تحقیقی

اثر عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه بر تکثیر و مهار آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط آسیب اکسیداتیو

دکتر علیرضا عبدانی پور*[۱]، سیده مهسا خاتمی[۲]، دکتر تقی طریحی[۳]، دکتر میرجعفر ستاری[٤]

۱- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل. ۲- کارشناس ارشد علوم زیستی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل. ۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم و اعصاب شفاء، بیمارستان خاتم الانبیاء، گروه آسیب شناسی، تهران. ٤- دانشجوی رشته پزشکی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل.

چکیده

زمینه و هدف : *سلول‌های بنیادی عصبی توانایی تمایز به اکثر سلول‌های تخصص یافته مغزی را دارا بوده و در بیماری‌های سیستم عصبی این سلول‌ها قادرند به نقاط آسیب دیده مهاجرت کرده و در ترمیم شرکت کنند. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه بر تکثیر و مهار آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط آسیب اکسیداتیو انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی عصبی از ناحیه هیپوکمپ مغز ۵ سر نوزاد موش صحرایی استخراج شد. به منظور تعیین بهترین غلظت، سلول‌ها به مدت ٤٨ ساعت با غلظت‌های ۲۰۰، ٤۰۰، ٦۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت تیمار شدند و میزان تکثیر سلولی با روش MTT بررسی گردید. همچنین اثر آنتی‌آپوپتوتیک این گیاه با القاء آپوپتوز توسط H2O2 و استفاده از کیت تانل بررسی گردید.*

یافته ها : *تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در حضور عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش و درصد سلول‌های آپوپتوتیک کاهش یافت (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه سبب افزایش تکثیر و کاهش میزان آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی گردید.*

کلید واژه‌ها : *سلول‌های بنیادی عصبی ، گیاه بابونه رومی ، تکثیر سلولی ، آپوپتوز*

* نویسنده مسؤول : دکتر علیرضا عبدانی پور ، پست الکترونیکی abdani.anatomy@yahoo.com

نشانی : اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن ۰٤۵۱-۷۷۲۸۰۲۰ ، نمابر ۷۷۲۷۷۹۹

وصول مقاله : ۹۲/۹/۲۳ ، اصلاح نهایی : ۹۳/۲/۲۷ ، پذیرش مقاله : ۹۳/۳/۲۰

مقدمه

بیشترین مکان حضور سلول‌های بنیادی عصبی در نواحی ساب‌ونتریکولار است (۱). سلول‌های بنیادی عصبی توانایی تمایز به اکثر سلول‌های تخصص یافته مغزی را دارا هستند و در بیماری‌های سیستم عصبی قادرند به نقاط آسیب دیده مهاجرت کرده و در ترمیم شرکت کنند (۲). سلول‌های بنیادی نواحی زیربطنی در پاسخ به سیگنال‌های پاتولوژیکی مختلف نظیر تروما، ایسکمی، التهاب و نورودژنراسیون و از بین رفتن میلین می‌توانند فعال شوند (۳). این سلول‌ها می‌توانند تا حدودی از مسیر طبیعی خود به سوی ناحیه آسیب تغییر جهت دهند و در ناحیه آسیب به فنوتیپ سلولی خاص آن منطقه تبدیل شوند (۴). خانواده عوامل رشد عصبی و واسطه‌های فعال کننده نوروژنزیس به‌طور طبیعی در سیستم عصبی وجود دارند (۵). در هنگام آسیب این عوامل از سلول‌های نواحی آسیب‌دیده آزاد شده و سبب القای تقسیم، مهاجرت، احیای سلول‌های بنیادی به سلول‌های پیش‌ساز عصبی و سلول‌های پیش‌ساز گلیالی و همچنین تمایز سلول‌های پیش‌ساز می‌گردند. بسیاری از عوامل دیگر شامل هورمون‌ها، نوروترانسمیترها و عوامل التهابی ماتریکس خارج سلولی می‌توانند در تنظیم، تکثیر، احیاء، مهاجرت و تمایز پیش‌سازهای عصبی و پیش‌سازهای گلیالی نقش داشته باشند (۶). یکی از مهم‌ترین مسایل در سلول‌درمانی استفاده از یک محرک مناسب برای افزایش سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط In vitro است. گیاه بابونه (Matricaria chamomilla) با نام علمی *Chamaemelum nobile* که در زبان فارسی به بابونه رومی شناخته می‌شود؛ در طب سنتی به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌گردد. این گیاه در قسمت‌های مختلف ایران همانند آذربایجان، فارس، خوزستان، اطراف تهران و دماوند و همچنین در جنگل فندقلو

اردبیل رشد می‌کند. گونه‌های دیگری از این گیاه نیز در نواحی مختلف اروپا یافت می‌شوند (۷و۸).

استفاده از داروهای گیاهی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های عصبی و خودایمنی گسترش بسیاری یافته است. گیاه بابونه به عنوان داروی آنتی‌اکسیدان (۹)، ضدالتهاب (۱۰)، ضداضطراب (۱۱و۱۲) و همچنین تسریع کننده ترمیم زخم (۱۳) استفاده می‌شود. تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای درباره اثر گیاه بابونه بر روی سلول‌های بنیادی عصبی صورت نگرفته است. در این مطالعه با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی در گیاه بابونه (۱۴و۱۵)، اثر عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه بر تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی و خاصیت آنتی‌آپوپتوتیک آن بررسی شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل در سال ۱۳۹۲ انجام شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه: عصاره گیاه به روش سوکسله تهیه و اثر غلظت‌های مختلف آن بر روی رشد و تکثیر رده سلولی بنیادی عصبی (NSCs) مورد بررسی قرار گرفت. گیاه بابونه از اطراف شهر اردبیل در خرداد ماه جمع‌آوری و در سایه و جریان هوا خشک و سپس پودر گردید.

از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری به روش سوکسله استفاده شد. صد گرم از پودر آماده در کارتوش‌هایی که از کاغذ صافی معمولی با اندازه مناسب تهیه شده بود؛ ریخته شد. سپس کارتوش‌ها را درون دستگاه سوکسله قرار دادیم و تقریباً به میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر مخلوط متانول و آب مقطر به عنوان حلال به آن اضافه گردید. عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت. عصاره حاصله به ظرف‌های شیشه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت بدون درپوش در آون ۵۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا حلال باقیمانده تا حد امکان تبخیر شود. سپس عصاره تهیه شده برای آزمایش‌های بعدی در یخچال نگهداری گردید.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی: برای جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از ۵ سر نوزاد موش صحرایی نژاد Sprague Dawley (تکثیر شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل) استفاده شد. مراقبت و نگهداری از موش‌ها مطابق با پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. بعد از بیهوشی کامل، بخش هیپوکامپ از دو نیمکره مغز جدا شد و پس از له‌کردن مکانیکی به میزان دو برابر بافت از آنزیم‌های Acutase و کلاژناز برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به منظور هضم آنزیمی استفاده گردید. در مرحله بعدی به منظور خنثی‌کردن آنزیم‌ها از سرم جنین گاوی FBS استفاده شد. سپس سوسپانسیون حاصله از فیلتر مش نایلونی ۷۰ میکرومتری عبور داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی حاصله با محیط کشت DMEM/F12 حاوی عامل رشد bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) به میزان ۲۰ نانوگرم، عامل رشد EGF (Epidermal Growth Factor) به میزان ۲۰ نانوگرم، B27 (۲ درصد)، پنی‌سیلین-استرپتومایسین (یک درصد) به همراه ۵ درصد سرم FBS در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 کشت داده شد. محیط کشت سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تعویض گردید و این عمل تا ۵ روز ادامه یافت. گروهی از سلول‌های بنیادی عصبی که به کف فلاسک چسبیده بودند و نوروسفرهای شناور نیز از سطح پلیت توسط سمپلر جمع‌آوری شدند و به درون فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل شدند و بعد از سانتریفوژ و پیپتاژ به پلیت دیگری منتقل شدند و با محیط کشت DMEM/F12 حاوی عامل رشد bFGF (۱۰ نانوگرم)، عامل رشد EGF (۱۰ نانوگرم)، B27 (یک درصد)، پنی‌سیلین-استرپتومایسین (یک درصد) به همراه ۵ درصد سرم FBS در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 کشت داده شد. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم ۸۰-۷۰ درصدی با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا و با نسبت ۱ به ۲ پاساژ داده شدند. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سوم استفاده گردید. به منظور تایید ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی از روش ایمونوسیتوشیمی و آنتی‌بادی نستین استفاده گردید. تمامی مواد مورد استفاده از شرکت سیگما (Sigma, Belgium) و اینویتروژن (Invitrogen, Germany) خریداری گردید.

تیمار سلول‌های بنیادی عصبی با عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه: سلول‌های بنیادی عصبی ایزوله شده از هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی در یک گروه کنترل و پنج گروه تیمار شده با عصاره مورد نظر در پلیت‌های ۹۶ خانه با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت تیمار و مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین برای بررسی اثر آنتی‌آپوپتوتیک عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه سلول‌های بنیادی عصبی در چهار گروه ۱) گروه کنترل اول (سلول‌های بنیادی عصبی)؛ ۲) گروه آزمون اول (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با ۶۰۰ µg/ml از عصاره بابونه)؛ ۳) گروه کنترل دوم (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با 50µM آب اکسیژنه H2O2 برای القای آپوپتوز) و ۴) گروه آزمون دوم (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با ۶۰۰ µg/ml از عصاره بابونه در شرایط آسیب اکسیداتیو) با روش MTT بررسی گردید. به منظور بررسی‌های آماری دقیق ۵ تکرار در نظر گرفته شد.

آزمون MTT: برای ارزیابی میزان تکثیر از روش MTT استفاده گردید. در ابتدا بعد از تریپسینه کردن سلول‌ها از فلاسک اصلی کشت شمارش سلولی انجام شد و تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه منتقل شد. پس از ۴۸ ساعت تیمار با عصاره

هیدروالکلی گل گیاه بابونه محیط کشت سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما) با غلظت ۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر که به صورت تازه تهیه شده بود؛ تعویض شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد محلول روی سلول‌ها به آهستگی حذف شد و کریستال‌های فورمازون ایجاد شده در اثر واکنش با MTT در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد. پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (BioTek) محاسبه شد.

بررسی آپوپتوز با استفاده از روش TUNEL: روش تشخیصی آپوپتوز براساس دستورالعمل کیت تانل (Roche, Germany) انجام پذیرفت. به طور خلاصه، محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی پس از تیمار ۴۸ ساعته در چهار گروه مورد مطالعه تخلیه شد و پس از ۳ بار شستشو با PBS به‌وسیله محلول پارافرمالدئید ۴درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت گردید. سپس محلول Blocking (۳درصد H2O2 در متانول) به مدت ۱۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه گردید و پس از شستشو با PBS در محلول Permeabilasation (تریتون ۰/۱ درصد در ۰/۱ درصد PBS) قرار داده شد. پس از خشک کردن اطراف نمونه ۵۰µl محلول Reaction mixture به سلول‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و جعبه مرطوب قرار داده شد. سپس ۵۰µl محلول Converter-POD اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای بررسی با میکروسکوپ نوری ۱۰۰µl-۵۰ محلول DAB-substrate اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس با PBS شسته شده و ۲۰µl DAB-Chromogen اضافه گردید. پس از شستشوی دوباره با PBS و مانته کردن به‌وسیله PBS و گلیسرول، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل شدند. داده به صورت Mean±SEM ارایه شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی عصبی: در ساعات اولیه کشت، سلول‌ها با زوائد بلند که گاهی چند برابر جسم سلولی بودند؛ مشاهده شدند. این سلول‌ها با سلول‌های مجاور ارتباط برقرار نموده و هسته‌ها کشیده‌تر به‌نظر می‌رسید. با افزایش زمان سلول‌ها دوکی‌تر شد و مرز بین سلول‌ها منظم‌تر و مشخص‌تر دیده شد. در روز اول پس از کشت، سلول‌ها کلونی تشکیل دادند. در روز دوم و سوم به مرور از حجم کلونی‌ها کاسته شد و سلول‌ها کم‌کم پخش شدند. این در حالی بود که همچنان سلول‌ها قدرت تقسیم داشتند و نمای ظاهری سلول‌های شبه‌عصبی را به‌دست آوردند. سلول‌های بنیادی عصبی بعد از ۷ روز کاملاً فلاسک را پر کردند و نمایی کشیده و دوکی‌شکل با زوائد سیتوپلاسمی به خود گرفتند (شکل ۱-A و ۱-B). این سلول‌ها قدرت تکثیر داشتند. برای اثبات عصبی بودن سلول‌های NSCs و تعیین خلوص آنها در پاساژ سوم از آنتی‌بادی Nestin استفاده گردید. در سلول‌هایی که پروتئین مربوطه وجود داشت؛ به دلیل استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کنژوکه به FITC سیتوپلاسمشان سبز رنگ دیده شدند. برای تعیین درصد سلول‌های مثبت، هسته سلول‌ها توسط اتیدیوم بروماید قرمز رنگ شدند (شکل ۱-C و ۱-D). میانگین درصد سلول‌های مثبت برای پروتئین Nestin ۹۸/۲۱±۰/۱۷ ارزیابی شد.

نتایج MTT : مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی پس از تیمار با عصاره گیاهی تغییری نداشت. با توجه به بررسی جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر و نتایج آزمون MTT ، در تمامی گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه، افزایش میزان جذب (نشان‌دهنده سلول‌های بنیادی عصبی زنده) نسبت به گروه کنترل وجود داشت (شکل ۲). بالاترین میانگین جذب در گروه سلولی تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰ µg/ml (۰/۱۵±۰/۶۱) و ۶۰۰ µg/ml (۰/۱۳±۰/۶۴) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۸±۰/۲) تعیین شد (P<۰/۰۵) و برای بررسی آپوپتوز از از غلظت ۶۰۰µg/ml استفاده گردید.

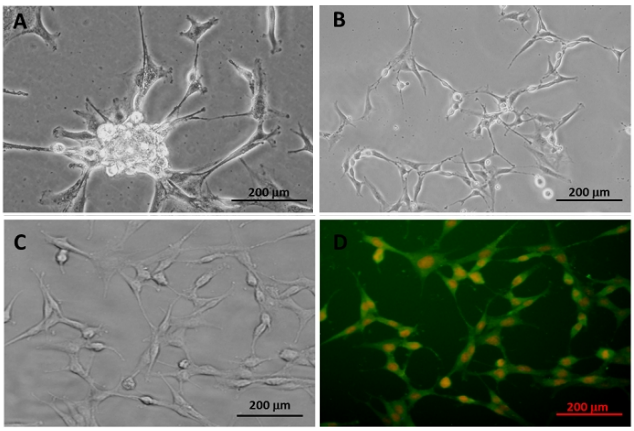
تست آپوپتوز با کیت تانل: با توجه به نتایج تست MTT پس از القای آپوپتوز، گروه تیمار شده با عصاره بابونه (۰/۱۶±۰/۲۷) اختلاف معنی‌داری با تمامی گروه‌های مورد آزمون داشت (P<۰/۰۵). پس از انجام تست تانل سلول‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره قابل رویت شدند (شکل ۳-B و ۳-C).

با توجه به یافته‌های تست MTT ، گروه آزمون دوم (۰/۱۵±۰/۱۵) اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل دوم (۰/۱۵±۰/۰۱) نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳-A). همچنین درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های کنترل دوم، آزمون دوم، کنترل اول و آزمون اول به ترتیب ۶۵/۱۷±۳/۳۶ و ۲۳/۵۵±۲/۲۱، ۳/۱۶±۰/۲۹ و ۷/۰۸±۰/۵۱ تعیین شد.

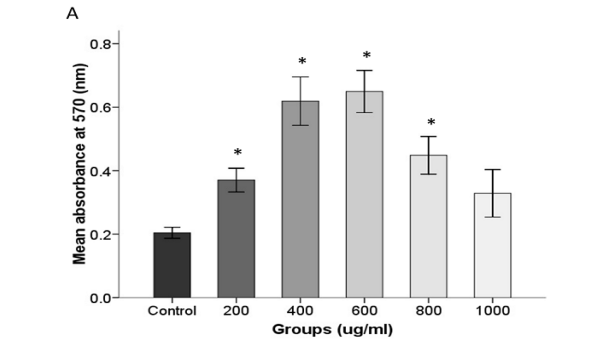
بحث

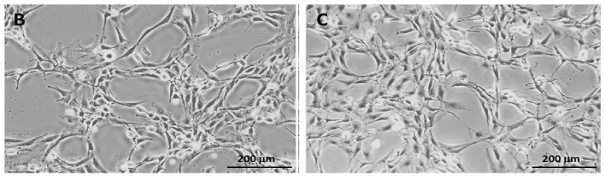
با توجه به نتایج این مطالعه عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه، باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی و کاهش سلول های آپوپتوتیک در شرایط آسیب اکسیداتیو با هیدروژن پراکسید گردید. در این مطالعه استفاده از روش‌های MTT assay و آزمون تانل مویدی بر نتایج حاصله بود.

در حال حاضر، یافتن درمان‌های موثر برای بسیاری از بیماری های سیستم عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون، سکته مغزی و MS کاری بسیار دشوار است. مرگ سلول‌های عصبی در مناطق



شکل ۱ : نمایش سلول‌های بنیادی عصبی استخراج شده از هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی. A) کلونی‌های سلول‌های بنیادی عصبی چسبیده به کف پلیت پس از ۲٤ ساعت؛ B) پر کردن سلول‌های بنیادی عصبی در کف فلاسک پس از یک هفته (حالت کشیده و دوکی‌شکل)؛ C) ایمونوسیتوشیمی از سلول‌های بنیادی عصبی (کنتراست)؛ D) ایمونوسیتوشیمی از سلول‌های بنیادی عصبی (فلورسنت)، رنگ سبز : آنتی‌بادی نستین، رنگ قرمز: اتیدیوم برماید

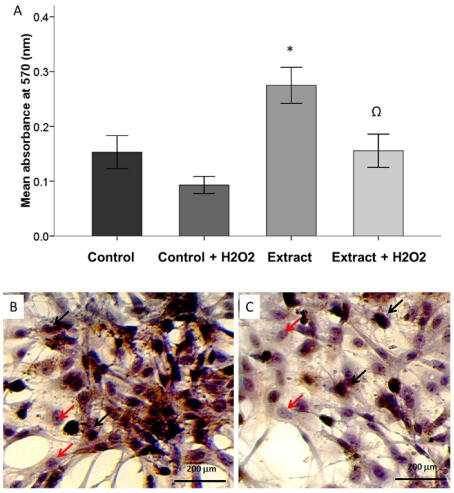




شکل ۲ : A) مقایسه سلول‌های بنیادی عصبی در غلظت‌های مختلف با روش MTT و وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار در غلظت‌های µg/ml ٤۰۰، ٦۰۰ و ۸۰۰ (P<۰/۰۵) B و C) میکروگراف‌های سلول‌های بنیادی عصبی قبل (B) و بعد (C) از تیمار با غلظت ٦۰۰µg/ml عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه

مختلف مغز و یا نخاع به عنوان یکی از ویژگی‌های مشترک این بیماری‌ها محسوب می‌شود. در حال حاضر برای درمان این بیماری‌ها پیوند سلول‌های عصبی پیشنهاد می‌شود (۱۶و۱۷).

جایگزینی سلول‌های از دست‌رفته در بیماری‌های مخرب سیستم عصبی از سال ۱۹۷۰ توسط Lindvall و Björklund مطرح شد (۱۸). سلول‌های بنیادی بالغین به عنوان منبع قابل دسترس و مناسب برای سلول درمانی محسوب می‌شوند (۱۹). در برخی از نواحی مغز بزرگسالان سلول‌های بنیادی عصبی وجود دارند که می توانند گزینه های قابل قبولی برای جایگزینی سلول‌های عصبی از دست



شکل ۳ : A) مقایسه سلول‌های بنیادی عصبی در چهار گروه کنترل اول (سلول‌های بنیادی عصبی)، آزمون اول (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با µg/ml ٦۰۰ از عصاره بابونه)، کنترل دوم (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با 50µM آب اکسیژنه H2O2برای القای آپوپتوز)، آزمون دوم (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با µg/ml ٦۰۰ از عصاره بابونه در شرایط آسیب اکسیداتیو) * P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل اول Ω P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دوم B و C) میکروگراف‌های سلول‌های بنیادی عصبی (B) گروه کنترل دوم (C) گروه آزمون دوم. پیکان‌های قرمز:نشان‌دهنده سلول‌های تانل منفی، پیکان‌های سیاه: سلول‌های تانل مثبت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین: هسته‌های تیره‌تر تانل مثبت، هسته‌های آبی رنگ: تانل منفی

رفته باشند (۱۷). البته این سلول‌ها از نظر تعداد محدود بوده و القای تکثیر در آنها می‌تواند کمبود آنها را در درمان بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی جبران نماید. از سوی دیگر گیاهان دارویی، با القاء تولید پروتئین‌های نوروتروفیک می‌توانند نقش حیاتی و موثر در درمان بیماری‌های عصبی داشته باشند (۱۷). با توجه به مطالعه قبلی ما، استاتین‌ها توانایی القاء سیگنال‌های داخلی و بیان ژن‌هایی می‌شوند که در تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی و مهار آپوپتوز نقش بسیار بالایی دارند (۲۰).

با توجه به حضور بالای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در عصاره گیاه بابونه، می‌توان خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را به این گروه از ترکیبات شیمیایی اختصاص داد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در بابونه عبارت از فلاوونوئیدها، آلفابیزابولول، کامازولین، فارنزن، کومارین‌ها است. همچنین گل این گیاه حاوی روتین، آپی‌ژنین و کوئرستین آزاد است (۲۳-۲۱). مطالعه Srivastava و Gupta نیز نشان‌دهنده خاصیت ضدتکثیری و القاء کنندگی آپوپتوز در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسانی است (۲۴). همچنین عصاره بابونه در سلول‌های طبیعی فعالیت ضدتکثیری بسیار ناچیزی داشته و هیچگونه آپوپتوزی در این سلول‌ها ایجاد نمی کند (۲۴).

با توجه به نتایج آزمون MTT در مطالعه حاضر، عصاره

هیدروالکلی گل گیاه بابونه ویژگی خود تکثیری را در سلول‌های بنیادی عصبی تشدید کرد. با افزایش دوز عصاره، میانگین جذب نوری (نمایانگر سلول‌های زنده) بیشتر شد. به‌طوری که بالاترین میزان رشد مربوط به گروه تیمار شده با ۶۰۰ µg/ml از عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه بود.

این نتایج می‌تواند فرصت بسیار خوبی برای استفاده از phytomedicine برای پیشگیری و همچنین درمان اختلالات عصبی از طریق مواد گیاهی باشد. علاوه بر این، استراتژی مبتنی بر نانوبیوتکنولوژی می‌تواند راه را برای عبور از این عوامل درمانی از سدخونی مغزی به آسانی هموار نماید (۲۵).

با توجه به نتایج این مطالعه و با درنظرگرفتن خاصیت ضدالتهابی گیاه بابونه می‌توان به اثرات مثبت استفاده از این گیاه در درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی از قبیل آسیب‌های نخاعی به‌ویژه در فاز اولیه امیدوار بود. از سویی دیگر کاهش میزان سلول‌های آپوپتوتیک در حضور عصاره بابونه می‌تواند نویدبخش استفاده این گیاه در درمان بیماری خودایمنی باشد. برای بررسی چگونگی مکانیسم عمل این عصاره بر روند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی و مکانیسم مهار آپوپتوز، به بررسی ترکیبات موجود در عصاره و مطالعات تکمیلی بیشتری نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گل گیاه بابونه تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی را افزایش داده و میزان آپوپتوز را در آنها کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های بی‌دریغ آقای دکتر سیدسعید هاشمین، معاون محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل نهایت تقدیر و سپاس خود را اعلام می‌دارند.

References

1. Bonilla S, Silva A, Valdés L, Geijo E, García-Verdugo JM, et al. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. Neuroscience. 2005;133(1):85-95.

2. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci. 2004 Sep; 117(Pt 19):4411-22.

3. Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, et al. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97(26): 14686-91.

4. Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, et al. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. Mol Cell Neurosci. 2003 Sep;24(1):171-89.

5. Watts C, McConkey H, Anderson L, Caldwell M. Anatomical perspectives on adult neural stem cells. J Anat. 2005; 207(3): 197-208.

6. Lennington JB, Yang Z, Conover JC. Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1: 99.

7. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. Mol Med Report. 2010 Nov; 3(6):895-901.

8. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (Matricaria chamomilla L.): An overview. Pharmacogn Rev. 2011 Jan-Jun; 5(9):82–95.

9. Cemek M, Kağa S, Simşek N, Büyükokuroğlu ME, Konuk M. Antihyperglycemic and antioxidative potential of Matricaria chamomilla L. in streptozotocin-induced diabetic rats. J Nat Med. 2008 Jul;62(3):284-93.

10. Schempp H, Weiser D, Kelber O, Elstner EF. Radical scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 (Iberogast) and its components. Phytomedicine. 2006;13(Suppl 5):36-44.

11. Weidner C, Wowro SJ, Rousseau M, Freiwald A, Kodelja V, Abdel-Aziz H, et al. Antidiabetic effects of chamomile flowers extract in obese mice through transcriptional stimulation of nutrient sensors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family. PLoS One. 2013 Nov; DOI: 10.1371/journal.pone. 0080335.

12. Awad R, Levac D, Cybulska P, Merali Z, Trudeau VL, Arnason JT. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. Can J Physiol Pharmacol. 2007 Sep;85(9):933-42.

13. Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, Pavesi VC, Mesquita-Ferrari RA, et al. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. Phytother Res. 2009 Feb; 23(2):274-8.

14. Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Calhelha RC, Carvalho AM, Santos-Buelga C, et al. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. Food Chem. 2013 Jan;136(2):718-25.

15. Han SL, Li XX, Mian QH, Lan W, Liu Y. [Comparison of antioxidant activity between two species of chamomiles produced in Xinjiang by TLC-bioautography]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2013 Jan;38(2):193-8. [Article in Chinese]

16. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. Lancet Neurol. 2011 Jul;10(7):649-56.

17. Taylor CJ, Jhaveri DJ, Bartlett PF. The therapeutic potential of endogenous hippocampal stem cells for the treatment of neurological disorders. Front Cell Neurosci. 2013 Jan 28;7:5.

18. Lindvall O, Björklund A. Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. NeuroRx. 2004; 1(4):379-81.

19. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev. 2006 May; 20(3):161-71.

20. Abdanipour A, Tiraihi T, Noori-Zadeh A, Majdi A, Gosaili R. Evaluation of lovastatin effects on expression of anti-apoptotic Nrf2 and PGC-1α genes in neural stem cells treated with hydrogen peroxide. Mol Neurobiol. 2014 Jun;49(3):1364-72.

21. Medina JH, Peña C, Levi de Stein M, Wolfman C, Paladini AC. Benzodiazepine-like molecules, as well as other ligands for the brain benzodiazepine receptors, are relatively common constituents of plants. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Dec; 165(2):547-53.

22. Wang F, Shing M, Huen Y, Tsang SY, Xue H. Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2005 Oct;4(5):575-85.

23. Kahnberg P, Lager E, Rosenberg C, Schougaard J, Camet L, Sterner O, et al. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA(A) receptor. J Med Chem. 2002 Sep;45(19):4188-201.

24. Srivastava JK, Gupta S. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. J Agric Food Chem. 2007 Nov;55(23):9470-8.

25. Jain KK. Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier. Nanomedicine (Lond). 2012 Aug;7(8):1225-33.

Original Paper

Effect of hydro-ethanolic extract of *Chamaemelum nobile* on cell prolifration and apoptosis of rat hipocample neural stem cells in the oxitative stress condition

Abdanipour A (Ph.D)*[1], Khatami SM (M.Sc)[2], Tiraihi T (Ph.D)[3], Satari MJ (M.D)[4]

[1]Assistant Professor, Department of Anatomy, Stem Cells Research Laboratory, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran. [2]M.Sc in Biology, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran. [3]Professor, Shefa Neurosciences Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Department of Pathology, Tehran, Iran. [4]Medical Student, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran.

Abstract

Background and Objective: Neural stem cells can difrentiate to mature neural cells. Neural stem cells can migrate and repair the damage neural tissue. This study was done to determine the effect of hydro-ethanolic extract of *Chamaemelum nobile* on cell prolifration and apoptosis of rat hipocample neural stem cells in the oxitative stress condition.

Methods: In this experimental study, neural stem cells were isolated from hippocampus of neonatal rat brain. Isolated neural stem cells were treated at 200, 400, 600, 800 and 1000 µg/ml of hydro-ethanolic extract of *Chamaemelum nobile* for 48h. Cells proliferation rate were evaluated by MTT assay. Anti-apoptotic property of hydro-ethanolic extract of *Chamaemelum nobile* evaluated using TUNEL assay method.

Results: Proliferation of neural stem cells were significantly increased in *Chamaemelum nobile* extract group in comparision with control ($P<0.05$). The rate of apoptotic cells were significantly reduced in *Chamaemelum nobile* extract group compared to control ($P<0.05$).

Conclusion: The hydrethanolic extract of *Chamaemelum nobile* increases proliferation rate and reduces apoptosis of neural stem cells in the oxitative stress condition.

Keywords: Neural stem cell, *Chamaemelum nobile*, Cell proliferation, Apoptosis

*** Corresponding Author: Abdanipour A (Ph.D), E-mail: abdani.anatomy@yahoo.com**

Received 14 Dec 2013 **Revised** 17 May 2014 **Accepted** 10 Jun 2014

This paper should be cited as: Abdanipour A, Khatami SM, Tiraihi T, Satari MJ. [Effect of hydro-ethanolic extract of *Chamaemelum nobile* on cell prolifration and apoptosis of rat hipocample neural stem cells in the oxitative stress condition]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 16(4): 14-20. [Article in Persian]