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

مریم ایزدی تلسرخی[1]، مریم حاجی قاسم کاشانی[2*]، محمدتقی قربانیان[2]

۱. کارشناسی ارشد بافت‌شناسی ـ جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی ـ مولکولی، دانشکدۀ زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
۲. استادیار علوم تشریح، گروه زیست‌شناسی سلولی ـ مولکولی، دانشکدۀ زیست‌شناسی و پژوهشکدۀ علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۴

چکیده

زمینه و هدف عصارۀ برگ رزماری که گیاه دارویی شناخته شده است، تکثیر سلول‌های بنیادی را تحریک می کند. سلول‌های بنیادی چربی انسانی (HASCs) به‌آسانی در دسترس بوده و دستیابی به آن‌ها با آسیب 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 α-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 تیمارشده با غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارۀ 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 و 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 سلول های تیمارشده 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 عصارۀ رزماری به‌عنوان مکمل سرم می‌تواند به‌منظور آماده کردن سلول‌های مناسب‌تری برای پیوند کاربرد داشته باشد.

کلیدواژه‌ها:
سلول بنیادی چربی انسان، عصارۀ رزماری، تکثیر، بقا.

۱. مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بسیاری بیماری‌ها و پیری دارند. [۱] گیاهان به‌دلیل داشتن ترکیبات مؤثر به‌عنوان منبع مهم آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. [۲] از مؤثرترین و پرکاربردترین گیاهان متعلق به خانوادۀ نعناعیان[1] می‌توان به رزماری، گل‌مریمی، زنجبیل، جوزهندی و آویشن اشاره کرد. رزماری گیاهی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی قوی محسوب

1. Lamiaceae

* **نویسندۀ مسئول: مریم حاجی قاسم کاشانی**
نشانی: ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکدۀ زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی ـ مولکولی و پژوهشکدۀ علوم زیستی

تلفن: ۰۹۳۷۴۵۴۹۸۰۳
رایانه: kashani@du.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-8889-6427
شناسه ORCID نویسندۀ اول: 0000-0001-7555-3986

مجلۀ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورۀ ۲۷، شمارۀ ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۸، ص ۶۷۷-۶۸۶
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

می‌شود. [۳] رزماری منبع غنی از اسیدهای فنلی است که مهم‌ترین آن‌ها کارنوسیک اسید و کارنوسول به‌شمار می‌رود که حدود ۹۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانتی 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)[1] نامیدند. چربی سفید دارای واکوئل‌های بزرگ چربی و همچنین یک شبکهٔ 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، پیری، بازسازی بافت و تروما مورد استفاده قرار داد. [۶ـ۷]

سلول‌های HASCs قادرند به ردهٔ سلول‌های مزودرمی مثل ادیپوسیت، کندروسیت و استئوبلاست و عضلهٔ اسکلتی و همچنین ردهٔ سلول‌های غیرمزودرمی مانند هپاتوسیت، پانکراتیک، سلول‌های اندوکرینی، نورون، گلیالی، سلول‌های عضلهٔ قلبی و اندوتلیال عروق تمایز یابند. [۸ـ۹]

بخش عروقی استرومایی (SVF)[2] چربی، شامل یک جمعیت ناهمگن از سلول‌های خونی در گردش، فیبروبلاست‌ها، پریسیت‌ها، 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 عصارهٔ رزماری ارزیابی شد. از آنجا که سرم گاوی در انسان ایمونولوژیک بوده و هنگام پیوند خطر انتقال عفونت را به‌همراه دارد، در این تحقیق سعی شد حتی‌الامکان با حذف سرم و جایگزین کردن با عصارهٔ 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 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 ۳۰ـ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. برای خنثی کردن کلاژناز هم حجم آن محیط کشت α-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 α-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 ۱×۱۰^{۵} سلول در معرض آنتی‌بادی ها، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شد: ۱. آنتی‌بادی مونوکلونال مارک‌دارشده با فلوئورسنت ایزوتیوسیانات[3] علیه CD 90، CD 44 وCD 45. ۲. آنتی‌بادی مونوکلونال مارک دارشده با فیکواریترین[4] 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 مارک‌دارشده با آنتی‌بادی‌های نام‌برده با PBS شست‌وشو و بر روی یخ قرار داده شدند. سپس آنالیز ایمنوفنوتیپیک با دستگاه فلو سایتومتری مدل FACSCalibur (ساخت شرکتِ بکتون دیکینسون[5]) انجام شد و اطلاعات به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Cyflogic (CyFlo Ltd) مورد بررسی قرار گرفت. [۱۲] تمام مراحل فلو سایتومتری شرح داده‌شده به‌وسیلهٔ شرکت سبای تهران انجام شد.

۲,۳. تمایز HASCs به سلول‌های استخوانی

زمانی که سلول‌ها به پاساژ چهارم رسیدند، در پلیت شش‌خانه حاوی محیط القاکنندهٔ تمایز به استخوان[6] کشت داده شدند. سه روز یک بار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز، سلول‌های تمایزیافته با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد[7] 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 به مدت ۲ دقیقه در معرض محلول رنگی آلیزارین رد

1. Human Adipose Stem Cells
2. Stromal-Vascular Fraction
3. Fluorescein isothiocyanate (FITC)- labeled
4. Phycoerithrin (PE)- conjugated
5. Becton Dickinson
6. Osteocyte Differentiatiom Medium
7. Alizarain Red S. Sigma

قرار گرفته و درنهایت 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 القاکنندهٔ تمایز به چربی[1] کشت داده شدند. سه روز یک بار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز، سلول‌های تمایزیافته با رنگ‌آمیزی اویل رد[2] 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 ۱۰ـ۱۵ دقیقه در معرض محلول رنگی اویل رد قرار داده شدند.

۲،۵. ارزیابی تکثیر سلولی با روش هموسایتومتری

در این تحقیق، از عصارهٔ رزماری حاوی کارنوسیک اسید ۴۰ درصد[3] خریداری‌شده از شرکت ژنهام بیومدیکال تکنولوژی چین[4] استفاده شد. حلال عصارهٔ الکل ۹۵ درصد بود؛ به‌طوری 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 ۹۶خانه 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 α-MEM فاقد سرم و حاوی غلظت‌های مختلف عصارهٔ 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 به‌عنوان گروه کنترل درنظر گرفته شدند. پلیت را در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت داخل انکوباتور قرار داده و تکثیر سلول‌ها با روش هموسایتومتری بررسی شد؛ به‌طوری که سوسپانسیون سلولی به نسبت مساوی با تریپان بلو ۰/۴ درصد در بافر ایزوتونیک نمکی یا PBS مخلوط شد و شمارش سلولی توسط میکروسکوپ نوری و با استفاده از لام نئوبار صورت گرفت.

۲،۶. ارزیابی زمان دوبرابر شدن سلول‌ها با روش MTT

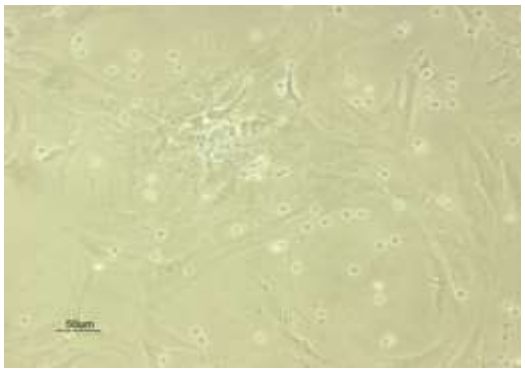
سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت ۹۶ خانه (تراکم 2×10^4 سلول در هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت α-MEM حاوی سرم ۱۰ درصد) کشت داده شدند. سپس سرعت دوبرابر شدن سلول ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، محیط قبلی خارج شد و به هرکدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به‌همراه ۱۰ میکرولیتر 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 درنهایت میزان جذب، در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر[5] (شرکت بیوتک[6]) اندازه‌گیری شد.

۳. یافته‌های پژوهش

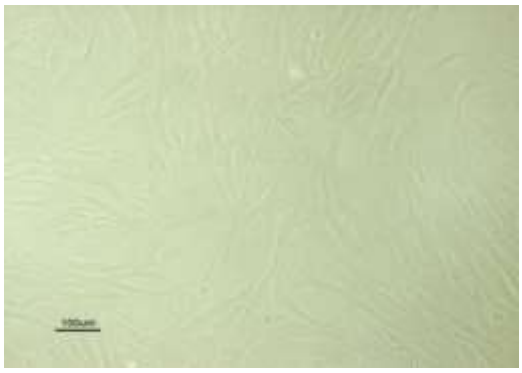
۳،۱. بررسی مورفولوژیکی

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 A.۱ و B). همچنین سلول‌های تیمارشده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری در شکل ۲ - C مشاهده می‌شود که در آن کلونی‌های تکثیری سلول تشکیل شده است.

(ب)



(الف)



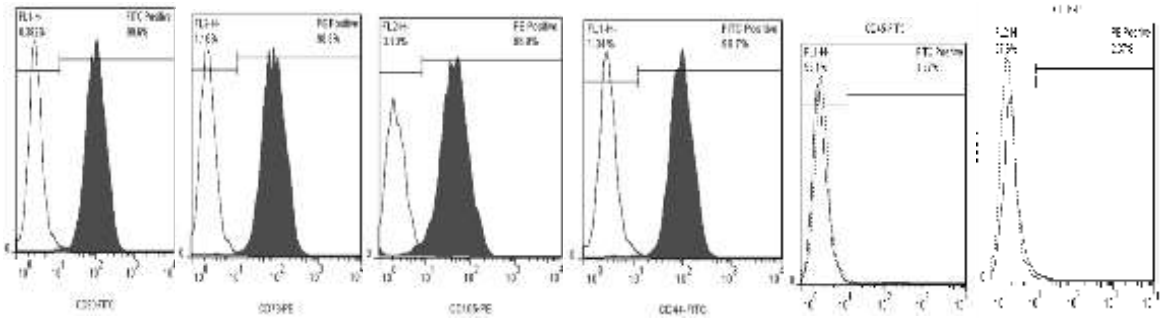
1. Adipocyte Differentiontion Medium
2. Oil Red O. Sigma
3. carnosic acid powder CAP25-110401
4. Geneham Biomedical Technology
6. Eliza Reader
6. BioTek

(ج)

شکل ۱. نمای میکروسکوپی از سلول‌های HASCs در شرایط کشت آزمایشگاهی و پس از القا با عصارهٔ رزماری
A: سلول‌های بنیادی چربی انسانی، ۹۶ ساعت پس از کشت به‌صورت دوکی‌شکل 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 دوز۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری

۳،۲. بررسی فلو سایتومتری

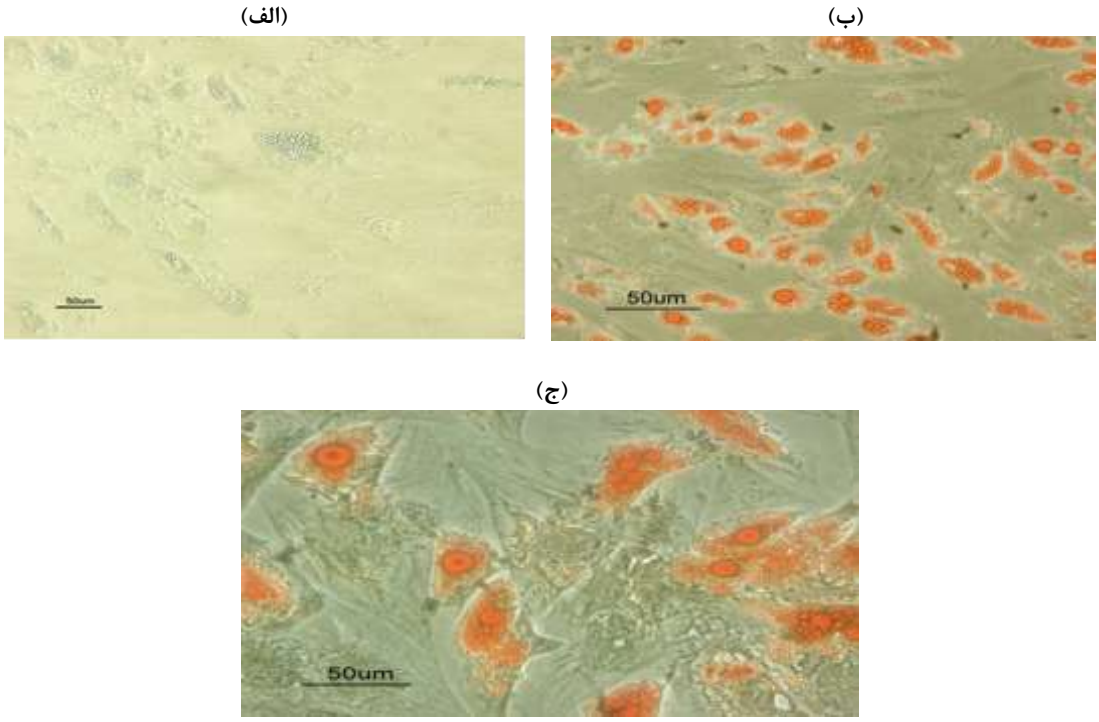
نتایج نشان داد بیش از ۹۸ درصد از سلول‌های استخراج‌شده در این مطالعه از نظر بیان مارکرهای سطحی CD44، CD73، CD90 و CD105 (مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی) مثبت بودند. همچنین از نظر بیان مارکرهای سطحی CD45 و CD34 (مارکرهای سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک) منفی بودند (شکل ۲).



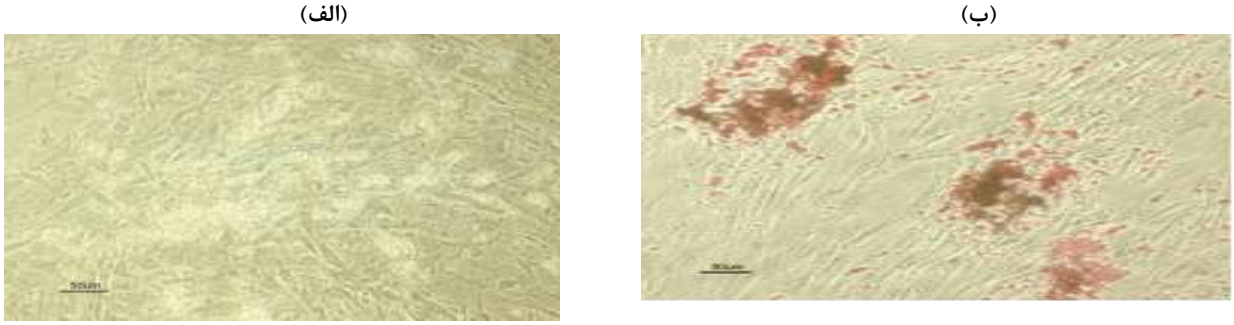
شکل ۲. سلول‌های بنیادی چربی انسانی بررسی‌شده با فلو سایتومتری
بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها به نشانگرهای CD44، CD73، CD90 و CD105 پاسخ مثبت دادند. منحنی سفیدرنگ مربوط به کنترل ایزوتوپ است که سلول‌ها با آنتی‌بادی شاخصی غیر از شاخص مورد مطالعه در این تحقیق مارک‌دار شدند. منحنی سیاه‌رنگ سلول‌های مورد مطالعه هستند که با آنتی‌بادی کونژوگه با FITC و PE نشان‌دار شدند و کمتر از ۲/۵ درصد سلول‌ها به نشانگرهای CD45 و CD34 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، به‌تدریج 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 هفتهٔ اول آغاز و با گذشت زمان تعداد آن‌ها بیشتر می‌شود؛ به‌طوری که پس از ۱۰ روز در تمام سیتوپلاسم برخی از سلول‌ها وزیکول‌های چربی انباشته شده بود و پس از ۲۱ روز با رنگ آمیزی اویل رد مشاهده شد. قرمز شدن سیتوپلاسم سلول‌ها، ویژگی ادیپوسیتی آن‌ها را تأیید کرد (شکل A.۳، B و C). به منظور تمایز HASCs به سلول‌های استخوانی، سلول‌ها در معرض محیط استخوان‌ساز قرار گرفتند. به‌تدریج تغییرات مورفولوژیکی و تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج‌سلولی معدنی پدیدار شد. پس از ۲۱ روز، ماتریکس خارج‌سلولی معدنی با آلیزارین رد رنگ‌آمیزی شد (شکل A.۴ و B).



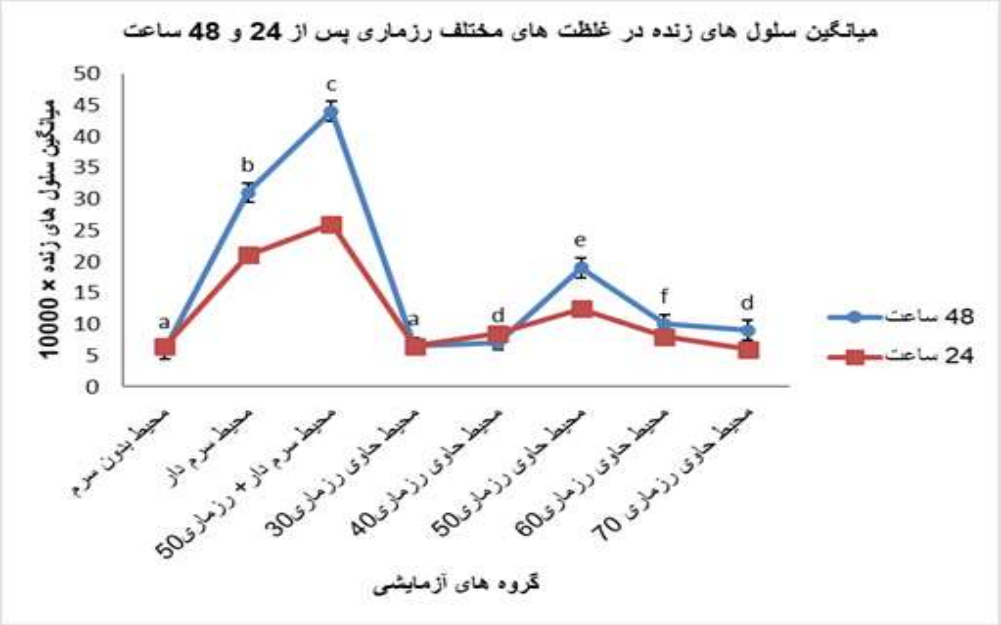
شکل ۳. سلول‌های بنیادی چربی انسانی تمایزیافته به ادیپوست و استئوسیت در محیط کشت خاص
A: سلول‌های تمایزیافته قبل از رنگ‌آمیزی با اویل رد که در آن‌ها گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم ادیپوست‌ها قابل مشاهده هستند و می‌توان این سلول‌ها را از سلول‌های تمایزنایافته تشخیص داد. B: سلول‌های تمایزیافته پس از رنگ‌آمیزی که در آن‌ها گرانول‌های چربی به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند. C: همین سلول‌ها در بزرگ‌نمایی ×۴۰.



شکل ۴. A: سلول‌های تمایزیافته قبل از رنگ‌آمیزی با آلیزارین رد. B: سلول‌های تمایزیافته پس از رنگ‌آمیزی که در آن‌ها رسوب تیغه‌های استخوانی در فضاهای بین‌سلولی مشاهده می‌شود.

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 عصارهٔ رزماری قرار گرفتند، افزایش معناداری را در مقایسه با گروه مشابه در ۲۴ ساعت نشان داد. بنابراین به‌منظور بررسی تعداد سلول‌های زنده، زمان ۴۸ ساعت انتخاب شد. در گروه‌های ۴۸ساعته، تعداد سلول‌های زنده که با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ رزماری به مدت ۴۸ ساعت القا شده بودند، در مقایسه با سلول‌هایی که با غلظت‌های دیگر رزماری القا شده بودند، افزایش معناداری را نشان دادند. افزایش معنادار در تعداد سلول‌های زندهٔ 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؛ به‌طوری که گروه مذکور در مقایسه با گروه محیط سرم‌دار افزایش معناداری را نشان داد (شکل ۵).



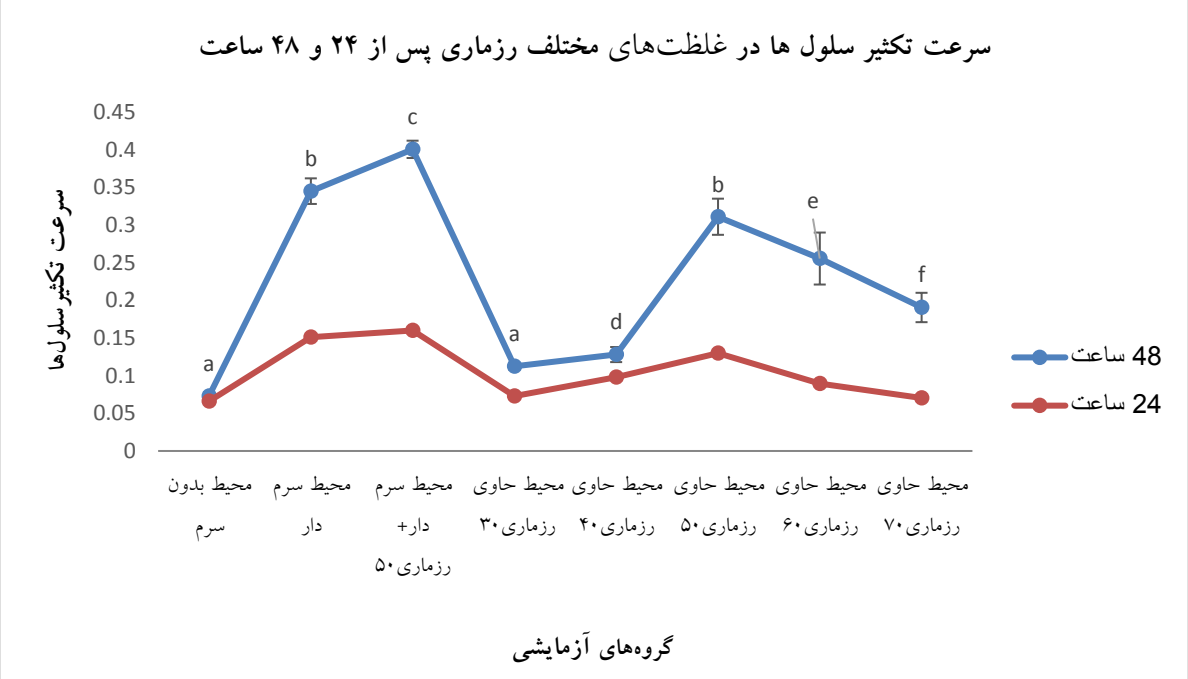
شکل ۵. بررسی درصد سلول‌های زنده با روش هموسایتومتری در سلول‌های بنیادی چربی انسانی تیمارشده با عصارهٔ رزماری با غلظت‌های مختلف به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت

Medium: سلول‌های کشت‌شده در محیط بدون سرم. **Medium+fbs**: سلول‌های کشت‌شده در محیط سرم‌دار. **RE50+fbs** : سلول‌های کشت‌شده در محیط سرم‌دار و حاوی رزماری با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر. **RE30-RE70**: سلول‌های کشت‌شده در غلظت‌های مختلف۳۰ تا ۷۰ میکروگرم بر میکرولیتر رزماری (حروف غیرهمنام نشان‌دهندهٔ معنادار بودن و حروف همنام نمودار معنادار نبودن بین گروه هاست).

۳،۵. سرعت تکثیر سلول‌های HASCs پس از القا با غلظت‌های مختلف رزماری

سلول‌هایی که در معرض عصارهٔ رزماری با دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفته بودند، نسبت به سلول‌هایی که مدت زمان القا در آن‌ها ۲۴ ساعت بود، سرعت تکثیر بیشتری را نشان دادند. بنابراین زمان ۴۸ ساعت برای تست MTT درنظر گرفته شد. افزایش معنادار میزان OD در سلول‌های HASCs کشت‌شده در محیط حاوی عصارهٔ رزماری با غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با سلول‌های کشت‌شده در محیط فاقد سرم مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ سرعت تکثیر بالای سلول‌ها در غلظت‌های مذکور بود. ولی این افزایش در میزان OD در سلول‌های کشت‌شده در عصارهٔ رزماری با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با سلول‌های کشت‌شده در محیط فاقد سرم معنادار نبود. بنابراین سه دوز مذکور توانسته بود سرعت تکثیر را افزایش دهد. سلول‌هایی 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 گروه‌های رزماری با غلظت ۵۰ و محیط سرم‌دار اختلاف معناداری مشاهده نشد؛ درحالی که گروه سرم‌دار + رزماری ۵۰ افزایش معناداری را در مقایسه با گروه محیط سرم‌دار نشان داد.

از سوی دیگر نیز سلول‌های کشت‌شده در محیط حاوی غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۷۰ رزماری به مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول‌های کشت‌شده 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).



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

Medium: سلول‌های کشت‌شده در محیط بدون سرم. Medium+fbs: سلول‌های کشت‌شده در محیط سرم‌دار. RE50+fbs: سلول‌های کشت شده در محیط سرم‌دار و حاوی رزماری با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. RE30-RE70: سلول‌های کشت‌شده در غلظت‌های مختلف۳۰ تا ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری (حروف غیرهمنام نشان‌دهندهٔ معنادار بودن و حروف همنام نشانگر معنادار نبودن بین گروه‌هاست).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی بافت چربی به‌دلیل استخراج آسان و کشت و تکثیر ساده‌تر در محیط آزمایشگاه و خواص ایمونومدولاتوری بهتر، کاندید مناسبی برای سلول‌درمانی هستند. [۱۱ـ۱۲] در این تحقیق، از پاساژ چهارم ASCs استفاده شد. به این دلیل از سلول‌های پاساژ پایین‌تر 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 کم‌کم خاصیت بنیادی بودن خود مانند چندتوان بودن و خودتکثیری را ازدست 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 به‌کار 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 ویژهٔ سلول‌های مزانشیمی، مثبت بوده و توانایی بیان نشانگر سلول‌های هماتوپویئتیک را ندارند که مطابق با یافته‌های زوک است. [۵، ۱۴] نتایج آنالیزهای عملکردی سلول‌های استخراج‌شده در این مطالعه نشان‌دهندهٔ توان تمایزی چندگانهٔ این سلول‌ها به سلول های مزانشیمی بوده است. ASCs به سلول‌های ردهٔ 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 به‌وسیلهٔ روش رنگ‌آمیزی اویل رد و آلیزارین رد اثبات گردید.

براساس تحقیقات انجام‌شده، MSC جداشده از بافت چربی از نظر ریخت‌شناسی و بیان نشانگرهای سطحی شباهت زیادی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان دارند و درعین حال پتانسیل پاساژپذیری و تزاید بالاتری نسبت به این سلول‌ها را از خود نشان می‌دهند. [۱۷ـ۱۸] پس از اطمینان کامل از بنیادی بودن سلول‌ها، تأثیر دوزهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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

۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ رزماری قرار گرفته بودند، بیشترین درصد زنده بودن را نشان دادند.

آنتی‌اکسیدانت‌ها گروهی از ویتامین‌ها، مواد معدنی، آنزیم‌ها، عصاره‌های گیاهی و مواد مصنوعی هستند. برای بهبود ظرفیت تکوینی محیط کشت سلول‌های بنیادی و جلوگیری از پیری سلول و داشتن سلول‌هایی با کیفیت بالا، باید از آنتی‌اکسیدانت‌ها استفاده کرد. آنتی‌اکسیدانت‌ها با ممانعت از تغییر رشد سلول و خطر ابتلا به سرطان، از سلول‌های بنیادی درمقابل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند و سبب افزایش طول عمر آن‌ها می‌شوند. بین منابع گیاهی به رزماری، از تیرهٔ نعناع، توجه زیادی معطوف شده است. تاکنون ترکیبات بسیار زیادی از رزماری استخراج شده که بسیاری از آن‌ها دارای خواص آنتی اکسیدانتی، ضدالتهابی، ضدتوموری و غیره است. [۱۹ـ۲۰] فعالیت آنتی‌اکسیدانتی رزماری به ترکیبات کارنوسیک اسید، کارنوسول و اسید رزمارنیک آن نسبت داده می‌شود. کارنوسیک اسید به‌وفور در برگ‌های رزماری یافت می‌شود. [۲۱ـ۲۲] کارنوسیک اسید یک کاتکول طبیعی نوعی پلی‌فنولیک دیترپن است که در گیاه رزماری وجود دارد و یک فعالیت فارماکولوژیکی و بیولوژیکی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی دارد. [۲۳ـ۲۴]

بنابراین رزماری با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانسته بود همانند سرم سرعت تکثیر سلول‌ها را در مقایسه با گروه محیط فاقد سرم، به‌طور معناداری افزایش دهد. از طرفی نیز سلول‌هایی که در محیط حاوی غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری به مدت ۴۸ ساعت کشت شده بودند در مقایسه با سلول‌های کشت‌شده در محیط حاوی سرم و رزماری، کاهش معناداری را در OD نشان دادند؛ درحالی که اختلاف معناداری در سلول‌های گروه رزماری با غلظت ۵۰ 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 عصارهٔ رزماری به‌همراه سرم در محیط کشت، تعداد سلول‌های زنده را در محیط کشت آزمایشگاهی به میزان بسیاری افزایش داد. از این جهت عصارهٔ رزماری کاندید مناسبی برای افزایش تعداد سلول‌های زنده و به‌دست 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 رشتهٔ بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، از دانشگاه دامغان است. بدین وسیله از دانشکدهٔ زیست‌شناسی و پژوهشکدهٔ علوم زیستی دانشگاه دامغان برای پرداخت هزینهٔ 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 J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 2007; 105: 940-9.
[3]. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Ćebović 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 JI, 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, Shatara 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, Drewa 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]. Hosseinpur Z, Hashemi SM, Salehi E, Ghazanfari T. Comparison of TGF-β1 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[1], Maryam Haji Ghasem Kashani[2*], Mohammad Taghi Ghorbanian[2]

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 Damgan Hospital. After mechanical and enzymatic digestion, extracted cells were cultured in α–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 µg/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 CD45markers and differentiated into adipocytes and osteocytes. The proliferation rate and survival of cells treated with Rosemary at a concentration of 50 µg/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.