** عصاره رزماری به‌عنوان مکمل سرم می‌تواند به‌منظور آماده کردن سلول‌های مناسب‌تری برای پیوند کاربرد داشته باشد.

### کلیدواژه‌ها:

سلول بنیادی چربی انسان، عصاره رزماری، تکثیر، بقا.

### ۱. مقدمه

منبع مهم آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. [۲] از مؤثرترین و پرکاربردترین گیاهان متعلق به خانواده نعناعیان<sup>۱</sup> می‌توان به رزماری، گل‌مریمی، زنجبیل، جوزهندی و آویشن اشاره کرد. رزماری گیاهی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی قوی محسوب

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بسیاری بیماری‌ها و پیری دارند. [۱] گیاهان به‌دلیل داشتن ترکیبات مؤثر به‌عنوان

### 1. Lamiaceae

\* نویسنده مسئول: مریم حاجی قاسم کاشانی

نشانی: ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی - مولکولی و پژوهشکده علوم زیستی

تلفن: ۰۹۳۷۴۵۴۹۸۰۳

رایانه: kashani@du.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0001-8889-6427

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-7555-3986

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۷، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۸، ص ۶۷۷-۶۸۶

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانه: [journal@medsab.ac.ir](mailto:journal@medsab.ac.ir)

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

به آزمایشگاه منتقل شد. قطعات بافت چربی تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار پس از هضم مکانیکی با استفاده از تیغ اسکالپل، به قطعات کوچک‌تری تقسیم شد و هضم آنزیمی با افزودن کلاژناز (۰/۲ درصد) روی نمونه به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. برای خنثی کردن کلاژناز هم حجم آن محیط کشت  $\alpha$ -MEM غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم ریخته و پس از سانتریفیوژ با ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. مواد ته‌نشین را جدا کرده و در فلاسک کشت در معرض محیط  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی انکوبه شد. هر سه روز یک بار باید تعویض محیط کشت انجام شود. سلول‌های استرومایی به کف فلاسک چسبیده و سلول‌های خونی با تعویض محیط حذف شدند. در این مطالعه، از سلول‌های پاساژ چهارم استفاده شد.

## ۲.۲. فلو سایتومتری

سلول‌های HASCs در پاساژ چهارم تریپسینه، و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سپس حدود  $1 \times 10^5$  سلول در معرض آنتی‌بادی ها، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شد:

۱. آنتی‌بادی مونوکلونال مارک‌دار شده با فلونورسنت ایزوتیوسیانات<sup>۳</sup> علیه CD 90، CD 44 و CD 45.
۲. آنتی‌بادی مونوکلونال مارک‌دار شده با فیکواریترین<sup>۴</sup> علیه CD 105، CD 73 و CD 34.
۳. کنترل ایزوتوپ (سلول‌ها با آنتی‌بادی شاخصی غیر از شاخص مورد مطالعه در این تحقیق مارک‌دار شدند). سلول‌های مارک‌دار شده با آنتی‌بادی‌های نام‌برده با PBS شست‌وشو و بر روی یخ قرار داده شدند. سپس آنالیز ایمنوفلورسنت با دستگاه فلو سایتومتری مدل FACSCalibur (ساخت شرکت بکتون دیکینسون<sup>۵</sup>) انجام شد و اطلاعات به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Cyflogic (CyFlo Ltd) مورد بررسی قرار گرفت. [۱۲] تمام مراحل فلو سایتومتری شرح داده‌شده به‌وسیله شرکت سیای تهران انجام شد.

## ۲.۳. تمایز HASCs به سلول‌های استخوانی

زمانی که سلول‌ها به پاساژ چهارم رسیدند، در پلیت شش‌خانه حاوی محیط القاکننده تمایز به استخوان<sup>۶</sup> کشت داده شدند. سه روز یک بار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز، سلول‌های تمایز یافته با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد<sup>۷</sup> بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته و مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی-گراد در معرض محلول فیکساتیو فرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس به مدت ۲ دقیقه در معرض محلول رنگی آلیزارین رد

می‌شود. [۳] رزماری منبع غنی از اسیدهای فنلی است که مهم‌ترین آن‌ها کارنوسیک اسید و کارنوسول به‌شمار می‌رود که حدود ۹۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانتهی مربوط به این ترکیبات است. [۴]

زوک و همکاران [۵] در سال ۲۰۰۲، برای اولین بار سلول بنیادی را از بافت چربی انسانی جدا کردند و آن‌ها را سلول‌های بنیادی چربی انسانی (HASCs)<sup>۱</sup> نامیدند. چربی سفید دارای واکوئل‌های بزرگ چربی و همچنین یک شبکه مویرگی گسترده است و از بافت‌های نادری است که می‌تواند از انسان زنده در حین عمل لیپوساکشن بدون ایجاد هیچ‌گونه آسیبی حذف گردد و عملاً هیچ صدمه‌ای به سلامت فرد نزند. از یک گرم بافت چربی می‌توان تعداد زیادی سلول به‌دست آورد و برای ترمیم بافت آسیب‌دیده، پیروی، بازسازی بافت و تروما مورد استفاده قرار داد. [۶-۷]

سلول‌های HASCs قادرند به رده سلول‌های مزودرمی مثل ادیپوسیت، کندروسیت و استئوبلاست و عضله اسکلتی و همچنین رده سلول‌های غیرمزودرمی مانند هیپاتوسیت، پانکراتیک، سلول‌های اندوکرینی، نورون، گلیالی، سلول‌های عضله قلبی و اندوتلیال عروق تمایز یابند. [۸-۹]

بخش عروقی استرومایی (SVF)<sup>۲</sup> چربی، شامل یک جمعیت ناهمگن از سلول‌های خونی در گردش، فیبروبلاست‌ها، پرئیسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و همچنین پری‌ادیپوسیت‌ها یا پیش‌سازهای ادیپوسیت است. این سلول‌ها به‌سرعت به کف ظرف می‌چسبند و از سرعت تکثیر زیادی برخوردارند. [۱۰]

در این تحقیق، پس از بررسی ماهیت بنیادی بودن سلول‌ها، سرعت تکثیر و میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از القا با عصاره رزماری ارزیابی شد. از آنجا که سرم گاوی در انسان ایمنولوژیک بوده و هنگام پیوند خطر انتقال عفونت را به‌همراه دارد، در این تحقیق سعی شد حتی‌الامکان با حذف سرم و جایگزین کردن با عصاره رزماری، بهینه‌سازی شرایط کشت صورت گیرد و تعداد بیشتری سلول زنده با سرعت تکثیر بالاتری برای پیوند و سلول درمانی فراهم شود.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی انسانی

در این تحقیق، بافت چربی زیرجلدی شکم از زنان باردار تحت جراحی سزارین در بیمارستان ولایت شهرستان دامغان و با رضایت کامل آن‌ها تهیه شد. نمونه‌های چربی گرفته‌شده در کمترین زمان

5. Becton Dickinson

6. Osteocyte Differentiation Medium

7. Alizarain Red S. Sigma

1. Human Adipose Stem Cells

2. Stromal-Vascular Fraction

3. Fluorescein isothiocyanate (FITC)- labeled

4. Phycoerithrin (PE)- conjugated

تربیان بلو ۰/۴ درصد در بافر ایزوتونیک نمکی یا PBS مخلوط شد و شمارش سلولی توسط میکروسکوپ نوری و با استفاده از لام نتوبار صورت گرفت.

### ۲.۶. ارزیابی زمان دوبرابر شدن سلول‌ها با روش MTT

سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت ۹۶ خانه (تراکم  $2 \times 10^4$  سلول در هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی سرم ۱۰ درصد) کشت داده شدند. سپس سرعت دوبرابر شدن سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، محیط قبلی خارج شد و به هرکدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (3-(4,5- [dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide (Sigma) به میزان ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده و به مدت ۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط رویی برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و در نهایت میزان جذب، در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر<sup>۵</sup> (شرکت بیوتک<sup>۶</sup>) اندازه‌گیری شد.

## ۳. یافته‌های پژوهش

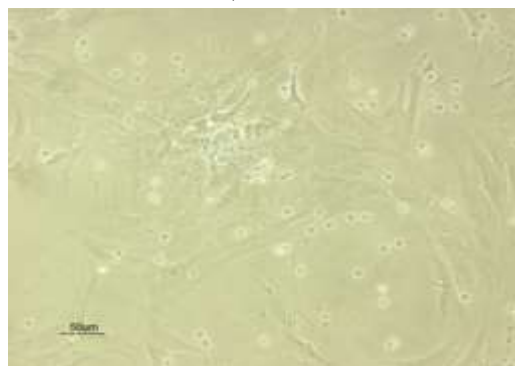
### ۳.۱. بررسی مورفولوژیکی

سلول‌های HASCs در پاساژهای مختلف با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌ها ظاهری دوکی‌شکل و فیبروبلاستی داشتند و به کمک زوائد خود به کف فلاسک کشت می‌چسبیدند (شکل ۱.A و B). همچنین سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری در شکل ۲-C مشاهده می‌شود که در آن کلونی‌های تکثیری سلول تشکیل شده است.

(الف)



(ب)



قرار گرفته و در نهایت با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مشاهده و عکس‌برداری شد.

### ۲.۴. تمایز HASCs به سلول‌های چربی

سلول‌های پاساژ سلولی ۴ در پلیت شش‌خانه حاوی محیط القاکننده تمایز به چربی<sup>۱</sup> کشت داده شدند. سه روز یک بار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز، سلول‌های تمایز یافته با رنگ‌آمیزی اوایل رد<sup>۲</sup> بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته و مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو فرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها با الکل ۷۰ درصد شسته و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در معرض محلول رنگی اوایل رد قرار داده شدند.

### ۲.۵. ارزیابی تکثیر سلولی با روش هموسایتومتری

در این تحقیق، از عصاره رزماری حاوی کارنوسیک اسید ۴۰ درصد<sup>۳</sup> خریداری شده از شرکت ژنهام بیومدیکال تکنولوژی چین<sup>۴</sup> استفاده شد. حلال عصاره الکل ۹۵ درصد بود؛ به طوری که دوزهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد تا میزان زنده ماندن سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. ابتدا سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه با تراکم  $10^4$  سلول در هر خانه کشت داده شدند. پس از آنکه به تراکم ۸۰ درصد رسیدند، با PBS شست‌وشو داده شده و در معرض محیط کشت  $\alpha$ -MEM فاقد سرم و حاوی غلظت‌های مختلف عصاره رزماری ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. گروهی از سلول‌ها نیز در محیط فاقد عصاره و سرم قرار داده شده و به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پلیت را در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت داخل انکوباتور قرار داده و تکثیر سلول‌ها با روش هموسایتومتری بررسی شد؛ به طوری که سوسپانسیون سلولی به نسبت مساوی با

4. Geneham Biomedical Technology  
6. Eliza Reader  
6. BioTek

1. Adipocyte Differention Medium  
2. Oil Red O. Sigma  
3. carnosic acid powder CAP25-110401

(ج)

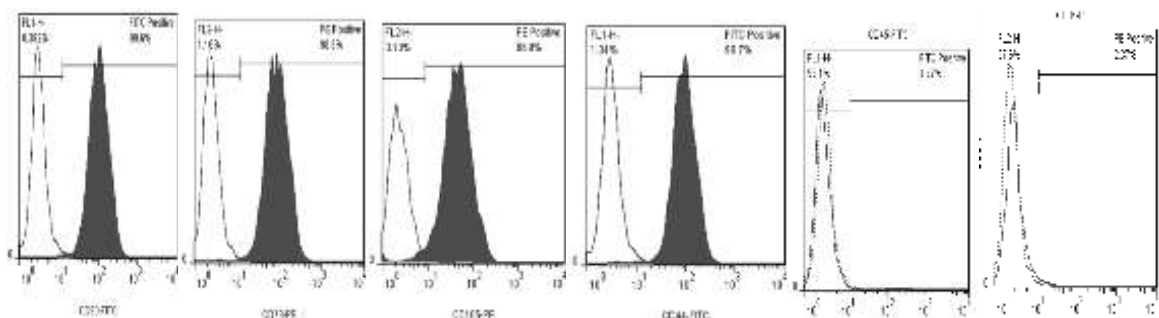


شکل ۱. نمای میکروسکوپی از سلول‌های HASCs در شرایط کشت آزمایشگاهی و پس از القا با عصاره رزماری  
 A: سلول‌های بنیادی چربی انسانی، ۹۶ ساعت پس از کشت به صورت دوکی شکل و کشیده دیده شدند که در آن سلول‌های خونی شناور نیز مشاهده می‌شود. B: سلول‌های بنیادی چربی در پاساژ چهارم. C: سلول‌ها پس از القا با دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری

### ۳.۲. بررسی فلو سایتومتری

نتایج نشان داد بیش از ۹۸ درصد از سلول‌های استخراج شده در این مطالعه از نظر بیان مارکرهای سطحی CD73، CD44،

CD90 و CD105 (مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی) مثبت بودند. همچنین از نظر بیان مارکرهای سطحی CD34 و CD45 (مارکرهای سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک) منفی بودند (شکل ۲).



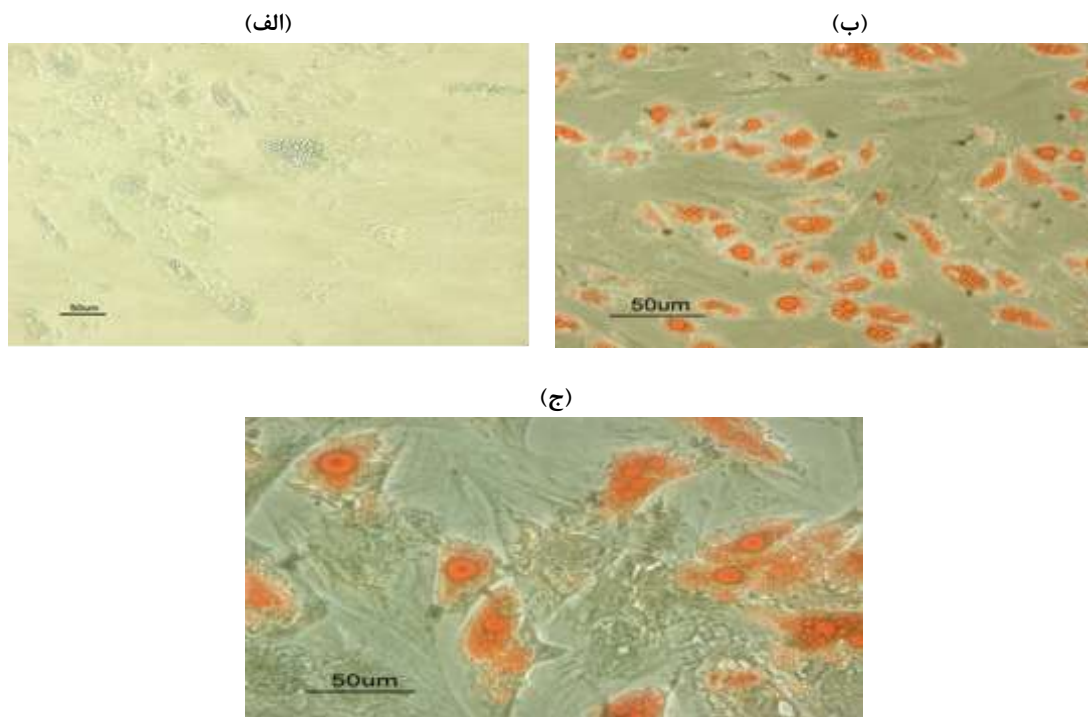
شکل ۲. سلول‌های بنیادی چربی انسانی بررسی شده با فلو سایتومتری

بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها به نشانگرهای CD73، CD44، CD90، CD105 پاسخ مثبت دادند. منحنی سفیدرنگ مربوط به کنترل ایزوتوپ است که سلول‌ها با آنتی‌بادی شاخصی غیر از شاخص مورد مطالعه در این تحقیق مارک‌دار شدند. منحنی سیاه‌رنگ سلول‌های مورد مطالعه هستند که با آنتی‌بادی کونژوگه با FITC و PE نشان‌دار شدند و کمتر از ۲/۵ درصد سلول‌ها به نشانگرهای CD34 و CD45 پاسخ دادند.

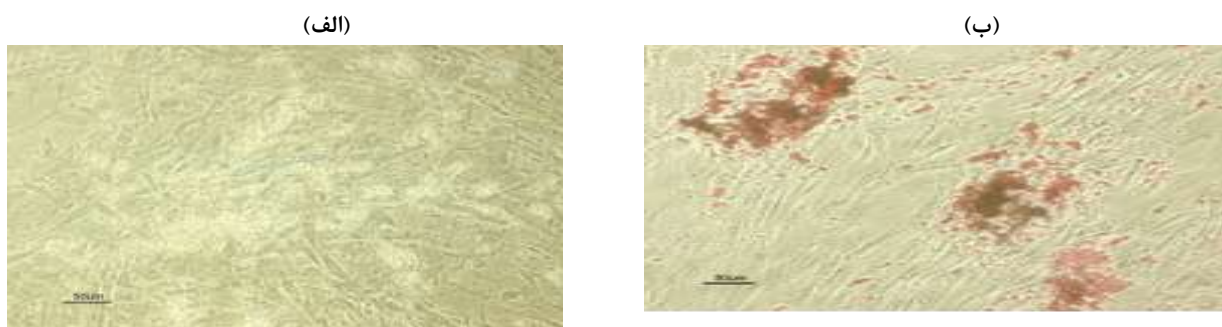
### ۳.۳. قابلیت تمایز سلول‌های HASCs به استئوسیت و ادیپوسیت

برای نشان دادن چندتوانی این سلول‌ها تمایز به سلول‌های چربی و استخوانی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور پس از تأثیر محیط تمایزی استئوژنیک و آدیپوژنیک به سلول‌های HASCs، به تدریج مورفولوژی شبیه به سلول‌های چربی و استخوانی را پیدا کردند و پس از سه هفته القا، رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد. تمایز ادیپوسیت با تجمع واکوئل‌های لیپید از هفته اول آغاز و با گذشت زمان تعداد آن‌ها بیشتر می‌شود؛

به طوری که پس از ۱۰ روز در تمام سیتوپلاسم برخی از سلول‌ها و زیگول‌های چربی انباشته شده بود و پس از ۲۱ روز با رنگ آمیزی اوایل رد مشاهده شد. قرمز شدن سیتوپلاسم سلول‌ها، ویژگی ادیپوسیتی آن‌ها را تأیید کرد (شکل ۳، A و B و C). به منظور تمایز HASCs به سلول‌های استخوانی، سلول‌ها در معرض محیط استخوان‌ساز قرار گرفتند. به تدریج تغییرات مورفولوژیکی و تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی پدیدار شد. پس از ۲۱ روز، ماتریکس خارج سلولی معدنی با آلیزارین رد رنگ‌آمیزی شد (شکل ۴، A و B).



شکل ۳. سلول‌های بنیادی چربی انسانی تمایز یافته به ادیپوسیت و استئوسیت در محیط کشت خاص  
 A: سلول‌های تمایز یافته قبل از رنگ آمیزی با اویل رد که در آن‌ها گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم ادیپوسیت‌ها قابل مشاهده هستند و می‌توان  
 این سلول‌ها را از سلول‌های تمایز نیافته تشخیص داد. B: سلول‌های تمایز یافته پس از رنگ آمیزی که در آن‌ها گرانول‌های چربی به رنگ قرمز  
 مشاهده می‌شوند. C: همین سلول‌ها در بزرگ‌نمایی  $40\times$ .

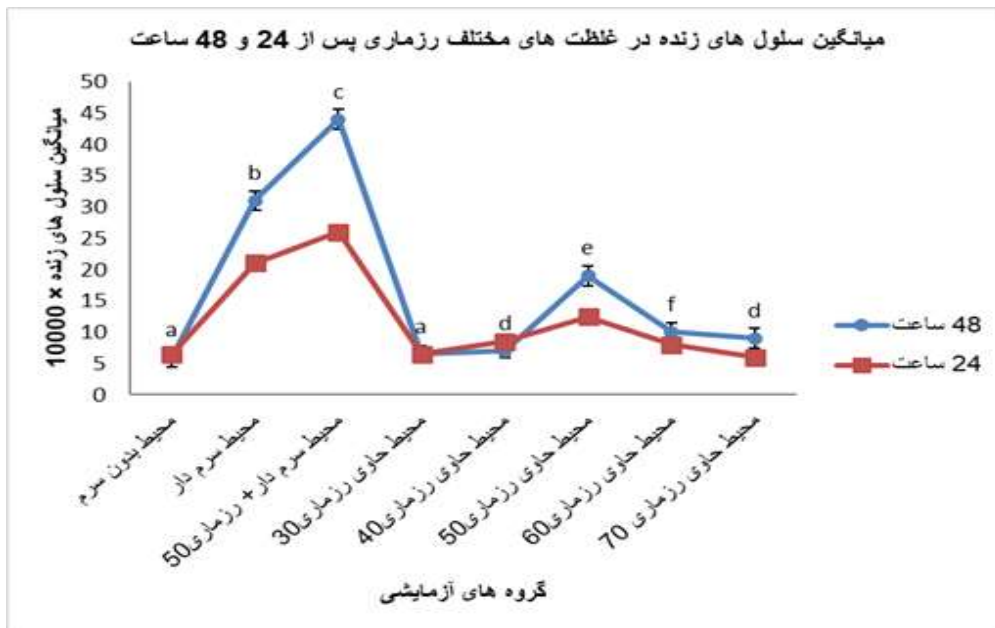


شکل ۴. A: سلول‌های تمایز یافته قبل از رنگ آمیزی با آلپزارین رد. B: سلول‌های تمایز یافته پس از رنگ آمیزی که در آن‌ها رسوب تیغه‌های  
 استخوانی در فضاهای بین سلولی مشاهده می‌شود.

رزماری به مدت ۴۸ ساعت القا شده بودند، در مقایسه با سلول-  
 هایی که با غلظت‌های دیگر رزماری القا شده بودند، افزایش  
 معناداری را نشان دادند. افزایش معنادار در تعداد سلول‌های  
 زنده گروه رزماری ۵۰ در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط  
 بدون سرم کشت داده شده بودند، مشاهده شد. همچنین کاهش  
 معناداری در تعداد سلول‌های زنده در گروه رزماری ۵۰ نسبت  
 به گروه محیط سرم‌دار و گروه سرم‌دار + رزماری ۵۰ مشاهده  
 شد؛ به طوری که گروه مذکور در مقایسه با گروه محیط سرم‌دار  
 افزایش معناداری را نشان داد (شکل ۵).

۳،۴. میانگین تعداد سلول‌های HASCs زنده پس از القا  
 با غلظت‌های مختلف رزماری به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت  
 سرعت تکثیر سلول‌های HASCs که به مدت ۴۸ ساعت در  
 معرض دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره رزماری قرار  
 گرفتند، افزایش معناداری را در مقایسه با گروه مشابه در ۲۴  
 ساعت نشان داد. بنابراین به منظور بررسی تعداد سلول‌های زنده،  
 زمان ۴۸ ساعت انتخاب شد. در گروه‌های ۴۸ ساعته، تعداد  
 سلول‌های زنده که با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره





شکل ۵. بررسی درصد سلول های زنده با روش هموسایتومتري در سلول های بنيادی چربي انسانی تيما ر شده با عصاره رزماری با غلظت های مختلف به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت

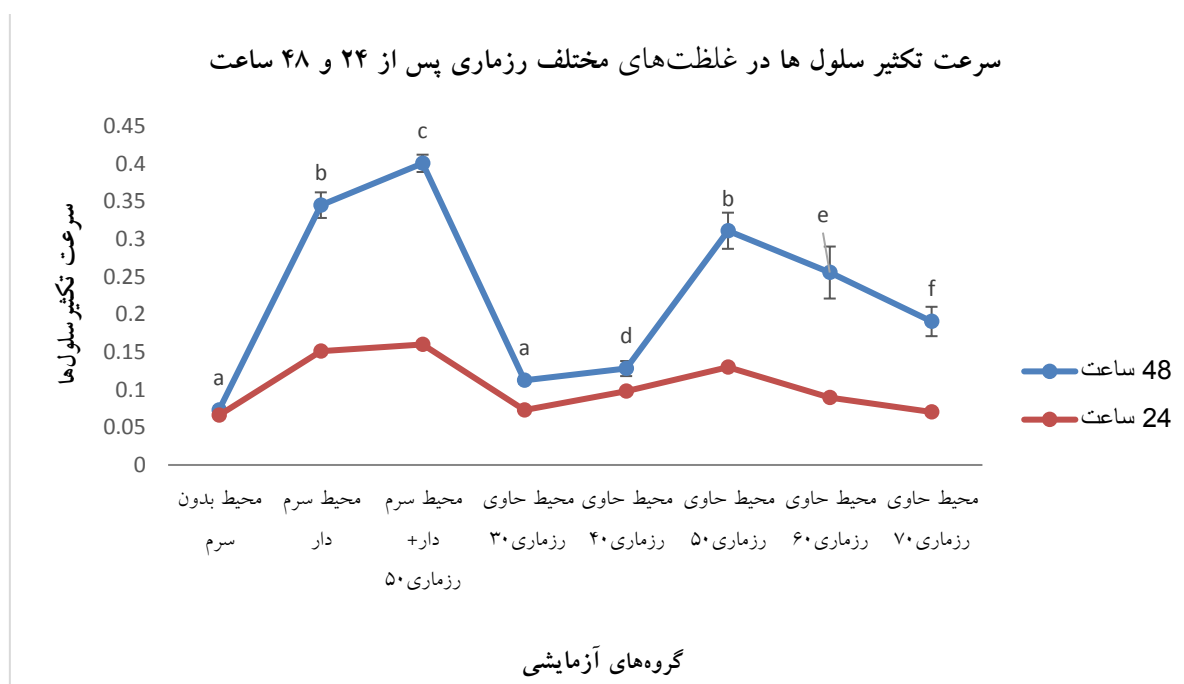
Medium: سلول های کشت شده در محیط بدون سرم. Medium+fbs: سلول های کشت شده در محیط سرم دار. RE50+fbs: سلول های کشت شده در محیط سرم دار و حاوی رزماری با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر. RE30-RE70: سلول های کشت شده در غلظت های مختلف ۳۰ تا ۷۰ میکروگرم بر میکرولیتر رزماری (حروف غیرهمنام نشان دهنده معنادار بودن و حروف همنام نمودار معنادار نبودن بین گروه هاست).

معنادار نبود. بنابراین سه دوز مذکور توانسته بود سرعت تکثیر را افزایش دهد. سلول هایی که در محیط حاوی رزماری با غلظت ۵۰ و ۶۰ به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شده بودند، در مقایسه با دو دوز دیگر رزماری (۴۰ و ۷۰) افزایش معناداری را در میزان OD نشان دادند. از طرفی نیز بین گروه های رزماری با غلظت ۵۰ و محیط سرم دار اختلاف معناداری مشاهده نشد؛ در حالی که گروه سرم دار + رزماری ۵۰ افزایش معناداری را در مقایسه با گروه محیط سرم دار نشان داد.

از سوی دیگر نیز سلول های کشت شده در محیط حاوی غلظت های ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۷۰ رزماری به مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول های کشت شده در محیط حاوی سرم و رزماری ۵۰، کاهش معناداری را در OD نشان دادند. بنابراین افزایش میزان OD از دوز ۴۰ رزماری تا دوز ۵۰ مشاهده شد و از دوز ۵۰ به بعد میزان OD کاهش معناداری یافت (شکل ۶).

### ۳.۵. سرعت تکثیر سلول های HASCs پس از القا با غلظت های مختلف رزماری

سلول هایی که در معرض عصاره رزماری با دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفته بودند، نسبت به سلول هایی که مدت زمان القا در آن ها ۲۴ ساعت بود، سرعت تکثیر بیشتری را نشان دادند. بنابراین زمان ۴۸ ساعت برای تست MTT در نظر گرفته شد. افزایش معنادار میزان OD در سلول های HASCs کشت شده در محیط حاوی عصاره رزماری با غلظت های ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با سلول های کشت شده در محیط فاقد سرم مشاهده شد که نشان دهنده سرعت تکثیر بالای سلول ها در غلظت های مذکور بود. ولی این افزایش در میزان OD در سلول های کشت شده در عصاره رزماری با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با سلول های کشت شده در محیط فاقد سرم



شکل ۶. بررسی سرعت تکثیر با روش MTT در سلول‌های بنیادی چربی انسانی تیمار شده با عصاره رزماری با غلظت‌های مختلف به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت

Medium: سلول‌های کشت شده در محیط بدون سرم. Medium+fb: سلول‌های کشت شده در محیط سرم دار. RE50+fb: سلول‌های کشت شده در محیط سرم دار و حاوی رزماری با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر. RE30-RE70: سلول‌های کشت شده در غلظت‌های مختلف ۳۰ تا ۷۰ میکروگرم بر میلی لیتر رزماری (حروف غیرهمنام نشان دهنده معنادار بودن و حروف همنام نشانگر معنادار نبودن بین گروه‌هاست).

مزانشیمی، مثبت بوده و توانایی بیان نشانگر سلول‌های هماتوپوئیتیک را ندارند که مطابق با یافته‌های زوک است. [۵]، [۱۴] نتایج آنالیزهای عملکردی سلول‌های استخراج شده در این مطالعه نشان دهنده توان تمایزی چندگانه این سلول‌ها به سلول‌های مزانشیمی بوده است. ASCs به سلول‌های رده چربی و استخوانی سوق داده شدند. نتیجه چنین شد که این سلول‌ها به سلول استخوانی مشابه یافته‌های دیگر دانشمندان [۱۵] و سلول چربی مشابه یافته‌های دیگر محققان [۱۶] تمایز یافتند که این ادعا به وسیله روش رنگ آمیزی اوایل رد و آلیزارین رد اثبات گردید.

بر اساس تحقیقات انجام شده، MSC جدا شده از بافت چربی از نظر ریخت شناسی و بیان نشانگرهای سطحی شباهت زیادی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان دارند و درعین حال پتانسیل پاساژ پذیری و تزاید بالاتری نسبت به این سلول‌ها را از خود نشان می‌دهند. [۱۷-۱۸] پس از اطمینان کامل از بنیادی بودن سلول‌ها، تأثیر دوزهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت [۱۹] بر سرعت تکثیر و میزان زنده ماندن سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. طبق نتایج، میزان زنده بودن سلول‌هایی که در مدت زمان ۴۸ ساعت در معرض دوز

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

سلول‌های بنیادی بافت چربی به دلیل استخراج آسان و کشت و تکثیر ساده تر در محیط آزمایشگاه و خواص ایمنومدولاتوری بهتر، کاندید مناسبی برای سلول درمانی هستند. [۱۱-۱۲] در این تحقیق، از پاساژ چهارم ASCs استفاده شد. به این دلیل از سلول‌های پاساژ پایین تر استفاده نشد که سلول‌ها به تعداد مورد نظر نرسیده بود و از سلول‌های پاساژ بالاتر هم به این علت استفاده نشد که مطابق تحقیقات، سلول‌های بنیادی پس از پاساژهای متوالی کم کم خاصیت بنیادی بودن خود مانند چندتوان بودن و خود تکثیری را از دست می‌دهند. سلول‌های بنیادی بعد از وارد شدن به پاساژ بالاتر سرعت بسیار کمتری در رشد و تکثیر و تمایز از خود نشان می‌دادند. این ویژگی با تفاوت در بیان پروتئین‌هایی قبل و بعد از پاساژ چهارم تأیید شده است. [۱۳]

جهت تأیید بنیادی بودن سلول‌های ASCs روش فلو سایتومتری به کار گرفته شد. در این مطالعه، از CD مارکرهای مثبت و منفی مناسب و کافی برای شناسایی سلول‌های مورد بررسی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیش از ۹۸ درصد از این سلول‌ها از نظر بیان نشانگرهای سطحی ویژه سلول‌های

در مقایسه با گروه محیط سرم‌دار حاوی غلظت ۵۰ رزماری مشاهده نشد. بنابراین افزایش میزان OD از دوز ۴۰ رزماری تا دوز ۵۰ مشاهده شد و از دوز ۵۰ به بعد میزان OD کاهش معنا-داری یافت. این کاهش نشان می‌دهد سرعت تکثیر در سلول-های HASCs القاشده با دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت از بیشترین میزان برخوردار بوده است. با توجه به اینکه کاهش معناداری در تعداد سلول‌های زنده در گروه رزماری با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه محیط سرم‌دار و گروه سرم‌دار + رزماری مشاهده شد، بنابراین رزماری نقش تروفیک داشته، اما تأثیر سرم در افزایش تکثیر سلول‌ها بیشتر بوده و سلول‌های زنده را افزایش داده است. همچنین درصد سلول‌های زنده در گروه رزماری + سرم در مقایسه با گروه سرم‌دار افزایش معناداری را نشان داد. بنابراین می‌توان از عصاره رزماری به همراه سرم در محیط کشت، تعداد سلول‌های زنده را در محیط کشت آزمایشگاهی به میزان بسیاری افزایش داد. از این جهت عصاره رزماری کاندید مناسبی برای افزایش تعداد سلول‌های زنده و به دست آوردن میزان کافی سلول برای پیوند است و می‌توان از آن در طب ترمیمی استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مریم ایزدی، کارشناس ارشد رشته بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، از دانشگاه دامغان است. بدین وسیله از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان برای پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی سپاس‌گزاری می‌شود.

### References

- [1]. Rasoolijazi H, Mehdizadeh M, Soleimani M, Nikbakhte F, Farsani ME, Ababzadeh S. The effect of rosemary extract on spatial memory, learning and antioxidant enzymes activities in the hippocampus of middle-aged rats. *Med J Islam Repub Iran*. 2015; 29: 187.
- [2]. Wojdyło A, Oszmian'ski I, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistrv*. 2007; 105: 940-9.
- [3]. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 225.
- [4]. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari A.R, Hamedani MP. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn Mag*. 2012; 8(29): 37-41.
- [5]. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang II, Mizuno H, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002; 13(12): 4279-95.
- [6]. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016; 64(6): 443-54.
- [7]. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43: 268-74.
- [8]. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45(2): 115-20.
- [9]. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res*. 2012; 8(1): 150.
- [10]. Wang X, Zhao Z, Gong J, Zhou S, Peng H, Shatar A, Gu H. Adipose stem cells-conditioned medium blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity via the IGF-1/PI3K/AKT pathway. *Neurosci Lett*. 2014; 581: 98-102.
- [11]. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue



- differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int*. 2008; 32(4): 384-93.
- [12]. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewna T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016 Dec; 64(6): 443-54.
- [13]. Perkel JM. Rites of (stem cell) passage. *J Proteome Res*. 2009 May; 8(5): 2137.
- [14]. [14] Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(5): 647-56.
- [15]. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009; 5(7): 1294-311.
- [16]. Tabatabaei Qomi R, Shevkhhasan M. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: A review. *World J Stem Cells*. 2017 Aug 26; 9(8): 107-17.
- [17]. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol*. 2004; 83(12): 733-8.
- [18]. Hosseinpour Z, Hashemi SM, Salehi E, Ghazanfari T. Comparison of TGF- $\beta$ 1 and NO production by mesenchymal stem cells isolated from murine lung and adipose tissues. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2016; 38(3): 214-20.
- [19]. Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life sciences*. 1998; 63(11): 935-48.
- [20]. Weindruch R, Sohal RS. Caloric intake and aging. *N Engl J Med*. 1997; 337(14): 986-94.
- [21]. Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52(1): 26-42.
- [22]. Manoharan S, VasanthaSelvan M, Silvan S, Baskaran N, Singh AK, Kumar VV. Carnosic acid: a potent chemopreventive agent against oral carcinogenesis. *Chem Biol Interact*. 2010; 188(3): 616-22.
- [23]. Sahu BD, Rentam KK, Putcha UK, Kuncha M, Vegi GM, Sistla R. Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(12): 3090-7.
- [24]. Alcaraz M, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Olivares A, Lopez-Morata JA, Castillo J. Radiosensitizing effect of rosmarinic acid in metastatic melanoma B16F10 cells. *Anticancer Res*. 2014; 34(4): 1913-21.

## Rosemary Leaf Extract, a Serum Supplement and Inducer of Human Adipose stem Cells Proliferation in Vitro

Maryam Izadi Tol Sorkhi<sup>1</sup>, Maryam Haji Ghasem Kashani<sup>2\*</sup>, Mohammad Taghi Ghorbanian<sup>2</sup>

1. MSc, Department of Cellular & Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Damghan, Damghan, Iran
2. Associate Professor, Department of Cellular & Molecular Biology, Faculty of Biology Institute of Biological Sciences, University of Damghan, Damghan, Iran

### Abstract

**Introduction:** Rosemary leaf extract, as a medicinal plant, can stimulate stem cells proliferation. Human adipose stem cells (HASCs) are readily available and less harmful accessibility with high therapeutic application.

**Methods:** In this study, fat tissue was isolated from Caesarean women at Damghan Hospital. After mechanical and enzymatic digestion, extracted cells were cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS. Stemness of HASCs was confirmed by flow cytometry and their differentiation potential. The survival rate, proliferation and neurotrophins genes expression of cells treated with 30, 40, 50, 60 and 70  $\mu$ g/ml concentrations of Rosemary extract containing 40% of carnosic acid for 24 and 48h were evaluated using hoemocytometry, MTT and PCR assays.

**Results:** Cultured HASCs showed spindle and fibroblastic shapes under microscopic study. They expressed positive response to CD44, CD73, CD90, CD105 and negative response to CD34 and CD45 markers and differentiated into adipocytes and osteocytes. The proliferation rate and survival of cells treated with Rosemary at a concentration of 50  $\mu$ g/ml for 48 h were increased significantly as compared to cultured cells in medium without Rosemary, containing serum.

**Conclusion:** Rosemary extract could be used as a serum supplement to prepare more suitable cells for transplantation.

Received: 2017/12/22

Accepted: 2018/11/25

**Keywords:** Human Adipose Stem Cells, Rosemary Extract, Proliferation, Survival.