جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ۲۸۰-۲۷۳

اثر عصاره الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس بر تمایز اوستئوژنیک و آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

جواد بهارآرا Ph.D.*[1]، الهه امینی Ph.D. Student [2]، فریده نامور Ph.D [1]، مژگان سلطانی Ph.D. Student. [3]

۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، مشهد، ایران
۲- دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharara@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

چکیده

هدف: خیار دریایی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات بیواکتیو مانند کندروئیتین سولفات در درمان بیماری‌های استخوانی مورد توجه است. در زمینه به‌کارگیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم آسیب‌های استخوانی در سال‌های اخیر پیشرفت‌های خوبی انجام شده است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک عصاره الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های بنیادی مغزاستخوان موش صحرایی نر توسط فلاشینگ جداسازی و توسط ایمنوسیتوشیمی تایید گردیدند. سلول‌ها در ۹ گروه تجربی با دوزهای مختلف عصاره الکلی خیار دریایی ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شده و با روش MTT سیتوتوکسیسیته عصاره مشخص گردید. ۲۱ روز بعد، تمایز اوستئوژنیک و آدیپوژنیک توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، اویل رد و کیت آلکالین فسفاتاز بررسی شد. داده های کمی توسط نرم افزار SPSS، آزمون ANOVA در سطح P<۰/۰۵ تحلیل شدند.

نتایج: دوز مناسب برای تیمار سلول‌های بنیادی غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. رنگ‌آمیزی اویل رد نشان داد خیار دریایی قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی به دودمان آدیپوژنیک ندارد. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و فعالیت آلکالین فسفاتاز نشان دادند دوز ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی خیار دریایی موثرترین دوز تمایز سلول‌های بنیادی به دودمان استئوژنیک است.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش بیان‌گر پتانسیل تمایزی اوستئوژنیک عصاره خیار دریایی خلیج فارس بر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: خیار دریایی، اوستئوژنیک، موش صحرایی، آدیپوژنیک، تمایز

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

بیماری‌های استخوانی ایجاد شده توسط هومئوستازی غیر طبیعی استخوان می‌توانند از طریق القا عمل‌کرد اوستئوبلاستی درمان شوند. از این رو شناسایی داروهایی که موجب تسریع شکل‌گیری استخوان شوند، ابزار کلیدی در درمان بیماری‌های استخوانی به‌شمار می‌رود (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی چند توان به‌دلیل دارا بودن ظرفیت بالای تکثیر و تمایز منبع سلولی ارزشمندی در پزشکی ترمیمی به‌شمار رفته و می‌توانند به چند نوع سلول از جمله اوستئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت تمایز یابند (۲). مطالعات نشان داده‌اند این سلول‌ها به‌عنوان منبع سلول‌های پیش ساز استخوانی می‌باشند و تمایز اوستئوبلاستی توسط فاکتورهای مختلفی از جمله (bone morphogenetic proteins،BMPs) (transforming growth factor ß)،TGFβ (fibroblast growth factor-2) FGF-2 ، (insulin growth factor-1) IGF-1 و برخی عوامل دیگر تنظیم می‌شود (۳).

تمایز اوستئوبلاستی رویداد کلیدی در شکل‌گیری استخوان است و می‌تواند به سه مرحله تکثیر، مرحله بلوغ و سنتز ماتریکس خارج‌سلولی و مرحله معدنی شدن تقسیم شود که نشان‌گرهای فنوتیپی به‌طور متمایزی در هر مرحله بیان می‌شوند، به‌عنوان مثال اوستئوبلاست‌های فعال، مارکرهای اولیه تمایز اوستئوبلاستی یعنی بیان فراوان آلکالین فسفاتاز و کلاژن نوع I را نشان می‌دهند، این در حالی است که به‌نظر می‌رسد اوستئوکلسین و اوستئوپونتین در مراحل دیرتر همزمان با معدنی شدن بیان می‌شوند (۴).

تا به امروز داروهای فراوانی در درمان بیماری‌های استخوانی گزارش شده‌اند که در هر حال اکثر این داروها متوقف کننده بازجذب استخوان هستند و اثرات جانبی زیادی دارند، برای مثال درمان جایگزینی استروژن که از دژنره شدن توده استخوان در زنان، پس از دوره یائسگی پیشگیری می‌نماید، علی‌رغم وجود فواید بسیار موجب افزایش بروز سرطان تخمدان و پستان می‌شود، از این‌رو پژوهشگران سعی دارند ترکیباتی را شناسایی کنند که بتوانند بدون ایجاد عارضه جانبی خاص، شکل‌گیری استخوان را افزایش دهد (۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل قابل توجه درمانی زیادی را در زمینه درمان بیماری‌های مختلف دارا هستند (۶)، از طرفی با توجه به توان بالای سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در تمایز به رده‌های سلولی متفاوت و استفاده از این رده‌های سلولی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله نقایص استخوانی و غضروف، فراهم نمودن شرایطی که روند تمایز و ترمیم بافت‌های سخت و اسکلتی بهبود یا تسهیل یابد از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۷). یکی از غنی‌ترین منابع حاوی چنین ترکیباتی اکوسیستم‌های آبی است که در آنها گونه‌های مختلفی از جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها زیست می‌نمایند، این اکوسیستم‌ها به‌دلیل وجود تنوع بالای مواد طبیعی دارای فعالیت بیولوژیک منحصر به‌فرد هستند و توجه دانشمندان را در دهه‌های اخیر به‌شدت معطوف خود کرده‌اند، به‌عنوان مثال فراورده‌های طبیعی نظیر عصاره‌های استخراج شده از جلبک‌های دریایی دارای ترکیباتی هستند که می‌توان آن‌ها را برای سنتز داربست‌ها و نیز تمایز استفاده نمود (۱). موجودات دریایی همچون اسفنج‌ها، مرجان‌های دریایی، تونیکات‌ها، نرم‌تنان دریایی و میکروارگانیسم‌های دریایی امروزه برای مطالعه و جستجوی کاندیداهای دارویی جدید مورد توجه قرار گرفته‌اند و بسیاری از ترکیبات مشتق شده از موجودات زنده دریایی دارای فعالیت‌های بیولوژیک امید بخشی در زمینه درمان بیماری‌ها هستند (۸).

محققین در حدود ۷۰۰۰ فراورده دریایی را جداسازی نموده‌اند که ۲۰ درصد آن مربوط به جلبک‌ها، ۳۳ درصد اسفنج‌ها، ۱۸ درصد مرجانیان و ۲۴ درصد مربوط به سایر بی‌مهرگان از جمله اکینودرم‌ها می‌باشند (۹). کشور ایران از لحاظ دارا بودن چنین منابعی در زمینه فراورده‌های طبیعی غنی به‌شمار می‌آید (۱۰). بررسی ترکیبات موجود در اکینودرم‌ها نشان می‌دهد که این جانوران حاوی ترکیبات فعال زیستی با خواص دارویی می‌باشند که در بسیاری از فرایندهای زیستی نقش ایفا می‌کنند (۱۱). خیار دریایی در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و یکی از ارگانیسم‌های دریایی با ارزش غذایی و درمانی بالا به‌شمار می‌آید که خواص دارویی آن به‌دلیل حضور ترکیبات عمل‌کردی با فعالیت بیولوژیکی چند گانه نسبت داده می‌شود (۱۲).

خیار دریایی به‌عنوان یک بی‌مهره دریازی دارای پروفایل با ارزش منحصر به‌فرد، از مواد مغذی دارای خاصیت دارویی همانند تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و مواد معدنی از جمله کلسیم است که دارای خواص بیولوژیک نظیر مهار رگ‌زایی، ضد سرطان، ضد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

التهاب، آنتی اکسیدانت است. همچنین این جانور حاوی ترکیبات فعال زیستی نظیر گلیکوزآمینوگلیکان، کندروئیتین سولفات، گلیکوزیدهای تری‌ترپنه، ترکیبات فنلی و اسیدهای چرب می‌باشد و امید می‌رود در جهت تمایز سلول‌ها و تسهیل و پیشبرد این فرایند با هدف تولید رده‌های سلولی گوناگون و استفاده از آن‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها مفید واقع شود (۱۳). با توجه به رویکرد نو و اقبال جامعه جهانی به فراورده‌های طبیعی و از آنجایی‌که در طب سنتی از موجودات دریایی نظیر خیار دریایی برای التیام دردهای مفصلی و استخوانی استفاده می‌شود و کشور ایران نیز دارای ذخایر دریایی غنی از این گروه جانوری می‌باشد که تا کنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات ترکیبات آن‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی و سلول درمانی انجام نشده است لذا در پژوهش حاضراثر عصاره تام الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس در پیشبرد تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار به‌سمت دودمان‌های اوستئوژنیک و آدیپوژنیک بررسی شده است .

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:

موش‌های صحرایی نژاد ویستار با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته و با وزن تقریبی ۱۰۰ تا ۱۳۰ گرم از انستیتو رازی مشهد خریداری و در اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، در شرایط طبیعی و با پریود نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. برای انجام تجربیات، موش‌ها با استفاده از کلروفرم کشته شدند، استخوان‌های ران و درشت نی آن‌ها جدا گردید و داخل PBS (PAA, Germany) سرد قرار داده شد. پس از پاک‌سازی بافت‌های اطراف و قطع دو سر استخوان، مغز استخوان با روش Flushing از درون استخوان تخلیه گردید. پس از سانتریفیوژ، به پلیت سلولی حاصل ۲ میلی‌لیتر DMEM (Bio idea, Iran) حاوی ۱۵ درصد FBS (GIBCO, USA) و یک درصد پنی‌سیلین استرپتومایسین اضافه شده و درون انکوباتور (Memmert, Germany) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 پنج درصد قرار داده شدند. بعد از ۲ روز محیط رویی تخلیه و هر ۳ روز یکبار تعویض محیط صورت گرفت. زمانی‌که تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام و سلول‌ها پس از پاساژ سوم جهت کشت استفاده شدند. در کلیه مراحل انجام تحقیق، موارد اخلاقی کار با حیوان مطابق مقررات کمیته اخلاق دانشگاه رعایت گردید.

تکنیک ایمنوسیتوشیمی جهت اثبات بنیادی بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: برای این منظور دو هفته پس از جداسازی و تخلیص سلول‌های مزانشیمی و حذف سایر سلول‌های موجود در مغز استخوان، سلول‌های مزانشیمی در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک، سلول‌ها سه مرتبه با PBS سرد شستشو داده شده، سپس در معرض پارافرمالدئید سرد ۴ درصد قرار گرفته و با آنتی‌بادی اولیه بر علیه مارکر سطحی سلول‌های بنیادی CD44 (Abcam, England) به‌مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان مذکور، سلول‌ها در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC (Sigma,USA) برای نشان دادن سلول‌ها و همچنین رنگ DAPI (Sigma, USA) جهت رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ فلورسنت (Labomed, Korea) بررسی انجام شد.

آماده سازی عصاره الکلی خیار دریایی: نمونه‌های خیار دریایی از آب‌های خلیج فارس مجاور جزیره قشم جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد منتقل و پس از بررسی‌های مورفومتریک اولیه محتویات داخلی بدن آن‌ها تخلیه و بخش بیرونی بدن آن‌ها را خشک کردیم، سپس به ازای هر گرم وزن خشک بدن، ۱۰ میلی‌لیتر متانول استفاده شد و به‌مدت سه شبانه روز بر روی شیکر چرخشی قرار داده شد. پس از طی زمان مذکور، عصاره با استفاده از کاغذ واتمن ۱۰صاف گردیده و توسط دستگاه وکیوم تبخیری (Heidolph, Germany) عصاره گیری و تغلیظ انجام و درون آون (Memmert, Germany) ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری شدند.

تعیین سیتوتوکسیسیته عصاره الکلی خیار دریایی با استفاده از روش MTT: به‌منظور بررسی دوز مناسب عصاره خیار دریایی بر روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌های مذکور، این سلول‌ها با دوزهای متفاوت میکروگرم بر میلی لیتر ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ رقیق شد، در DMSO ۱۰ درصد عصاره تام الکلی خیار دریایی تیمار شد و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، محیط رویی تخلیه و ۲۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT (Sigma, USA) به سلول‌ها اضافه شده و پس از ۴

ساعت انکوباسیون درون انکوباتور، DMSO به سلول‌ها افزوده شده، سپس جذب در ۵۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Epoch, USA) اندازه گیری و طبق فرمول ذیل میزان سمیت سلولی تحت تاثیر تیمار با عصاره خیار دریایی تعیین شد:

$$\text{درصد بقا سلولی} = \frac{\text{متوسط جذب کنترل} - \text{متوسط جذب نمونه}}{\text{متوسط جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

القا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: جهت القا تمایز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی پس از پاساژ سوم به تعداد ۱۰۳ تا ۱۰۴ درون پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت با دوزهای مختلف عصاره خیار دریایی ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار گردید و تا ۲۱ روز، هر سه روز یک بار با محیط تیماری تازه تعویض انجام شد.

تعیین تمایز به اوستئوسیت با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین رد: برای رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و اندازه گیری سطح ذخایر کلسیمی در ماتریکس خارج سلولی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به‌مدت ۲۱ روز با دوزهای ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره تام الکلی خیار دریایی تیمار شد و پس از طی زمان مورد نظر، محیط رویی تخلیه و با PBS شستشو داده شد و پس از ۵ دقیقه با فرمالین ۴ درصد تثبیت انجام شد، سپس ۳۰ دقیقه در معرض رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (Bio Idea, Iran) قرار داده شدند.

تعیین تمایز به اوستئوسیت با استفاده از سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز: به‌منظور سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز، سلول‌های بنیادی مغز استخوان به تعداد ۱۰۴ × ۲ در پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شده و به‌مدت ۱۴ روز تحت تاثیر محیط کشت DMEM با دوزهای متفاوت عصاره خیار دریایی ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تحت تیمار قرار گرفتند. پس از طی زمان مورد نظر، محیط رویی خارج و دو مرتبه با PBS شستشو شد و توسط تریتون X-100 یک درصد لیز شدند. سپس با استفاده از کیت سنجش آلکالین فسفاتاز (پارس آزمون) فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۰۵ نامتر به‌کمک اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

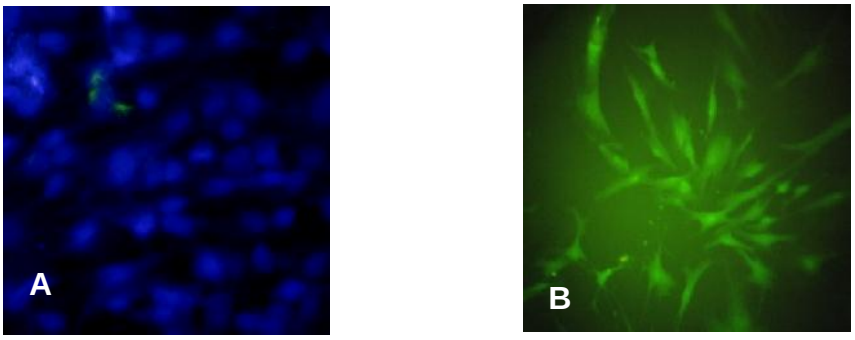
تعیین تمایز به آدیپوسیت توسط رنگ آمیزی اویل رد: جهت بررسی میزان تمایز به آدیپوسیت‌ها تحت تاثیر محیط القایی عصاره تام خیار دریایی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۲۱ روز پس از تیمار با عصاره تام خیار دریایی، به‌مدت ۴۵ دقیقه با فرمالین ۴ درصد تثبیت شد و در ادامه پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد، با محلول اویل رد (Bio Idea, Iran) رنگ آمیزی شدند. پس از طی این زمان، سلول‌ها سه تا چهار مرتبه با الکل ۷۰ درصد شستشو و با میکروسکوپ اینورت (Bio Photonic, Brazil) بررسی شدند.

آنالیز آماری: داده های کمی حاصل توسط نرم افزار SPSS، آزمون آماری ANOVA در سطح P<۰/۰۵ تحلیل شد و نمودارها توسط نرم‌افزار EXCEL رسم گردیدند.

نتایج

بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

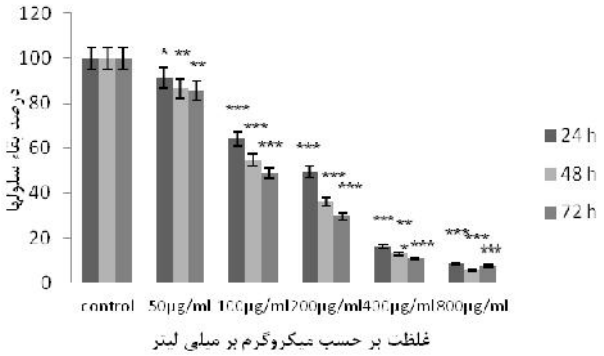
بررسی مورفولوژیک سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که وجود مارکر سطحی CD44 بر سطح سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، دال بر اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی است (شکل ۱).



شکل۱: A) رنگ‌آمیزی DAPI جهت نشان دادن هسته سلول‌های بنیادی، B) وجود آنتی ژن سطحی CD44 بر سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

تعیین دوز مناسب عصاره تام الکلی خیار دریایی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره تام الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس در دوزهای بالاتر از ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث تجزیه سلولی می‌شوند. همچنین در دوزهای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت وابسته به دوز منجر به مهار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش صحرایی می‌شوند. از این‌رو غلظت مناسب برای بررسی تمایز عصاره الکلی خیار دریایی کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (نمودار ۱).

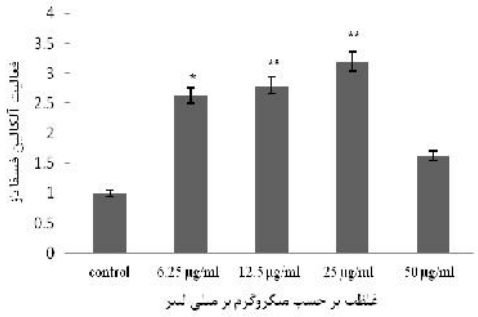


*نمودار ۱: اثر عصاره الکلی خیار دریایی خلیج فارس بر روی بقاء سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی در ظرف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار توسط MTT. ANOVA ، *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، ***P< ۰/۰۰۱ (Mean±S.E). نتایج نشان داد که دوزهای بالاتر از ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره منجر به تجزیه سلول‌ها می‌شود و عصاره الکلی خیار دریایی در دوز میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار تکثیر سلول‌ها را در پی دارد.*

اثر عصاره تام الکلی خیار دریایی بر تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

نتایج حاصل از تست آلکالین فسفاتاز نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نر تیمار شده با عصاره الکلی خیار دریایی پس از طی ۱۴ روز از تمایز، به‌طور چشمگیری نسبت به گروه شاهد افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و معدنی شدن دارند. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد پس از ۲۱ روز از تمایز نیز نشان داد که عصاره خیار دریایی به‌طور چشمگیری در دوزهای بین ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر معدنی شدن و میزان ذخایر کلسیمی سلول‌های مغز استخوان را تحریک نموده است (شکل ۲و نمودار۲).

شکل۲: تصاویر میکروسکوپ معکوس از معدنی شدن سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی ۲۱ روز پس از تیمار با عصاره الکلی خیار دریایی خلیج فارس در غلظت‌های ۶/۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل. (A کنترل، (B ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، (C ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، (D ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، (E ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. (رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، بزرگنمایی ×۱۰۰)



نمودار۲: نمودار فعالیت آلکالین فسفاتازی عصاره الکلی خیار دریایی خلیج فارس در غلظت های ۶/۲۵ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نر در مقایسه با گروه کنترل $P<۰/۰۵$، $P<۰/۰۱$ **، $P<۰/۰۰۱$ ***، (Mean±SE)*

اثر عصاره تام الکلی خیار دریایی بر تمایز آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

اثر عصاره خیار دریایی بر تمایز آدیپوژنیک با استفاده از رنگ آمیزی اویل رد ۲۱ روز پس از تمایز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از رنگ آمیزی اویل رد نشان داد که سلول‌های مزانشیمی که به‌مدت ۳ هفته تحت تیمار با دوزهای ۶/۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی خیار دریایی قرار گرفته بودند به سلول چربی تمایز نیافتند.

بحث

در پژوهش حاضر، پتانسیل تمایزی عصاره الکلی خیار دریایی به تنهایی و بدون استفاده از محیط تمایزی به دودمان‌های اوستئوژنیک و آدیپوژنیک ارزیابی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از آنجایی‌که بیان بالای آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یکی از شاخص‌های تمایز اولیه دودمان اوستئوژنیک و بیان اوستئوپونتین از علائم تمایز پایانی دودمان اوستئوژنیک در نظر گرفته می‌شود، دوز مناسب عصاره الکلی خیار دریایی به‌تنهایی به‌دلیل افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و حضور گرانول‌های معدنی نسبت به گروه کنترل موجب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به دودمان اوستئوژنیک می‌شود که با نتایج سایر پژوهشگران مثل Byuna و همکاران (۱۴) دال بر وجود ترکیبات موثر در اکوسیستم دریایی درگیر در تمایز به دودمان اوستئوژنیک مطابقت دارد.

به‌دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی در منابع دریایی، در سال‌های اخیر بحث استفاده از این ترکیبات فعال در حوزه فارماکولوژیک و درمانی به دلیل دارا بودن عوارض جانبی کمتر مورد توجه فراوان قرار گرفته است (۱۵). با توجه به اینکه در طب سنتی خیار دریایی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات زیستی فراوان دارای خاصیت درمانی، در درمان بیماری‌های مربوط به مفاصل، استخوان و مهره‌ها در طب سنتی مورد استفاده زیاد بوده است (۱۳). از این‌رو بررسی اثر خیار دریایی در پیشبرد روند تمایز سلول‌های بنیادی می‌تواند اهمیت ویژه‌ای در درمان بیماری‌های استخوانی داشته باشد.

بررسی‌ها نشان می‌دهند که عوامل متعددی نظیر محرک‌های شیمیایی، اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی و کشت توام با سایر سلول‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاه اثر می‌گذارند، به‌عنوان مثال تمایز سلول‌های مزانشیمی به دودمان‌های استخوان و چربی تحت تاثیر محرک‌های شیمیایی از قبیل دگزامتازون و انسولین صورت می‌پذیرد. به‌طوری‌که وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور اسکوربیک اسید – ۲ – فسفات, B –گلیسروفسفات و دگزامتازون کشت شوند سلول‌ها فنوتیپ استخوانی به‌خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از جنس فسفات کلسیم از خود ترشح می‌کنند که به‌صورت کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت رسوب می‌کند (۱۶).

در بخش بیرونی بدن خیار دریایی مواد و ترکیباتی همانند گلیکوزآمینو گلیکان، کلسیم، گلیکوزیدهای تری ترپنه و کندروئیتین سولفات وجود دارند که در طب سنتی در درمان دردهای مفصلی، استخوانی و آرتریت نقش دارند (۱۳). یافته‌های حاصل از تجربه حاضر نشان داد که عصاره خیار دریایی می‌تواند به‌عنوان یک منبع ارزشمند حاوی مواد دارای ظرفیت استخوان سازی در عدم حضور فاکتورهای مغذی موجود در محیط اوستئوژنیک از جمله دگزامتازون اسکوربیک اسید، B – گلیسروفسفات در آینده پس از بررسی در مدل‌های جانوری به

منظور درمان بیماری‌های استخوانی از جمله اوستئوپورزیس موثر مورد توجه قرار گیرد.

Zhang و همکارانش (۱۷) اثرات فلاونوئیدها را بر تکثیر و تمایز استئوبلاست‌های اولیه مورد بررسی قرار دادند و یافته‌های آن‌ها نشان داد، فلاونوئیدها با بهبود فعالیت آلکالین فسفاتاز سبب پیشبرد تکوین استئوبلاست‌ها می‌شوند که می‌توانند به‌عنوان تسهیل کننده در روند تمایز استئوبلاست‌ها به‌کار روند. این نتایج با یافته‌های حاصل پژوهش حاضر که نشان داد عصاره خیار دریایی به‌عنوان منبعی از فراورده های طبیعی از طریق افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و بیان اوستئوپونتین پیشبرنده تمایز اوستئوژنیک است، مطابقت دارد. Park و همکارانش (۱۸) نشان دادند پلی ساکارید سولفاته فوکوئیدان به‌عنوان یک نوع فراورده طبیعی تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی انسانی را تحریک می کند. Song و همکاران (۱۹) نیز نشان دادند، حضور ویتامین D3 به‌صورت سینرژیست با BMP2 در غلظت‌های پایین موجب تسریع تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی چربی می‌شود که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مبنی بر به‌کارگیری دوزهای پایین عصاره متانولی خیار دریایی بر تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان همخوانی دارد.

Kim (۲۰) گزارش کرد که Quercetin به‌عنوان یک فلاونوئید بر روی متابولیسم استخوان تاثیر گذاشته و موجب تمایز و تکثیر اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی استرومایی مشتق از بافت چربی به‌صورت وابسته به دوز می شود. همچنین Lee (۲۱) شش بیفلاونوئید را از گیاه Cephalotaxus koreana جداسازی نموده و میزان تاثیر آن‌ها را بر روند تمایز اوستئوبلاست بررسی کرد. وی چنین گزارش نمود که وجود گروه‌های متوکسیل در حلقه های B بیفلاونوئیدها ممکن است در تمایز اوستئوبلاستی نقش داشته باشد. Ryu و همکاران (۲۲) نیز توالی پپتیدی تحت عنوان (LEDPFDKDDWDNWK (1821Da) را از seahorse (نوعی ماهی استخوانی) جداسازی و تخلیص نمود. نتایج آن‌ها نشان داد که پپتید استخراج شده از طریق افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز، معدنی شدن و سنتز کلاژن موجب القا تمایز سلول‌های اوستئوبلاستی MG-63 و سلول‌های کندروسیتی SW-1353 می شود. یافته‌های حاصل از این پژوهش، نیز نشان می‌دهد که عصاره الکلی خیار دریایی به‌صورت وابسته به دوز در یک محدوده خاص تسریع کننده تمایز اوستئوژنیک است و با توجه به نتایج Jeong و همکاران (۲۳) ساپونین به‌عنوان ترکیبی پیشنهاد می‌شود که از طریق افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌تواند تسریع کننده پتانسیل اوستئوژنیک باشد. برخی مطالعات اثر عصاره خیار دریایی را بر روی بارداری و اسپرم کشی بررسی و گزارش شده است که گلیکوزیدهای تری ترپنوئید موجود در عصاره خیار دریایی تحت عنوان holotoxin A1,B1 اثر ضد بارداری دارند و ترکیبی به‌نام cucumariosid استخراج شده از خیار دریایی در لانه گزینی تداخل نموده و اثر ضد بارداری دارد، همچنین یکی از ترکیبات استخراج شده از خیار دریایی ترکیبی تحت عنوان Bivittoside D استخراج شده از گونه Bohadschia vitiensis فعالیت اسپرم کشی قوی دارد که در استفاده از این عصاره بایستی به این موارد منع توجه نمود (۲۴).

نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های حاصل از پژوهش، ترکیبات موجود در بخش بیرونی بدن خیار دریایی با مهار تمایز به دودمان آدیپوژنیک موجب تسریع تمایز به دودمان اوستئوژنیک بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار می‌شوند. لذا جهت استفاده از این منبع طبیعی مفید در درمان بیماری‌ها و اختلالات استخوانی در شرایط بالینی و پتانسیل درمانی آن می‌بایست مطالعات بیشتری به‌ویژه بر روی مدل‌های جانوری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از تلاش‌ها و مساعدت‌های همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهدکه در اجرای این پروژه مشارکت داشتند، صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

1. Thi Nguyen MH, Jung WK, Kim SK. Marine Algae Possess Therapeutic Potential for Ca Mineralization via Osteoblastic Differentiation. Adv in Food & Nutri Res, 2011; 64: 429–441.

2. Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. Clin Lab. 2007; 53(1-2):81-4.

3. Cho YS, Jung WK, Kim JA, Choi IW, et al. Beneficial effects of fucoidan on osteoblastic MG-63 cell differentiation. Food Chem, 2009; 116 (4): 990-994.

4. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of Notch, Wnt, and transforming growth factor-b signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. J. Biol.OGICAL ChemISTRY, 2004; 279(36): 37704–37715.

5. Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta, Best Prac & Res Clin Rheuma, 2008; 22(1): 85–100.

6. Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, et al. Mesenchymal stem cells and their use in therapy : What has been achieved?, Differentiation. 2013; 85(1-2): 1–10.

7. Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold : In vitro osteogenic differentiation, Arch Oral Biol. 2007; 52(1): 64–73.

8. Venugopal V. Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. J. of Aqu Food ProTech. 2010; 19:48-54.

9. Newman DJ , Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. 2012; 75 (3): 311–335.

10. Keshavarz M, Mohammadikia D, Dabbagh AR. The Echinoderms Fauna in Intertidal zone of Southern Oli village coast (Boushehr, Persian Gulf). J Anim Sci Adv, 2012; 2(5): 495-498.

11. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural product as drug candidates, Drug Dis Today, 2003; 8(12) : 536–544.

12. Park SY, Lim HK, Lee S, Cho SK, et al. Biological Effects of Various Solvent Fractions Derived from Jeju Island Red Sea Cucumber (Stichopus japonicus). J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem, 2011; 54(5):718-724.

13. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods — A Review, Mar. Drugs. 2011; 9: 1761–1805.

14. Byuna MR, Kim AR, Hwang JH, Sung MK, Lee YK, Hwang BS, et al. Phorbaketal A stimulates osteoblast differentiation through TAZ mediated Runx2 activation. FEBS Lett 2012; 586:1086–1092.

15. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbo Poly, 2011; 84(1): 14–21.

16. Ahn SE, Kim S, Park KH, Moon SH, et al. Primary bone-derived cells induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. Biochem & Bioph Res Comm, 2006; 340(2) : 403–408.

17. Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, Zhang JC, et al. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from Epimedium koreanum Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. Phytomedicine, 2008; 15: 55–61.

18. Park SJ, Lee KW, Lim DS, Lee S. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. Stem Cells & Dev. 2011; 21(12): 2204-2211.

19. Song I, Kim BS, Kim CS, Im G. Biochemical and Biophysical Research Communications Effects of BMP-2 and vitamin D 3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. Biochem & Bioph .Res Comm. 2011; 408: 126–131.

20. Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Quercetin , a flavonoid , inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells, biochem pharma. 2006; 72(10): 1268–1278.

21. Lee MK, Lim SW, Yang H, Sung SH, et al. Osteoblast differentiation stimulating activity of biflavonoids from Cephalotaxus koreana, Bio& Medi Chem Letters. 2006; 16: 2850–2854.

22. Ryu B, Qian ZJ, Kim SK. Chemico-Biological Interactions Purification of a peptide from seahorse , that inhibits TPA-induced MMP , iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- B activation , and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. Chemico-Bio Interactions. 2010; 184(3): 413–422.

23. Jeong HM, Han EH, Jin YH, Hwang YP, et al. Saponins from the roots of Platycodon grandiflorum stimulate osteoblast differentiation via p38 MAPK- and ERK-dependent RUNX2 activation. Food & Chem Toxic. 2010; 48: 3362–3368.

24. Lakshmi V, Saxena A, Mishra SK, Raghubir R, et al. Spermicidal Activity of Bivittoside D from Bohadschia vitiensis. Archives of Medical Research, 2008; 39(7): 631-638.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2014; 5(3): 273-280 *Original Article*

The Effect of Persian Gulf Sea Cucumber Alcoholic Extract on Osteogenic and Adipodgenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells

Baharara J. Ph.D. [1]*, Amini E. Ph.D. Student.[2], Namvar F. Ph.D.[1], Soltani M. Ph.D. Student [3]

1. Developmental Biology, Department Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Ph.D. Student, Developmental Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3. Ph.D. Student of Developmental Biology, research science Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: baharara@yahoo.com

Received: 13 Nov. 2013 Accepted: 14 Jan. 2014

Abstract

Aim: Sea cucumber has been paid attention in treatment of bone defects due to possessing bioactive compound such as chondroitin sulfate. There were done successful researches in the field of application of mesenchymal stem cells for treatment of bone injury recently. Therefore, this study performed to define the osteogenic and adipogenic potency of Persian Gulf sea cucumber alcoholic extract on differentiation rat bone marrow derived stem cells into osteogenic and adipogenic.

Material and Methods: In this experimental study, bone marrow stromal cells were isolated by flushing from male Wistar rat and demonstrated stemness by immunocytochemistry. The cells in 9 experimental group were exposed to various concentration (3.5, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml) of sea cucumber alcoholic extract and cytotoxicity of sea cucumber alcoholic extract determined by MTT assay. Eventually, after 21 day, osteogenic and adipogenic differentiation were evaluated with alizarin red, oil red staining and alkalin phosphatase kit. Data were analyzed by SPSS software, ANOVA and the level of $p \leq 0.05$ was considered significant.

Result: An appropriate dosage for treatment of mesenchymal stem cells was determined less than 50 µg/ml. Also, oil red staining showed that sea cucumber alcoholic extract does not have capacity of adipogenic induction while alizarin red staining and alkaline phosphatase revealed that concentration of 25 µg/ml sea cucumber alcoholic extract was most efficient concentration into osteogenic differentiation.

Conclusion: Sea cucumber extract was able to differentiate rat bone marrow mesenchymal stem cells into osteogenic lineage.

Keywords: Sea cucumber, Osteogenic, Rat, Adipogenic, Differentiation