مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طبّ مکمّل، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴

اثر عصاره‌ی آبی زعفران و نانوذره‌ی بیوژنیک طلا بر تمایز استئوژنیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی نر نژاد ویستار

جواد بهارآرا [۱*]، صفا مشتاق [۲]، طیبه رمضانی [۳]

۱. دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.
۲. دانشجوی دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۳. دانشجوی دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۰۱

چکیده

مقدمه: زعفران دارای اثرات فارماکولوژیک متعدد است و نانوذرات طلا نیز در عملکرد و تمایز سلولی نقش دارند. در این مطالعه اثرات عصاره‌ی زعفران و نانوذره‌ی طلای سنتز شده با استفاده از برگ آویشن شیرازی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان موش صحرایی به استئوبلاست مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار جمع‌آوری و شناسایی شدند. سپس با روش فلوسایتومتری این سلول ها شناسایی شدند. سمّیت نانوذرات طلا و عصاره‌ی زعفران با روش MTT (نمک تترازولیوم برماید) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها به گروه‌های تجربی تیمار با زعفران (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، نانوذره‌ی طلا (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و تیمار توأم با نانوذره‌ی طلا و زعفران (به ترتیب ۴۰۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تقسیم شدند. اثرات تمایزی با رنگ آلیزارین قرمز پس از ۲۱ روز و فعّالیت آل‌کالین فسفاتاز پس از ۱۴ روز بررسی گردید.

یافته‌ها: بررسی مارکرهای سطحی با روش فلوسایتومتری، بنیادی بودن سلول‌ها را تأیید کرد. مطابق نتایج حاصل از آزمون MTT (p=۰/۶) غلظت‌های هم‌افزایی اثری بر زیست‌پذیری سلول‌ها نداشتند. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز نشان داد عصاره‌ی آبی زعفران و نانوذره‌ی طلا منجر به افزایش تمایز استئوژنیکی این سلول‌ها می‌شود. این اثرات در گروه هم‌افزایی بیشتر بود. فعّالیت آل‌کالین فسفاتاز در گروه‌های هم‌افزایی در مقایسه با کاربرد هر یک به تنهایی افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، استفاده‌ی توأم از عصاره‌ی آبی زعفران و نانوذره‌ی طلا تمایز استخوانی را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زعفران، نانوذره‌ی طلا، استئوبلاست.

*نویسنده مسئول: E.mail: Baharara78@gmail.com

مقدمه

زعفران که با نام علمی «کورکوس ساتیووس[1]» شناخته می‌شود نوعی گیاه بوته‌ای است که کاربردهای دارویی متنوعی را دارد و به‌عنوان ادویه در صنایع دارویی به کار می‌رود. در کلاله‌های رنگی زعفران حدود ۱۵۰ نوع ترکیب فعّال و غیر فعّال وجود دارد که مهم‌ترین ترکیبات فعّال بیولوژیکی آن شامل کروسین، پیکروکروسین، کاروتنووئید، سافرانال و ویتامین‌ها می‌باشد (۱). تحقیقات در زمینه‌های طبّ مدرن نشان داده است که عصاره‌ی تام و مواد تشکیل‌دهنده‌ی این گیاه به‌صورت خالص خواص ضد توموری و ضد التهابی دارند. همچنین این گیاه برای درمان آترواسکروزیس و آسیب‌های کبدی اهمّیت دارد (۲).

امروزه استفاده از نانوتکنولوژی در زمینه‌های پزشکی افزایش یافته است (۳). نانوذرات طلا در پزشکی کاربردهای زیادی دارند؛ این نانوذرات سمّیت اندکی بر سلول‌ها دارند (۴). روش‌های شیمیایی سنتز نانوذرات طلا شامل استفاده از حلّال‌های سمّی، مصرف انرژی بالا و همچنین تولید محصولات است که برای محیط زیست و سلامت انسان خطر دارند. از سویی دیگر هزینه‌های بالایی برای تولید شکل محدود از نانوذرات باید صرف گردد که تا حد زیادی خواص و کاربردهای بالقوه‌ی آن‌ها را کاهش می‌دهد. نیاز فوری برای طراحی و توسعه‌ی سایر روش‌هایی که همه‌ی عوامل ذکرشده در بالا را از بین ببرد احساس می‌شود. به نظر می‌رسد روش‌های سنتز سبز برای بیوسنتز نانوذرات فلزی در حال حاضر راه حل قسمت عمده‌ی این مشکلات می‌باشد (۵). آویشن شیرازی گیاه بومی ایران و افغانستان از خانواده‌ی نعناعیان[2] است. نعناعیان انواع ترکیبات ترپنوئیدی و آروماتیک را تولید می‌کنند که به‌طور عمده در برگ‌های آن‌ها ذخیره می‌شوند (۶). ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده‌ی بخش‌های هوایی این گیاه شامل پاراسمین، گاما ترپینن، کارواکرول و تیمول است؛ همچنین تیمول ترکیب عمده‌ی موجود در آویشن است. این موارد دارای گروه‌های عاملی فعّال می‌باشند که می‌توانند در بیوسنتز نانوذرات نقش مهمی را ایفا کنند (۷).

در این تحقیق تجربی از برگ‌های گیاهی آویشن شیرازی برای سنتز نانوذره‌ی طلا استفاده شد. تاکنون اثرات نانوذرات طلای سنتز شده با روش‌های زیستی بر تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به ضرورت شناسایی عوامل مؤثر در القای تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های بافت استخوانی برای اهداف درمانی نظیر پوکی استخوان، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تمایزی عصاره‌ی زعفران و نانوذره‌ی طلا به‌صورت هم‌افزایی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

روش تحقیق:

این مطالعه از نوع تجربی – آزمایشگاهی بود که در سال ۹۳ در مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد.

تهیه‌ی نانوذره‌ی طلا به روش سبز:

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ی گیاهی آویشن شیرازی:

اندام‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی[3] از منطقه‌ی طرقبه‌ی مشهد در فصل بهار جمع‌آوری و در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد با کد هرباریومی ۳۵۳۱۴ شناسایی گردید. سپس برگ‌های گیاه از سایر قسمت‌ها جدا و دو بار با آب مقطر دو بار تقطیر شست‌وشو داده شد و در دمای اتاق به مدت ۷ روز خشک گردید.

عصاره‌گیری:

۵ گرم از پودر تهیه‌شده از برگ‌های گیاه آویشن با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار استریل مخلوط شد و روی هات پلیت قرار گرفت تا بجوشد. ۵ دقیقه بعد از جوش، مخلوط از روی هات پلیت برداشته شد و با کاغذ صافی واتمن شماره‌ی ۱ صاف گردید؛ سپس عصاره‌ی حاصل در دمای ۴ درجه برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

تهیه‌ی محلول کلرواوریک:

[1] Crocus sativus L
[2] Lamiaceae
[3] Zataria multiflora

پودر تتراکلرید طلا چهار آبه تهیه شد و در آب مقطر دو بار تقطیر حل گشت. سپس محلول حاصل، دور از نور و در یخچال برای استفاده‌های بعدی نگهداری گردید.

سنتز نانوذرات طلا

برای تهیه‌ی نانوذرات ابتدا تمام ظروف با تیزاب سلطانی شست‌وشو داده شد، سپس عصاره‌ی گیاهی و محلول کلراید طلا برای سنتز نانو ذرات طلا با یکدیگر مخلوط شدند.

تهیه‌ی عصاره‌ی آبی زعفران:

کلاله‌ی خشک زعفران به‌صورت تجاری تهیه گردید. ۳ گرم از کلاله‌های خشک زعفران کاملاً ساییده شد و عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسیله و آب مقطر انجام گردید؛ در نهایت برای خشک‌کردن عصاره‌ی زعفران از دستگاه انجماد در خلأ استفاده گردید. برای تهیه‌ی غلظت‌های مورد نیاز، پودر حاصل از عصاره‌گیری کلاله‌های زعفران توزین و در محیط کشت DMEM[1] (Merck, German) حل شد.

نگهداری و آماده نمودن حیوانات آزمایشگاهی:

در این تحقیق از رت‌های نر نژاد ویستار که از مرکز پژوهشی خوارزمی مشهد تهیه شده بودند استفاده گردید. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی در «مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی» دانشگاه آزاد اسلامی و پژوهشکده‌ی خوارزمی تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه‌ی حرارت ۲±۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند و آب و غذای کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. موش‌ها با وزن ۱۸۰-۱۲۰ گرم برای استخراج مغز استخوان از ران و ساق پا مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج و تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت

رت‌های نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۵۰ گرم ابتدا با کلروفرم بی‌هوش و سپس به‌وسیله‌ی الکل ۷۰٪ ضدعفونی شدند و در شرایط کاملاً استریل استخوان‌های ران و درشت‌نی آن‌ها جدا گردید. مغز استخوان از داخل کانال استخوان به کمک یک سرنگ و سرسوزن شماره‌ی ۲۲ که با محیط DMEM پر شده بود با روش فلاشینگ[2] تخلیه گردید. مغز استخوان به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰، سانتریفیوژ (Sigma, USA) شد تا پلیت سلولی تشکیل شود. سپس محیط رویی تخلیه شد و به پلیت سلولی ۲ میلی‌لیتر محیط تازه DMEM حاوی ۱۵٪ FBS[3] و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین اضافه گشت. سلول‌های حاصل کشت داده شدند و فلاسک به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ درصد CO2 منتقل گردید. محیط سلول‌ها هر ۳ روز یک‌بار به مدت دو هفته تعویض شد. سلول‌های مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی خود به کف فلاسک می‌چسبند اما سایر سلول‌ها ازجمله سلول‌های خون‌ساز چون توانایی چسبیدن ندارند با تعویض محیط خارج می‌شوند. پاساژ سلولی بعد از یک هفته صورت گرفت و بعد از پاساژ چهار، سلول‌ها کاملاً خالص شده و برای تیمار آماده بودند.

شناسایی سلول‌های بنیادی با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه مارکرهای سطحی سلولی CD45,CD44 و CD31 و روش فلوسایتومتری:

جهت تعیین بنیادی‌بودن سلول‌ها، فلوسایتومتری با نشان‌گر CD45,CD44 و CD31 (Germany) انجام شد. بدین منظور سلول‌های چسبنده به کف فلاسک به‌وسیله‌ی تریپسین جدا شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. سپس محیط رویی تخلیه و PBS[4] اضافه شد. بعد از آن در اپندورف ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعد فرمالین ۴٪ به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال قرار گرفت. آنتی‌بادی اولیه‌ی رقیق‌شده در BSA/PBS[5] ۳٪ اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۱۰

[1] Dulbecco's Modified Eagle's medium

[2] Flashing
[3] Fetal bovin serum
[4] Phosphate buffered salin
[5] Bovine serum albumin

ساعت در یخچال قرار گرفت. پس از شست‌وشو با PBS، آنتی‌بادی ثانویه (فلورسنس ایزوتیوسیانات ایمنوگلوبین G FITC[1])رقیق شده در BSA/PBS ۳٪ اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفتند، سپس سانتریفیوژ انجام شد و سلول ها با فرمالین ۱ درصد فیکس و با دستگاه فلوسایتومتری (FACS) آنالیز شدند.

سنجش میزان سمّیت عصاره‌ی آبی زعفران و سمّیت نانوذرات طلا:

برای سنجش میزان سمّیت عصاره‌ی آبی زعفران و نانوذرات طلا بر سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده ی مغز استخوان از نمک تترازولیوم بروماید[2] استفاده شد. در مرحله‌ی اول تعداد ۱۰۵ سلول در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی کلاله‌ی زعفران و غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طلا تیمار شدند. پس از سپری شدن زمان مورد نظر به هر خانه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت دور از نور انکوبه شدند. در نهایت محیط رویی خارج گردید و به سلول‌های ۱۰۰ میکرولیتر DMSO[3] اضافه شد، جذب محلول رنگی در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتوفتومتر (Epoch, USA) اندازه‌گیری شد. سپس درصد بقای سلول‌ها در مقایسه با کنترل و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد بقاء سلولی = $(A_{treated} / A_{control}) \times 100$

$A_{treated}$ و $A_{control}$ به ترتیب جذب سلول‌های تیمارشده و نمونه کنترل می باشد

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی همراه با نانوذره‌ی طلا و زعفران:

برای القای تمایز در سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان از غلظت‌های پایین‌تر از دوز کشنده استفاده گردید. به‌طور خلاصه سلول‌ها با تعداد 10^3 عدد در پلیت-های ۱۲ خانه کشت داده شدند. سپس نمونه‌های درون پلیت به سه گروه تجربی و یک گروه کنترل تقسیم شدند. گروه کنترل هیچ تیماری را دریافت نکردند. گروه تجربی ۱ فقط عصاره‌ی زعفران را با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت ۲۴ ساعت دریافت کردند و به مدت ۲ هفته تیمار شدند. گروه تجربی ۲ به‌وسیله‌ی نانوذره‌ی طلا به غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۴ و ۲۱ روز تیمار شدند. گروه تجربی ۳ به‌صورت هم‌افزایی عصاره‌ی زعفران و طلا را به ترتیب با غلظت‌های ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره دریافت کرده بودند. تغییرات این سلول‌ها با دقت به‌طور روزانه با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد (INV3, Italyt) تحت نظر گرفته شد.

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز:

تک‌لایه سلولی‌های تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران به مدت ۲۱ روز با PBS شسته و به مدت ۱۰ دقیقه با متانول خالص (Sigma, USA)فیکس شدند و سپس رنگ‌آمیزی با محلول رنگی آلیزارین قرمز (Merck; Germany)[4] در زمان ۵ دقیقه صورت گرفت. سپس نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و با میکروسکوپ فاز متضاد ((INV3, Itaiy) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سنجش فعّالیت آل‌کالین فسفاتازی:

سلول‌ها پس از ۱۴ روز با استفاده از PBS سرد از پلیت جدا و به‌وسیله‌ی تریتون X ۱۰۰ لیز شدند و با استفاده از پیپتاژ هموژنایز گردیدند. محلول حاصل با استفاده از کیت سنجش آلکالین فسفاتاز (Pars Azmoon, Iran) با روش رنگ‌سنجی مورد آزمایش قرار گرفت.

مشاهده‌ی نمونه‌ها با میکروسکوپ زمینه تاریک:

برای تعیین توانایی برداشت نانوذرات طلا به‌وسیله‌ی سلول‌ها پس از ۲۱ روز از میکروسکوپ زمینه تاریک (Biomed, Korea)استفاده گردید.

آنالیز آماری:

نتایج با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی 16با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA One-way و آزمون

[1] Fluorescein isothiocyanate
[2] MTT
[3] Dimethyl Sulfoxide
[4] Alizarin red

Tukey سطح معنی‌دار مورد بررسی قرار گرفتند و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell ترسیم شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی نانوذره‌ی طلا با میکروسکوپ الکترونی گذاره:

مشاهدات در این قسمت نشان داد که نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از عصاره‌ی برگ‌های آویشن شیرازی دارای اشکال متنوع ازجمله پنج‌ضلعی، سه‌گوش و برخی اشکال تعریف نشده می‌باشند. در این تصاویر مشخص شد که نانوذرات سنتز شده با آویشن بیشتر به پنج‌وجهی نزدیک هستند (الف). همچنین در تصویر مشخص است که نانوذرات شاخص پراکندگی مناسبی دارند و به‌صورت مجزا قرار گرفته‌اند. نتایج حاصل از آنالیز نانوذرات طلا با DLS[1] نشان داد که محدوده‌ی اندازه‌ی این نانوذرات بین ۱۰۰-۱۰ نانومتر می‌باشد. متوسط اندازه‌ی نانوذرات ۲۰/۵۲ بود (ب، ج و د). نتایج حاصل از بررسی طیف‌سنجی مادون قرمز نشان داد که نانوذرات طلا با عصاره‌ی گیاهی پوشش داده شده‌اند (شکل شماره‌ی ۱).

ارزیابی مرفولوژی سلول‌های تیمارشده:

در کشت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت‌های نژاد ویستار بسیار هتروژن و ناهمگن بودند. در طی تعویض محیط، سلول‌های خون‌ساز – که نچسبیده بودند حذف شدند و در طی پاساژ اول سلولی سلول‌های تمایزیافته‌ی چسبنده با مرفولوژی متفاوت از سلول‌های بنیادی مزانشیمی حذف شدند؛ به‌طوری که در پاساژ دوم، تعدادی از سلول‌های دوکی نسبت به پاساژ اول بیشتر و در طی چهار پاساژ، اغلب سلول‌ها دوکی بودند.

نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی:

تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان برای مارکر سطحی سلول‌های بنیادی CD44 مثبت ارزیابی شد اما برای مارکر خون‌ساز CD45 و مارکر اندوتلیال CD31 منفی ارزیابی شد (شکل شماره‌ی ۲).

نتایج حاصل از آزمون سنجش سمّیت عصاره‌ی زعفران و نانوذره‌ی طلا:

به‌منظور بررسی میزان سمّیت نانوذرات طلا و زعفران و نیز یافتن دوز مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی از تست MTT استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی سیتوتوکسیتی نانوذرات طلا بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان نشان داد که غلظت‌های زیر ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر معنادار بر مهار تکثیر سلول‌ها ندارند در حالی که غلظت‌های بالاتر به‌صورت وابسته به دوز منجر به مهار تکثیر این سلول‌ها می‌گردند و غلظتی که منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها می‌گردد برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بررسی اثرات سیتوکسیتی عصاره‌ی زعفران بر روی سلول‌ها نشان داد غلظتی که منجر به مرگ ۵۰٪ از سلول‌ها گردید برابر ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در این تحقیق غلظت ۴۰۰ برای زعفران انتخاب شد (نمودار شماره‌ی ۱).

نتیجه‌ی حاصل از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز:

بعد از مدت ۱۴ و ۲۱ روز، رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز صورت گرفت. بررسی نتایج رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز نشان داد که عصاره‌ی آبی زعفران و نانوذرات طلای سبز، قادر به ایجاد تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان به سمت استئوبلاست‌ها می‌باشند که این اثر در هم‌افزایی افزایش می‌یابد و با گذشت زمان میزان رسوب‌گذاری و در نتیجه رنگ‌پذیری ماتریکس خارج سلولی نیز بیشتر می‌شود (شکل شماره‌ی ۳).

نتایج حاصل از بررسی فعّالیت آل‌کالین فسفاتاز

نتایج تست آل‌کالین فسفاتاز نشان داد که تیمار با نانوذرات طلا و عصاره‌ی زعفران باعث افزایش فعّالیت آل‌کالین فسفاتازی در سلول‌های تحت تیمار می‌گردد. در هر صورت فعّالیت این آنزیم در گروه‌های تیمار با نانوذرات طلا و عصاره‌ی زعفران نسبت به کاربرد هر یک به‌تنهایی در طی ۱۴ روز بیشتر بود (نمودار شماره‌ی ۲).

[1] Dynamic light scattering

بحث

در این پژوهش تجربی اثر هم‌افزایی عصاره‌ی آبی کلاله‌ی زعفران و نانوذره‌ی طلا بر القای تمایز استئوبلاستی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان رت مورد ارزیابی قرار گرفت.

مغز استخوان حاوی سلول‌های چند توانی می‌باشد که توانایی تمایز به استئوبلاست، آدیپوبلاست، میوسیت و کندروسیت را دارد. این سلول‌ها بیش از ۳۰ در پیوند مغز استخوان کاربرد دارند. مطالعات پیش‌کلینیکی بر حیوانات مدل، شواهدی مبنی بر توانایی این سلول‌ها برای پیوند و ترمیم ارائه نموده است (۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان در دسترس‌ترین منبع برای استفاده از سلول‌های بنیادی می‌باشند؛ گرچه این سلول‌ها از منابع دیگری نیز قابل جداسازی هستند. این سلول‌ها قادرند که در شرایط آزمایشگاهی به انواع دودمان‌های مختلف مزانشیمی همچون سلول‌های چربی، غضروفی، ماهیچه‌ای و غیر مزانشیمی مانند سلول‌های نورونی تمایز یابند (۹). بنابراین با توجه به روش ساده‌ی جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان و قابلیت دسترسی آسان به این سلول‌ها، در این مطالعه از این از سلول‌ها برای القای تمایز استفاده گردید. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های مزانشیمی جدا شده دارای مارکرهای سطحی CD44 و فاقد مارکرهای CD31 و CD45 می‌باشند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان نشان‌گرهایی نظیر CD29, CD106, CD105 CD44را بیان می‌کنند در حالی که مارکرهای CD31 و CD45 را بیان نمی‌کنند (۱۰).

استفاده از گیاهان به‌عنوان منابع پایدار و در دسترس در تهیه‌ی نانوذرات زیست‌سازگار در سال‌های اخیر توجه بسیاری از را به خود جلب کرده است. از مزایای این روش می‌توان به غیر سمّی بودن، زیست‌سازگاری، ارزانی و تولید نانوذرات با خلوص بالا اشاره کرد (۱۱). در سال‌های اخیر، استفاده از عصاره‌ی گیاهان برای تهیه‌ی نانوذرات فلزی به‌عنوان یک جایگزین آسان و مناسب برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است (۱۲). آویشن نوعی گیاه بوته‌ای است که کاربرد فراوانی در طبّ سنّتی دارد و در مشهد نیز به‌صورت خودرو رویش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که بسیاری از گونه‌های آویشن دارای ترکیبات مختلف ازجمله فلاونوئیدها و فنلی‌ها می‌باشند (۱۳). وی[1] و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات تمایزی کاتکین[2] (پلی‌فنول استخراج‌شده از چای سبز) را بر روند تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان انسان به استئوبلاست‌ها بررسی نمودند (۱۴)؛ بنابراین می‌توان عنوان نمود که ازجمله ترکیبات طبیعی که توانایی القای تمایز را در سلول‌های مزانشیمی دارند فنل‌ها می‌باشند که در گیاهان ازجمله آویشن به‌وفور یافت می‌شود و نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما نیز تأییدکننده‌ی همین اثر بود.

به‌علاوه تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که زعفران و ترکیب عمده‌ی آن یعنی سافرانال، قادر به مهار تکثیر و القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت می‌باشد (۱۵). با توجه به این موضوع که نانوذرات طلا و عصاره‌ی زعفران بر طبق تحقیقات قبلی قادر به القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌باشند، در این تحقیق به‌منظور استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی در جهت اهداف درمانی اثر عصاره‌ی آبی کلاله‌ی زعفران به همراه نانوذرات طلا برای مؤثرتر نمودن القای تمایز در BMSCs[3]مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات گروه ما نشان داد که تیمار توأم با عصاره‌ی آبی کلاله‌ی زعفران و نانوذرات طلا قادر به القای تمایز BMSCs به استئوبلاست می‌باشد.

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز بیان‌گر رسوب کلسیم و تأیید تمایز سلول‌های مزانشیمی به سمت استئوبلاست می‌باشد. در این تحقیق تجربی مشاهده گردید که میزان رنگ‌پذیری سلول‌ها با آلیزارین قرمز در گروه‌های تیمار به‌صورت هم‌زمان با نانوذره‌ی طلا و زعفران بیشتر از کاربرد هر یک به‌تنهایی بود. یادآور می‌شود که استفاده از این رنگ می‌تواند تنها روش شناسایی معدنی شدن ماتریکس باشد (۱۶). افزایش فعّالیت آلکالین فسفاتاز به‌عنوان نشان‌گر تمایز استئوژنیک اولیه به کار می‌رود (۱۷). در این راستا نتایج ما نیز افزایش فعّالیت آلکالین فسفاتازی را در گروه تجربی تیمار با عصاره‌ی زعفران و طلا به ترتیب با غلظت ۴۰۰ میکروگرم و ۲۵ بر میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. نانوذرات طلا و زعفران به‌تنهایی نیز منجر به

[1] Wie
[2] catechin
[3] Bone marrow stromal cells

افزایش فعّالیت آل‌کالین فسفاتازی می‌گردد که البته این اثرات در گروه‌های هم‌افزایی بیشتر بودند.

آنگ [1] و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثرات کروسین (یکی از ترکیبات عمده‌ی موجود در کلاله‌ی گیاه زعفران) را بر مهار تکثیر سلول‌های سرطانی روده‌ی بزرگ نشان دادند (۱۸). مهار تکثیر، پیش‌زمینه ورود سلول‌ها به فاز تمایزی می‌باشد. (۱۹). با توجه به این مطالب و سوابق مطالعاتی که ذکر گردید می‌توان استدلال کرد از آنجایی که طبق نتایج حاصل از سنجش قابلیت زنده ماندن سلول‌های تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران، این ماده باعث مهار تکثیر این سلول‌ها می‌شود که می‌تواند مقدمه‌ای برای ورود این سلول‌ها به‌به فاز تمایزی باشد.

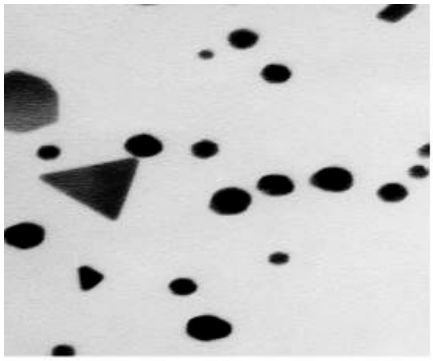
نتیجه‌گیری

در این تحقیق به‌منظور استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی در جهت اهداف درمانی، اثر عصاره‌ی آبی کلاله‌ی زعفران همراه با نانوذره‌ی طلا بر تمایز BMSCs برای القای تمایز مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که اثر توأم عصاره‌ی آبی کلاله‌ی زعفران و طلا قادر به القای تمایز BMSCs به استئوبلاست می‌باشد.

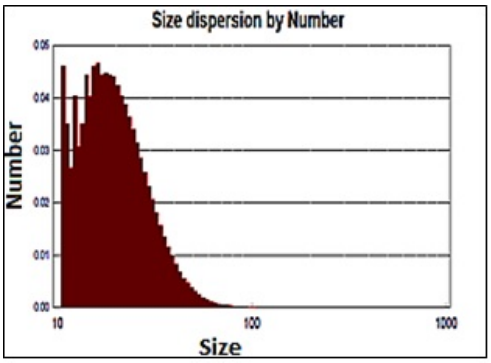
تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات و بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد صمیمانه تشکر می‌شود. در کلیه‌ی مراحل انجام آزمایش‌ها بر روی حیوانات، مقررات کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات با کد کاربری بالینی IRCT ۱۱۳۰۵۱۷۹۱۲۰۲۲ رعایت گردید.

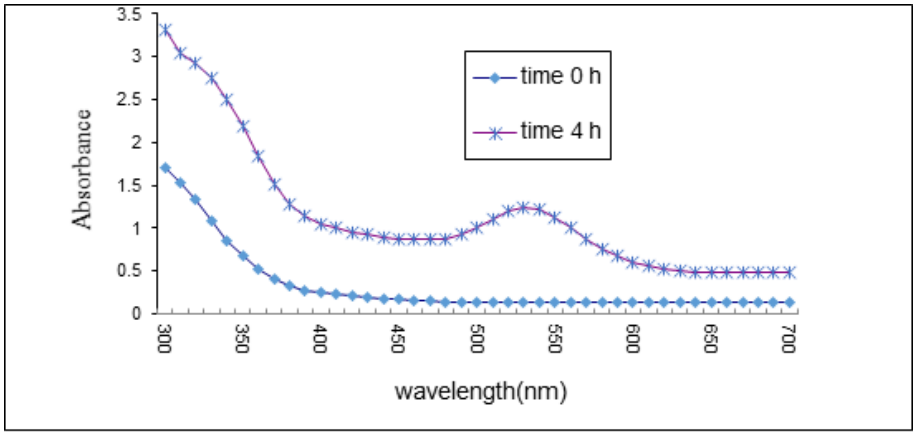
[1] Aung



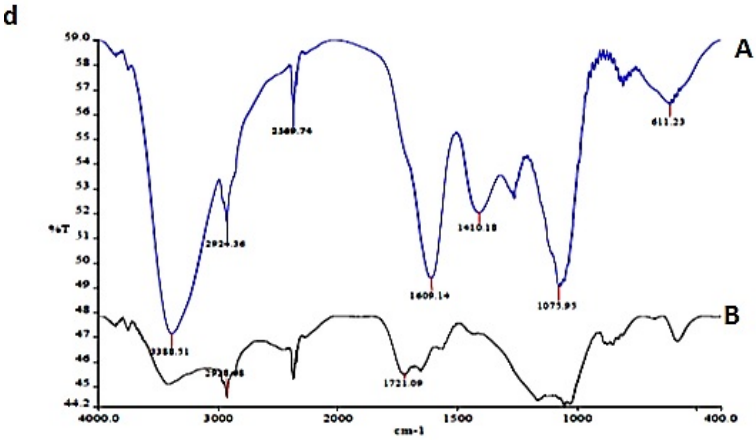
(الف)



(ب)



(ج)



(د)

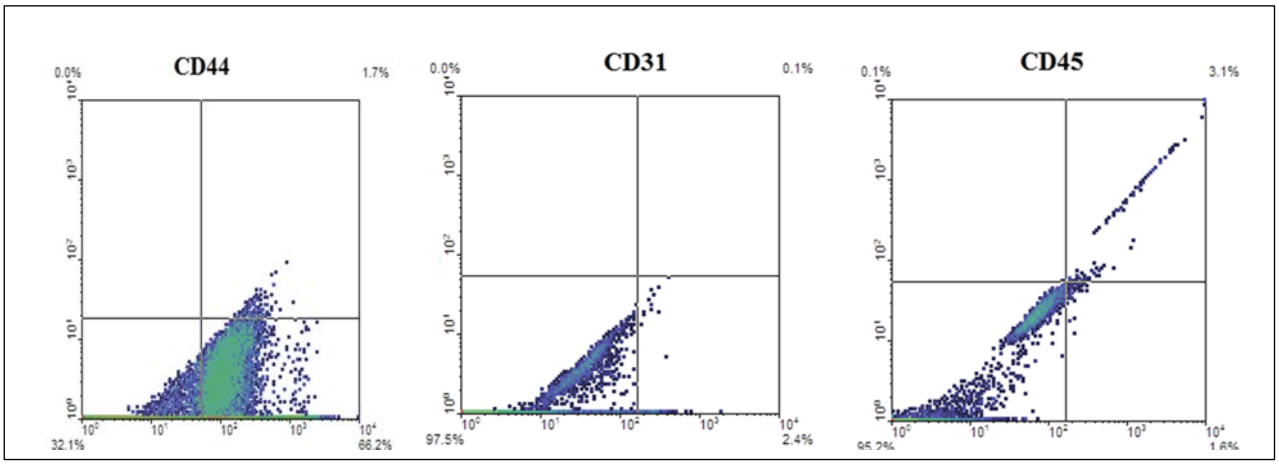
شکل شماره‌ی (۱)

الف: عکس‌های میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات طلای سنتز شده به روش سبز،

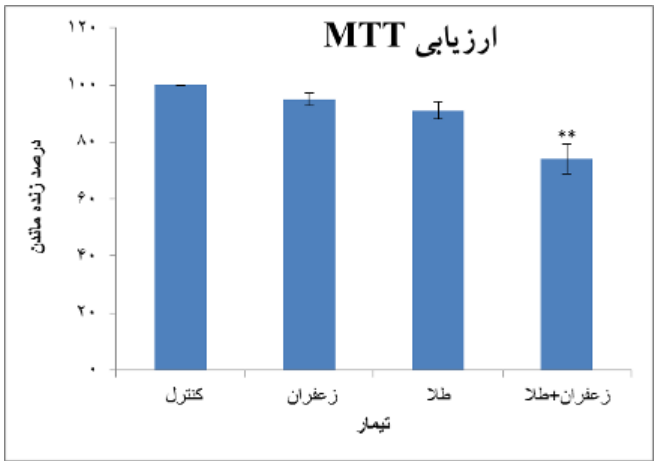
ب: دامنه‌ی پراکنش نانوذرات از نظر سایز آنالیز شده با DLS را نشان می‌دهد،

ج: میزان جذب نوری را برای نمونه‌های نانوذرات سنتز شده در زمان‌های مختلف،

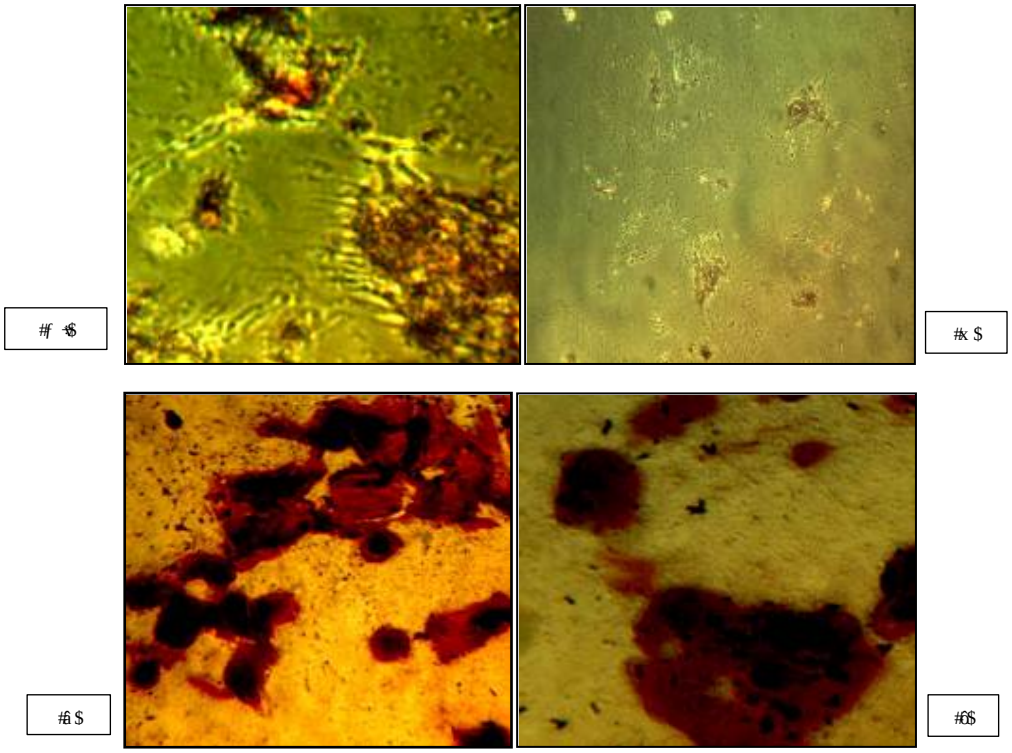
د: نتایج حاصل از نمودار FTIR از عصاره گیاهی (A) و نانوذرات سنتز شده (B).



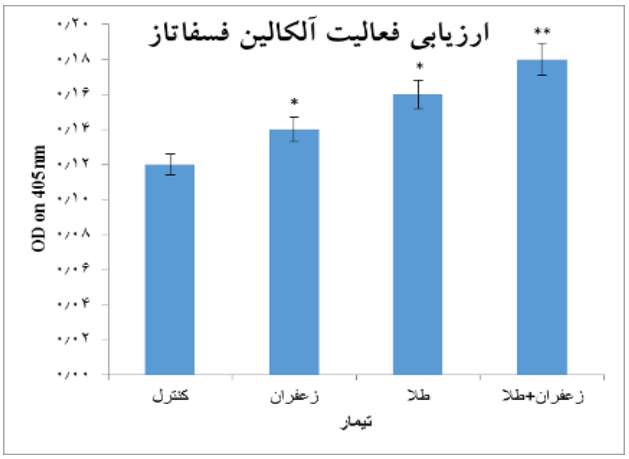
شکل شماره‌ی (۲) نتایج فلوسایتومتری حضور سلول‌های بنیادی را تأیید کرد.



نمودار شماره‌ی ۱: نتایج بررسی اثرات سمّیت غلظت‌های مختلف طلا و عصاره‌ی زعفران سلول‌های بنیادی (Mean±S.D،**p<۰/۰۱). ستون اول گروه کنترل، ستون دوم غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زعفران، ستون سوم غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر طلا و ستون چهارم به ترتیب ۴۰۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر زعفران و طلا.



شکل شماره‌ی (۳) مقایسه‌ی میزان رنگ‌پذیری ماتریکس خارج سلولی با رنگ‌آمیزی با آلیزارین قرمز:
الف: گروه کنترل که سلول‌ها هیچ نوع تیماری دریافت نکرده است،
ب: گروه تیمار با دوز ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی زعفران،
ج: تیمار با دوز ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره‌ی طلا،
د: تیمار توأم با طلا و عصاره‌ی زعفران.



نمودار شماره‌ی (۲)
مقایسه‌ی میزان فعّالیت آل‌کالین فسفاتاز در سلول‌های تیمارشده با عصاره‌ی زعفران (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، طلا (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و تیمار توأم با زعفران و طلا (به ترتیب ۴۰۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با کنترل – که میزان جذب نوری در سلول‌های تیمارشده ی نانوذرات طلا و زعفران، به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است – نشان‌دهنده‌ی میزان فعّالیت آل‌کالین فسفاتازی بیشتر در گروه تیمار توأم در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۱**،Mean±S.D).

References:

1. Pitsikas N, Sakellaridis N. Crocus sativus L. Extracts antagonizememory impairments in different behavioural tasks in the rat. Behavioural brain research. 2006; 173(1): 112-5.
2. Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association. 2008; 46 (11): 3443–3447.
3. Baharara J, Ramezani T, Shahrokhabadi KN, Nazemi M. Effects of Crocus sativus L. extract and vitamin D3 on in vitro osteogenesis of mecenchymal stem cells. International Journal of Cellular & Molecular Biotechnology. 2014; 1:10-13.
4. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? Journal of nanoparticle research. 2010;12(7):2313-33.
5. Riddin T, Gericke M, Whiteley C. Analysis of the inter-and extracellular formation of platinum nanoparticles by Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici using response surface methodology. Nanotechnology. 2006; 17(14):3482-9.
6. Arab R, Ettehad G. Effects of Zataria multiflora Boiss. on common pathogenic gram-positive Cocci and gramnegative Bacilli.Journal of animal and veterinary advances . 2008; 7(6): 695-697.
7. Bashi DS, Mortazavi SA, Rezaei K, Rajaei A, Karimkhani MM. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from yarrow (Achillea beibrestinii) by response surface methodology. 2012; 21(4) : 1005-1011.
8. Kang C, Lee H, Jung ES, Seyedian R, Jo M, Kim J, et al. Saffron (Crocus sativusL.) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms. Food Chem. 2012; 135(4): 2350-8.
9. Baharara J, Ramezani T, Shahrokhabadi KN, Nazemi M. Effects of Crocus sativus L. extract and vitamin D3 on in vitro osteogenesis of mecenchymal stem cells. International Journal of Cellular & Molecular Biotechnology. 2014; 1:10-۱۳.
10. Amani M, Amirizadeh N, Soleimani M, Malekan H, Habibi Roudkenar M, Bashtar M. Effect of growth factors of platelet gel on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells.The Scienific Journal of Iranian Blood Transfusion Organization. 2009; 6(2): 71-83. [Persian].
11. Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and

biocompatible biocompatible. Jornal of Advances in Colloid and Interface Science. 2011; 169: 59–79.
12. Whiteley CG, Govender Y, Riddin T, Gericke M. Bioreduction of platinum salt into nanoparticles: A mechanistic perspective. Biotechnology Letters. 2009; 31(1) 95-100.
13. Sadeghzadeh L, sefedkon f, owlia p: Chemical composition and anti microbial activity of the essential oil of Zataria multiflora. pajouheshmag J. 2006, 71:52-56.
14. Wei Y, Tsai K, Lin L, Lee Y, Chi C, Chang M, et al. Catechin stimulates osteogenesis by enhancing PP2A activity in human mesenchymal stem cells. Osteoporosis international. 2011;22(5):1469-79.
15. Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. The Effect of Saffron Aqueous Extract (Crocus sativus L) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21(2):169-78. [Persian]
16. Lee OK, Kuo KT, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood. 2004; 103(5): 1669-75.
17. Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, et al. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by
1. specific pulsed electromagnetic field stimulation. J Orthop Res 2009;27(9):1169-74.
18. Aung H, Wang C, Ni M, Fishbein A, Mehendale S, Xie J, et al. Crocin from Crocus sativus possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Experimental oncology. 2007;29(3):175.
19. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. J Cell Biochem. 2006; 98(3): 538-54.

Original Article

The effect of Saffron extract and gold nanoparticles on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in Wistar male rat

Baharara J[1*], Moshtagh S[2], Ramezani T[3]

1. PhD in Animal Developmental Biology, Department of Biology and Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. PhD Student in Animal Developmental Biology, Department of Biology, Biological Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. PhD Student in Animal Developmental Biology, Department of Biology, Biological Science faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received: 11 April, 2015؛ Accepted: 23 Auggust, 2015

Abstract

Introduction: Saffron (Crocus Sativus L) has various pharmacological effects. Gold nanoparticle (GNPs) is involved in cell function and differentiation. In this study the osteogenic effects of Saffron extract and biogenic synthesis gold nanoparticles (GNPs) using Shirazi Thyme (Zataria multiflora) leaves was investigated on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs).

Methods: In this experimental study, Wistar rat bone marrow cells were collected and identified. Then these cells were detected by flow cytometry.Cytotoxicity of GNPs and Saffron extract was measured by MTT assay (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Samples were divided to 3 experimental groups and were treated with GNPs (20 µg/ml), Saffron extract (400 µg/ml), and a combination of Saffron extract and GNPs (400 and 20 µg/ml respectively). Differentiation effects were investigated by alizarin red staining after 21 days and alkaline phosphates (ALP) activity after 14 days.

Results: Flow cytometry analysis of surface specific markers confirmed the presence of stem cells. According to the results from MTT assay the concentrations that used for synergic groups had not affected cell viability (p= 0.6). Alizarin red staining showed Saffron extract and GNPs alone increased osteogenic differentiation. This effect on synergic group was higher. Alkaline phosphates activity in the combined Saffron and GNPs group showed a significant increase compared to the other groups.

Conclusion: According to the findings of this study, synergic used of Saffron extract and GNPs effectively enhance BMSCs differentiation.

Key words: Mesenchymal stem cells, Osteoblast, Saffron, Gold nanoparticle.

*Corresponding author: E.mail: Baharara78@gmail .com