افزایش شیب سرعت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از نمونه مغز استخوان انسان در حضور سیلیمارین

حمیدرضا احمدی آشتیانی[۱]، عبدالامیر علامه[۲]*، ندا حمیدی‌پور[۳]، حسین رستگار[٤]، مسعود سلیمانی[٥]

۱- دانشجوی PhD بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

٤- دانشیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و داروی وزارت درمان و آموزش پزشکی، تهران

٥- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تلفن: ۸۸۰۱۳۰۳۰ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۰۰٦٥٤٤ (۰۲۱)

پست الکترونیک: allameha@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۲ **تاریخ تصویب:** ۸۹/۲/۱۵

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از دسته سلول‌های بنیادی غیرخونساز در مغز استخوان می‌باشند. جداسازی راحت و توان تکثیری بالای این سلول‌ها در کنار حفظ توانایی تمایزی آنها به بافت‌های مختلف، این سلول‌ها را به ابزار مناسبی جهت استفاده‌های درمانی تبدیل کرده است. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در زمینه شناسایی ترکیبات مؤثر بر افزایش رشد این سلول‌ها و نگهداری آنها در حالت تمایز نیافته صورت گرفته است. سیلی‌مارین یک آنتی‌اکسیدانی قوی و یک ترکیب ضدالتهابی است و تأثیر مثبت آن بر بقا و رشد تاکنون در رده‌های سلولی مختلفی به اثبات رسیده است.

هدف: هدف این مطالعه، بررسی تکثیر **hBMSCs** در حضور دوزهای **µg/ml** ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ سیلی‌مارین در یک دوره ١٤ روزه و همچین اندازه‌گیری درصد بقای **hBMSCs**، دو روز پس از تیمار سلول‌ها و به دنبال آن یافتن یک الگوی مناسب برای تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سیلی‌مارین به منظور افزایش سرعت تکثیر سلول‌ها بود.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان در پاساژ سوم، با در نظر گرفتن گروه کنترل، به ۱۲ گروه تقسیم و با **µg/ml** ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ سیلی‌مارین به مدت ۲، ۷ و ١٤ روز تیمار شدند. درصد بقا در روز دوم با استفاده از تست تریپان بلو محاسبه و روند رشد با رسم منحنی روز - پاسخ برای دوزهای مشخص شده، بررسی گردید.

نتایج: درصد بقا در گروه‌های تیمار شده با دوزهای **µg/ml** ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ به ترتیب ۸۹، ۹۳ و ۹٦ درصد محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل (۸۳ درصد) افزایش معنی‌داری داشت. با مقایسه‌ی میزان تکثیر **hBMSCs** در روزهای ۲، ۷ و ١٤ با دوزهای ذکر شده‌ی سیلی‌مارین، شاهد افزایش درصد رشد سلول‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل در روزهای دوم تا هفتم و کاهش درصد رشد از روز هفتم تا چهاردهم در حضور سیلی‌مارین در مقایسه با گروه کنترل بودیم.

نتیجه‌گیری: تیمار سلول‌ها با سیلی‌مارین در مدت زمان مشخص، می‌تواند با افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی و همچنین افزایش سرعت رشد، کارایی این سلول‌ها در حیطه بالینی را افزایش دهد.

گل‌واژگان: سیلی‌مارین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان، تکثیر، بقا

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی[1]، سلول‌های بنیادی چندتوانه[2] هستند که از بافت‌هایی چون مغز استخوان، بافت چربی، مایع مفصلی، مایع آمنیوتیک، بند ناف، ماهیچه اسکلتی، دندان‌های شیری[3]، کبد در دوران رویانی و ریه جدا می‌شوند [۱]. این سلول‌ها متفاوت از سلول‌های هماتوپویتیک بوده و پتانسیل تکثیری بالا و توانایی تمایز به سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های استخوان، چربی، عضله، قلب، غضروف، عصبی و سلول‌های کبدی را دارند [۲،۳،٤]. گزارش‌هایی درخصوص استفاده‌ی درمانی از این سلول‌ها در بیماری مقابله پیوند علیه میزبان[4]، احیای بافت قلبی پس از انفارکتوس، ترمیم استخوان و غضروف، بهبود زخم‌های پوستی و عوارض عصبی، بیماری‌های مزمن کبدی، فیبروز ریوی و سرطان موجود می‌باشد [۱،۵،٦،۷]. نتایج کارآزمایی‌های بالینی انجام شده در زمینه سلول‌های بنیادی، نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان مشتق شده‌اند، علاوه بر ایمن بودن، به وسیله سیستم ایمنی بیماران نیز به میزان بالایی پذیرفته می‌شوند [۸]. علی‌رغم تمام مزایای گفته شده، در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان انسان در درمان بیماری‌ها، محققان با یک چالش تکنیکی عمده روبرو هستند و آن نیز محدودیت تعداد سلول‌های بنیادی قابل پیوند است که می‌توان از یک دهنده سلول گرفت. بنابراین برای اینکه بتوان در سلول درمانی به صورت مؤثر از این سلول‌ها استفاده نمود، ابتدا باید در چندین مرحله سلول‌ها را کشت داد تا قبل از تمایز یافتن به تعداد متاسب و کافی برسند [۸].

یکی از رویکردهای تحقیقاتی در سال‌های اخیر، شناسایی موادی است که بدون تحریک تمایز سلولی، قادر به حفظ بقا و افزایش توان تکثیری آنها شوند [۱۱،۹،۱۰]. در همین راستا، ترکیبات گیاهی به عنوان مکمل‌های طبیعی از چند دهه اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند [۵،۱۱،۱۲]. آنها در بررسی‌های خود به این نتیجه رسیده‌اند که مواد فعال گیاهی قادرند نکروز و آپوپتوز ناشی از داروهایی مانند استامینوفن، دوکسوروبیسین، آمیودارین و فروزماید را تغییر دهند [۱]. علاوه بر این، تاثیر گیاهان بر بسیاری از مسیرهای سلولی درگیر در بقا، تکثیر و تمایز به اثبات رسیده است [۱٦ – ۱۲]. در میان هزاران ماده مؤثره گیاهی شناسایی شده، تنها تعداد اندکی در سال‌های اخیر به کارآزمایی‌های بالینی سلول‌های بنیادی وارد شده‌اند مانند کورکومین، عصاره پروآنتی‌سیانیدین دانه‌های گندم، کوئرسیتین و سیلی‌مارین [۱].

سیلی‌مارین ترکیب فلاونوییدی پلی‌فنلی مشتق شده از گیاه خارمریم می‌باشد. این ترکیب یک آنتی‌اکسیدان قوی، ضدالتهاب و ضدسرطان بوده و به عنوان یک داروی شناخته شده و مؤثر در درمان بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۷]. همچنین دیده شده است که سیلی‌مارین اثرات تحریک‌کننده مؤثری بر سرعت تکثیر پروتئین، DNA و فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در محیط کشت دارد [۱۷]. در مطالعاتی که در زمینه اثرات سیلی‌مارین بر روند رشد و تکثیر رده‌های مختلف سلولی انجام شده است، مشاهده کرده‌اند که اثرات این ترکیب و همچنین مسیرهایی که از آن طریق اثرات خود را اعمال می‌کنند در رده‌های سلولی مختلف متفاوت است و همچنین رفتار این ترکیبات در سلول‌های سالم و سرطانی یکسان نیست [۲۳ – ۱۹، ۱۷].

ژونگ[1] و همکارانش (۲۰۰٦) در بررسی اثر سیلی‌مارین بر سلول‌های لوسمی انسانی به این نتیجه رسیدند که این فلاونویید با غیرفعال کردن مسیر انتقال پیام Akt (پروتئین کیناز B) منجر به فعال شدن آبشار کاسپاز و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود [۲۲] در حالی‌که لی[2] و همکارانش (۲۰۰٦) نیز در بررسی‌های خود به این نتیجه رسیدند که سیلی‌مارین با واسطه فعال‌سازی Akt و اعضای خانواده MAP کیناز از آپوپتوز القا شده به وسیله UV در سلول‌های ملانومای بدخیم انسانی (A375-S2 cells) جلوگیری می‌کند [۱۹].

[1] Mesenchymal stem cell (MSCs)
[2] Multi-potent
[3] Deciduous teeth
[4] Graft-versus-host disease (GVHD)

[1] Zhonga [2] Li

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

با در نظر گرفتن اثرات گزارش شده سیلی‌مارین بر مسیرهای مؤثر در تکثیر سلول‌های بنیادی، احتمال می‌رود که سیلی‌مارین بتواند به عنوان یک ماده مؤثره گیاهی، بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی را تحت تاثیر قرار دهد. لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات دوزهای مختلف سیلی‌مارین بر بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در یک دوره ۱٤ روزه، بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از بیمارستان شریعتی تهیه شد و به منظور اطمینان از نوع سلول آزمون‌های زیر انجام شدند:

ایمنوفنوتایپینگ: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان، ۳۳ – ۱٤ روز پس از کشت تریپسینه شده و پس از شمارش سلول‌ها، تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در لوله‌های فالکون ریخته و با دور rpm ۱۰۰۰ در دمای اتاق سانترفیوژ شدند. پس از جدا کردن مایع رویی، پلاک سلولی حاصل در سرم انسانی حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سانترفیوژ مجدد با دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، مجدداً پلاک سلولی تشکیل شده با ۳ درصد آلبومین سرم انسانی محلول در PBS شسته شده و با آنتی‌بادی‌های ضدانسانی موشی کنژوگه با فلورسنت ایزوتیوسیانات، CD44 (H-CAM)، CD13، CD105، CD34 و آنتی‌بادی‌های کنژوگه با فیکواریترین (PE)، CD166 (ALCAM)، CD45 (آنتی‌ژن مشترک لکوسیتی) به مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مرحله سلول‌ها دوبار با PBS شسته شده و به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شدند. سپس پلاک سلولی حاصل با ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS مخلوط شده و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Coulter Epics-XL) بررسی شدند.

تمایز hBMSCs به سلول‌های چربی و استخوان: به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی سلول‌های موردبررسی در این مطالعه از خاصیت تمایز به سلول‌های چربی و استخوانی استفاده شد. برای اثبات تمایز به سلول‌های استخوانی از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و برای اثبات تمایز به چربی از رنگ‌آمیزی اویل رد استفاده شد.

کشت سلولی: در این مطالعه، تمام مراحل کشت سلول و تیمار آن در شرایط استریل انجام شد. hBMSCs، پس از تأیید به روش‌های گفته شده، در فلاسک‌های T-75 در محیط کشت حاوی DMEM، تکمیل شده با ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ units/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (pH= ۷ – ۷/۲) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوادهی ۱۰ درصد $CO_۲$ و ۹۰ درصد هوا، کشت داده شدند [۲٤]. سلول‌ها پس از سه پاساژ به واسطه تریپسینه شدن (سیگما) جدا و پس از شمارش، تعداد ۵×۱۰^{٤} سلول به هر حفره در پلیت‌های ٦ حفره منتقل شد. مجدداً محیط کشت تازه در اختیار سلول‌ها قرار گرفت و به مدت ۲٤ ساعت به آنها زمان داده شد تا به پلیت متصل شوند [۲٤]. در ادامه، با توجه به تعداد دوزها (µg/ml ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰) و روزهای بررسی (۲، ۷ و ۱٤روز) و همچنین در نظر گرفتن یک گروه کنترل برای هر یک از تیمارها، سلول‌ها به ۱۲ گروه تقسیم شدند، برای هر گروه سه حفره در نظر گرفته شد و ردیف‌های پلیت به طور یک در میان خالی گذاشته شدند.

تهیه محلول سیلی‌مارین و تیمار سلول‌ها: مقدار ۱ گرم پودر سیلی‌مارین (سیگما) در دمای اتاق، به دور از نور و به تدریج در ۵ میلی‌لیتر اتانول (مرک) حل و به این ترتیب محلولی از سیلی‌مارین با غلظت ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. برای تأمین غلظت‌های µg/ml ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ (به ترتیب معادل µM۱۰۳، ۱۵۵ و ۲۰۷) به ترتیب به حفره‌های مربوطه µl ۱/۲۵۰، ۱/۸۷۵ و ۲/۵۰۰ از استوک اولیه اضافه شد، به نحوی که غلظت اتانول در محیط کشت از ۰/۱ درصد تجاوز نکند [۲۵].

شمارش تعداد سلول‌ها: جهت شمارش سلول‌ها، در فواصل زمانی ۲، ۷ و ۱٤ روز، ابتدا سلول‌ها تریپسینه شده و به دقت و به طور کامل از پلیت جدا شدند. سپس برای هر حفره پلیت، µl ۱۰۰ از سوسپانسیون سلولی با µl ۱۰۰ محلول تریپان‌بلو (سیگما) مخلوط شده بلافاصله با کمک یک

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

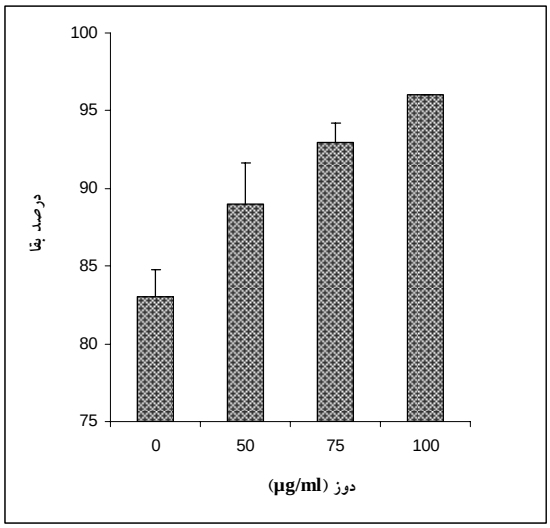
هموسیتومتر (لام نئوبار) تعداد سلول‌های رنگ گرفته (سلول‌های مرده) و سلول‌های رنگ نشده (سلول‌های زنده) تعیین شدند [۲٦]. سپس با در دست داشتن تعداد سلول‌های زنده و مرده و محاسبه درصد بقا (۱۰۰×کل سلول‌ها/ سلول زنده)، تخمینی از میزان بقای سلول‌ها در حضور دوزهای مورد آزمایش سیلی‌مارین به دست آورده شد. با توجه به تعویض محیط در روزهای ۷ و ١٤، در این روزها تنها تعداد سلول‌های زنده شمارش شده و از آن برای بررسی روند تکثیر استفاده شد.

آنالیز آماری: داده‌های به دست آمده از شمارش سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS#١٦ و تست T آنالیز و معنی‌داری داده‌ها در سطح p< ۰/۰۵ بررسی شد. تعداد سلول‌ها و همچنین درصدهای محاسبه شده به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

نتایج

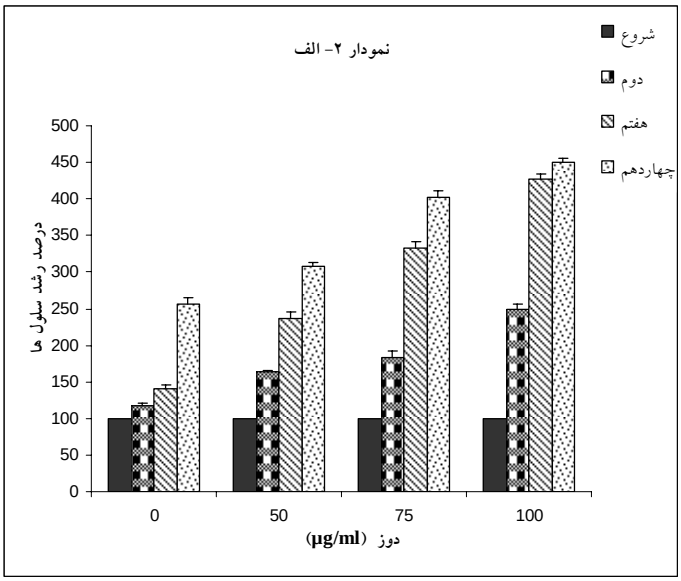
تعیین درصد بقا در روز دوم: در روز دوم تیمار، پس از رنگ آمیزی سلول‌ها با تریپان بلو، تعداد سلول‌های زنده و مرده موجود در هر نمونه، به طور تصادفی در ٤ میدان مختلف از دید میکروسکوپ شمارش شد و درصد بقای سلول‌ها به صورت نسبتی از سلول‌های زنده به کل سلول‌های محاسبه شد. میانگین ± خطای معیار (n=۳) بقا برای گروه کنترل و همچنین گروه‌های تیمار شده با دوزهای μg/ml ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰به ترتیب ۱/۸ ± ۸۳ درصد، ۲/٦ ± ۸۹ درصد، ۱/۲ ± ۹۳ درصد و ۰/۰۰ ± ۹٦ درصد بود (نمودار شماره ۱). مقایسه میانگین‌ها با تست T نشان داد که تیمار با سیلی‌مارین در روز دوم در هر سه دوز باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) میزان بقای سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل شده است.

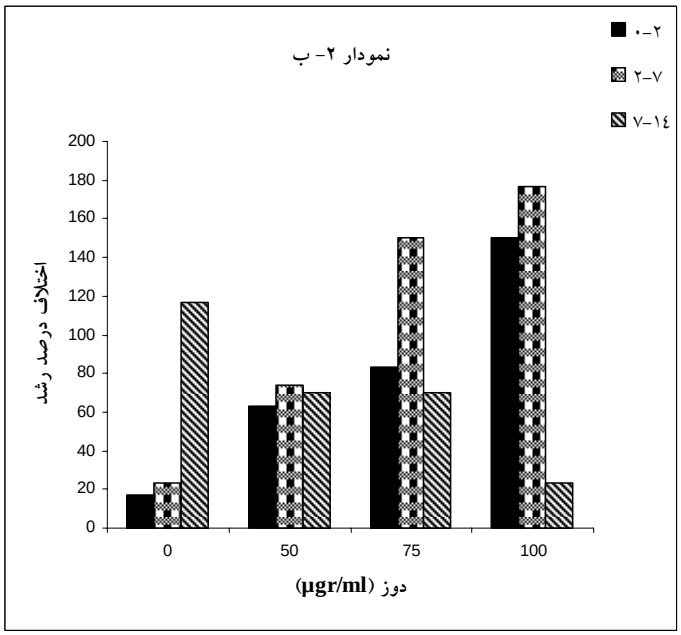
تعیین درصد رشد سلول‌ها در حضور سیلی‌مارین: به منظور بررسی درصد رشد سلول‌های تیمار شده با دوزهای مختلف سیلی‌مارین در هر روز، شمارش تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های تیمار شده در روزهای ۷،۲ و ١٤ انجام شده و با در دست داشتن تعداد اولیه سلول‌ها (5×10^4 cell/well)، درصدهای رشد برای سایر گروه‌ها به صورت نسبتی از تعداد سلول‌های زنده هر گروه به تعداد اولیه سلول‌ها محاسبه شد (نمودار شماره ۲- الف). مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده بیانگر افزایش وابسته به دوز و معنی‌دار درصد رشد سلول‌ها نسبت به کنترل همان روز در تمام دوزها و روزها می‌باشد (p<۰/۰۵). در فاصله روزهای ۲ تا ۷، تغییرات درصد رشد در گروه‌های تیمار شده با سیلی‌مارین به ترتیب ۱۵۰،۷٤ و ۱۷۷ درصد برای گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵۰μg/ml، ۷۵ و ۱۰۰ سیلی‌مارین بود که در مقایسه با گروه کنترل (۲۳ درصد) افزایش معنی‌داری داشتند (نمودار شماره ۲- ب).



نمودار شماره ۱ - درصد بقای سلول‌ها در روز دوم تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین. درصد سلول‌ها ± خطای معیار در این شکل نشان داده شده است.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]





نمودار شماره ۲- (الف) درصد رشد MSCs در گروه‌های تیمار شده با دوزهای متفاوت سیلی‌مارین در روزهای مختلف در مقایسه با گروه کنترل. در این مقایسه درصد رشد سلول‌ها در گروه کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شده است. درصدهای محاسبه شده به صورت میانگین ± خطای معیار برای سه نمونه بیان شده است. افزایش رشد در تمام گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). (ب): اختلاف درصد رشد سلول‌ها در دوره ۰-۲، ۲ تا ۷ و ۷ تا ۱٤ روز در گروه کنترل و همچنین گروه‌های تیمار شده با سیلی‌مارین نشان داده شده است.

افزایش درصد رشد سلول‌ها در روز ۱٤ نسبت به روز هفت برای گروه کنترل و همچنین گروه‌های تیمار شده با دوزهای µg/ml ۵۰، ۷۵ و۱۰۰ به ترتیب ۱۱۷، ۷۰، ۷۰ و ۲۳ درصد محاسبه شد. نکته قابل‌توجه در این نتایج، کاهش درصد رشد سلول‌های تیمار شده با هر سه دوز سیلی‌مارین در مقایسه با گروه کنترل در فاصله زمانی روزهای هفتم تا چهاردهم بود (نمودار شماره ۲- ب).

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]

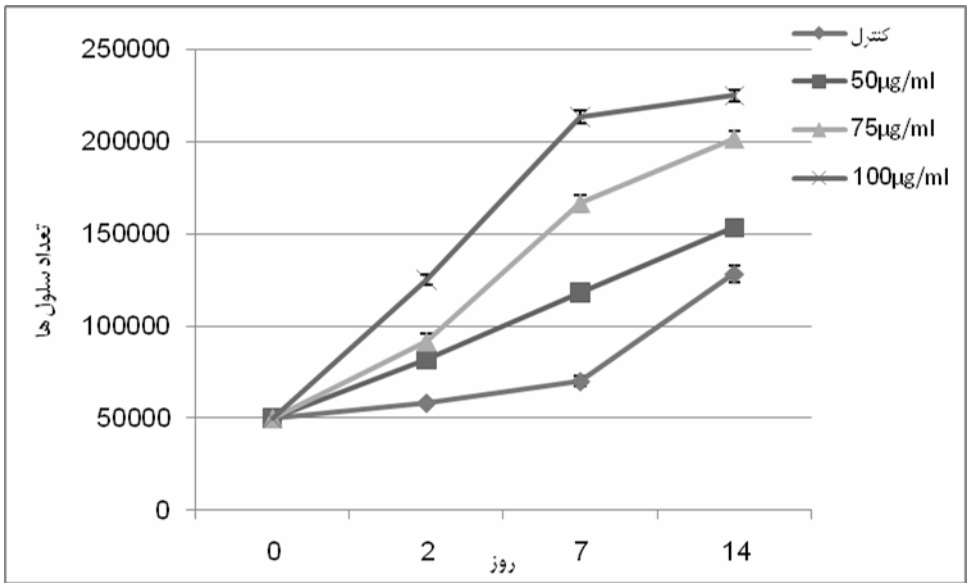
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

از سوی دیگر، به منظور بررسی پاسخ تکثیری سلول‌ها در روزهای مختلف، پس از شمارش تعداد سلول‌های زنده، نمودار افزایش تعداد سلول‌ها برای سه دوز گفته شده و گروه کنترل، در روزهای دوم، هفتم و چهاردهم ترسیم شد (نمودار شماره ۳). افزایش تعداد سلول‌ها در تمام دوزهای تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بوده است. همان‌طور که در این نمودار نیز نشان داده شده است، گروه‌های تیمار شده با سیلی‌مارین در فاصله روزهای هفتم تا چهاردهم، در مقایسه با گروه کنترل رشد آهسته‌تری داشته است.

بحث

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان در معرض سه غلظت متفاوت سیلی‌مارین قرار گرفته و میزان بقای آنها دو روز پس از تیمار و همچنین روند تکثیر سلول‌ها در سه زمان ۲، ۷ و ۱٤ روز، با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو [۲۷] موردارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که سیلی‌مارین در هر سه غلظت μg/ml ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ به صورت معنی‌داری باعث افزایش بقا در روز ۲ و همچنین میزان تکثیر hBMSCs در روزهای ۲ ، ۷ و ۱٤ می‌شود. افزایش توان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تکثیر آنها در حالت تمایز نیافته، یکی از اهداف اصلی در آزمایشگاه‌های محیط کشت می‌باشد زیرا تعداد این سلول‌ها در مغز استخوان به مراتب کمتر از تعداد موردنیاز در مهندسی بافت و استراتژی‌های سلول درمانی است [۹]. تاکنون در ارتباط با اثر سیلی‌مارین بر کشت برخی رده‌های سلولی از جمله سلول‌های T سرطانی خون محیطی، سلول‌های غیربدخیم کلیوی در میمون‌های سبز افریقایی، سلول‌های اپیتلیال پستانی و سلول‌های کبدی مطالعاتی انجام شده است [۳۱ – ۲۸] اما در زمینه اثرات آن بر سلول‌های بنیادی اطلاعاتی در دست نمی‌باشد. در سال ۱۹۹۹، سوننبیچل[1] و همکارانش با در نظر گرفتن سه پارامتر میزان تکثیر یاخته‌ای، بیوسنتز DNA و پروتئین یاخته‌ای و میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز به عنوان معیارهایی از فعالیت متابولیک

[1] Sonnenbichler



نمودار شماره ۳- روند افزایش تعداد سلول‌ها در روزهای دوم، هفتم و چهاردهم برای سه دوز تیمار و گروه کنترل نشان داده شده است. شیب افزایش تعداد سلول‌ها برای گروه‌های تیمار شده در فاصله روزهای هفتم تا چهاردهم کمتر از گروه کنترل شده است.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

سلول، اثرات فلاونوئیدهای سیلی‌مارین بر روی دو رده سلول‌های غیربدخیم کلیوی در میمون‌های سبز آفریقایی را موردمطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج این مطالعه، فلاونوئیدهای سیلی‌مارین در غلظت μM ٤٠ بیشترین اثر را بر پارامترهای گفته شده به جا می‌گذارد [۲۹]. کوکوزا[1] و همکارانش (۲۰۱۰) نیز با تیمار سلول‌های اپیتلیال پستانی، شاهد اثر مثبت دوزهای ng/ml ۱۰۰۰ تا ۱۰ سیلی‌مارین بر روند تکثیر سلول‌ها بودند [۳۰].

از موارد متمایزکننده این مطالعه با سایر مطالعات، بررسی روند تکثیر در یک دوره ١٤ روزه بود. با توجه به اینکه روند افزایش درصد رشد سلول‌ها تا روز هفتم مشابه سایر مطالعات بوده و ما شاهد افزایش درصد رشد بودیم، اما از روزهای هفتم تا چهاردهم، علی‌رغم حفظ روند افزایشی، سرعت رشد سلول‌های تیمار شده با سیلی‌مارین در مقایسه با گروه کنترل، به میزان چشمگیری به صورت وابسته به دوز کاهش داشت به طوری که درصد رشد در این فاصله زمانی برای گروه کنترل ٨٤ درصد و برای گروه تیمار شده با μg/ml ۱۰۰ سیلی‌مارین ۵ درصد محاسبه شد. تغییر الگوی اثرات سیلی‌مارین بر تکثیر سلولی در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است. قراگوزلو و همکارانش (۲۰۰۷) نیز در بررسی اثرات سیلی‌مارین بر تکثیر سلول‌های T سرطانی خون محیطی، شاهد اثرات تحریکی سیلی‌مارین بر تکثیر سلول‌ها در دوزهای کمتر از μM ۲۰۰ و اثر بازدارندگی غلظت‌های بالاتر سیلی‌مارین بودند [۲۸].

همچنین در این مطالعه ما شاهد افزایش معنی‌دار میزان بقای سلول‌ها در روز دوم، در تمامی دوزهای مورد استفاده سیلی‌مارین بودیم. نتایج ما در این زمینه مخالف اثرات مشاهده شده برای سیلی‌مارین در حفظ بقای سلول‌های کبدی پرایمری می‌باشد که توسط پاردو[2] و همکارانش (١٩٩٤) مورد بررسی قرار گرفت. آنها در مطالعه خود بر کشت اولیه سلول‌های کبدی به این نتیجه رسیدند که سیلی‌مارین در غلظت‌های بالاتر از μM ۲۵ طی یک دوره ۱۸ساعته، بقا و چسبندگی سلول‌ها را کاهش می‌دهد هرچند دوزهای کمتر اثرات مثبتی بر حفظ بقا داشته‌اند [۳۱]. با توجه به اثر گزارش شده سیلی‌مارین بر افت پتانسیل غشای میتوکندری و همچنین افزایش رهاسازی کلسیم از میتوکندری [۳۲]، احتمال می‌رود حساسیت بیشتر سلول‌های کبدی به دوزهای پایین‌تر سیلی‌مارین در مقایسه با دوزهای مورد استفاده در مطالعه ما، به دلیل بالاتر بودن تعداد میتوکندری در سلول‌های کبدی در مقایسه با سلول‌های مزانشیمی باشد.

در مجموع، استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان مکمل‌های ارتقا دهنده‌ی کیفیت سلول‌های بنیادی، رویکردی نوین بوده و نیازمند تحقیقات و بررسی‌های بیشتر جهت درک دقیق مکانیزم‌های درگیر و همچنین شناسایی شرایط بهینه تأثیرگذاری آنها می‌باشد. یافته‌های این تحقیق حاکی از اثرات مثبت تیمار با سیلی‌مارین در زمان مشخص، بر بقا و رشد hBMSCs می‌باشد. با درنظر گرفتن نتایج حاضر، پیشنهاد می‌کنیم با انجام مطالعات بیشتر، اثرات حضور طولانی‌مدت سیلی‌مارین در محیط کشت با بررسی سایر فاکتورهای تأثیرگذار مطالعه و مکانیزم دقیق این تغییرات شناسایی شوند.

[1] Cucuzza [2] Parado

منابع

1. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. of Bioch. & Cell Biol.* 2004; 36: 568 – 84.

2. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, *et al.* Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res.* 2008; 333: 207 – 15.

3. Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

cells differentiate into hepatocytes *in vitro*. *World J. Gastroenterol.* 2005; 3479 - 84.

4. Ramos JR, Song S, Pelaez FC, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells *in Vitro*. *Experimental Neurol.* 2000; 164: 247 – 56.

5. Zhang J, Li G, Chan C, Meng C, Lin MC, Chen Y, et al. Flavonoids of Herba Epimedii regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/β-catenin signaling pathway. *Mol & Cell Endocrin* 2010; 314: 70 - 4.

6. Greenbaum LE, Wells RG. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 2009; [article in press].

7. Fraser JK, Ronda E. Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 2004; 34:658 – 66.

8. Levya O, Dvirb T, Tsur-Gangb O, Granot Y, Cohenb S. Signal transducer and activator of transcription 3—A key molecular switch for human mesenchymal stem cell proliferation. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 2008; 40: 2606 – 18.

9. Xu ZH, Wu QY. Effect of lecithin content blend with poly (L-lactic acid) on viability and proliferation of mesenchymal stem cells. *Materia Sc & Engin. C* 2009; 29: 1593 – 8.

10. Orivea IC, Tejadosa N, Delgadoa J, Gaztelumendia A,Otaeguib D, Langc V et al. ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp. Cell Res.* 2008; 314: 1777 - 88.

11. Zhang J, Wang J. Study of Panax notoginseng mobilizing marrow stem cells efferens efficiency of acute myocardial infarction in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2009; 34: 893-5.

12. Shen JP, Ye BD, Zhou YH. Treatments of refractory sever autoimmune disease by combined therapy with Chinese drug and auto-hematopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2008; 28: 212 - 5.

13. Patel N, Joseph C, Corcoran GB, Ray SD. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxic & Applied Pharm.* 2010; [article in press].

14. Sun JH, Gao YM, Yang L, Wang X, Bao LH, liu WJ et al. Effects of Buyang Huanwu Decoction on neurite outgrowth and differentiation of neuroepithelial stem cells. *Chin Physiol.* 2007; 50: 151 - 6.

15. Zhang P, Dai K, Yan S, Yan W, Zhang C, Chen D, *et al.* Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. *Euro. J. of Pharm.* 2009; 607: 1 – 5.

16. Shen ZY, Huang JH, Wu B. activation effect and mechanism of epimedium on endogenous stem cells. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2009; 29: 251 - 4.

17. Jamshidi A, Ahmadi Ashtiani HR, Oliazadeh N, Jafarzadrh N, Taheri Brojerdi M, Naderi M. A key for thousands locks. Noaavar Press; 2007, pp: 70 – 87.

18. Williams RJ, Spencer JP, Evanc CR. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol. & Med.* 2004; 36: 838 – 49.

19. Li LH, Wu LJ, Tashiro SI, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T. The roles of Akt and MAPK family members in silymarin's protection against UV-induced A375-S2 cell apoptosis. *Int. Immunopharm.* 2006; 6: 190 – 7.

20. Li L, GaoY, Zhang L, Zeng J, He D, Sun Y. Silibinin inhibits cell growth and induces apoptosis by caspase activation, down-regulating surviving and blocking EGFR–ERK activation in renal cell carcinoma. *Cancer Letters* 2008; 272: 61 – 9.

21. Jang HS, Kook SH, Son YO, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Choi KC. Flavonoids purified from Rhus verniciflua Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1726: 309 – 16.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]

22. Zhonga X, Zhub Y, Lua Q, Zhang J, Gea Z, Zheng S .Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway. *Toxicol.* 2006; 227: 211 – 21.

23. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. of Cell Bioch.* 2004; 93: 1210 – 30.

24. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature Protocols* 2009; 4: 102 – 6.

25. Pontes H, Carvalho M, De Pinho P.G, Carmo H, Remião F, Carvalho F, Bastos M.L. Ethanol, the forgotten artifact in cell culture. *Arch Toxicolology Springer*. 2008; 82 (3): 197 – 8.

26. Cook JA, Mitchell JB. Viability Measurements in Mammalian Cell Systems. *Analytical Biochem.* 1989; 179: 1 – 7.

27. Carvalho K, Cury CC, Oliveira L, Cattaned RI, Malvezzi M, Francisco JC, et al. Evaluation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Standard Cryopreservation Procedure Efficiency. *Transplantation Proceedings* 2008; 40: 839 – 41.

28. Gharagozloo M, Amirghofran Z. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2007; 133: 525 – 32.

29. Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R. Stimulatory Effects of Silibinin and Silicristin from the Milk Thistle *Silybum marianum* on Kidney Cells. *The J. Pharmacol. & Exp. Therap.* 1999; 290: 1375 - 83.

30. Cucuzza LS, Motta M, Miretti S, Macchi E, Martignani E, Accornero P, et al. Positive effect of silymarin on cell growth and differentiation in bovine and murine mammary cells. *J. Animal. Physio. & Animal. Nutr*. 2010; 94: 111 – 7.

31. Parado LA, Anundi L, Minguez MP, Lindros KO. The effect of silymarin on the attachment and viability of primary culture of rat hepatocytes. *Toxico. in vitro*. 1994; 8 (4): 577 –9.

32. Chavez E, Bravo C. Silymarin increase mitochondrial Ca^{2+} release. *Life sci.* 1998; 43 (12): 975 - 81.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.17.5]