Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof

بررسی اثر کورکومین و کلروژنیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان

معصومه زیرک جوانمرد[۱]، نگین ستاره[۲]، ندا عابدپور[۳]*

۱. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

مشخصات نویسندگان:

نویسندگان	نام ونام خانوادگی	کد ارکید	شماره تماس (ثابت)	شماره تماس (همراه)	پست الکترونیک
اول	معصومه زیرک جوانمرد	0000-0002-9424-4289	32780803 (44+)	۰۹۱۴۳۴۸۶۴۹۵	zirak.m@umsu.ac.ir
دوم	نگین ستاره			۹۷۴۳۴۸۶۴۹۵	Nnnn7.ssss2@gmail.com
نویسنده مسئول	ندا عابدپور	0000-0002-7880-3263	32780803 (44+)	۰۹۱۲۷۹۰۹۷۴۴	abedpour.n@umsu.ac.ir

*نویسنده مسئول مکاتبات:

ندا عابدپور، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

---

[۱] دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] دانشجوی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof

کد پستی: ۵۷۵۶۱۱۵۱۱۱، ارومیه ایران
تلفن: ۳۲۷۸۰۸۰۳ (۹۸۴۴+)
فاکس: ۳۲۷۸۰۸۰۱ (۹۸۴۴+)
آدرس پست الکترونیکی: abedpour.n@umsu.ac.ir

Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof

مقایسه اثر کورکومین و کلروژنیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان

عنوان مکرری (کوتاه) مقاله: اثرکورکومین و کلروژنیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه تعیین اثر کورکومین و اسید کلروژنیک بر میزان زنده مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان می باشد.

مواد و روش ها: ۲۴ موش نر بصورت اتفاقی به چهار گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل، کورکومین، کلروژنیک اسید و گروه DMSO (Dimethyl sulfoxide) تقسیم شدند. کورکومین به میزان ۱۰ میکرو مول در لیتر به محیط کشت اضافه شد و سلول ها به مدت ۴۸ ساعت در معرض کورکومین حل شده در DMSO قرار گرفتند. همچنین در گروه اسید کلروژنیک، این ماده با دوز ۱۰ میلی مول (به مدت ۲۴ ساعت) به محیط کشت اضافه شد. پس از مراحل جداسازی، کشت و پاساژ سلول بنیادی استخراج شده از مغز استخوان، سلول‌ها تریپسینه و سپس سانتریوفیوژ شدند. جهت شمارش سلولی پس از ترکیب ۱۰میکرو لیتر از محیط سلول دار و ۱۰ میکرولیتر از تولوئیدین بلو تعداد سلول‌های زنده و مرده شمرده شد.

یافته‌ها: مجاورت سلول‌های بنیادی با کورکومین به مدت ۴۸ ساعت با دوز ۱۰ میکرو مول منجر به افزایش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم شده است. همین‌طور مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ده میلی مول کلروژنیک اسید به مدت ۲۴ ساعت نیز باعث افزایش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها شده است. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های کورکومین و کلروژنیک اسید در زنده‌مانی سلول‌ها دیده می‌شود و تأثیر کورکومین در این زمینه چشمگیرتر از کلروژنیک اسید بوده است.

نتیجه گیری: مقایسه اثر محافظتی کورکومین بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تکیه بر آنالیز آماری نشان داد که تاثیر کورکومین به مراتب بیشتر از کلروژنیک اسید بوده و اختلاف معنی دار بین این دو گروه درمانی حاکی از موثرتر بودن کورکومین در محافظت از مرگ و افزایش نسبت سلول های زنده به مرده است.

واژه های کلیدی : کورکومین، اسید کلروژنیک، سلول بنیادی مزانشیمی، زنده مانی سلول

Title: Comparison of the effect of curcumin and chlorogenic acid on the survival rate of bone marrow mesenchymal stem cells

Running Title: The effect of curcumin and chlorogenic acid on the viability of stem cells

Abstract

Introduction: The aim of this study is the effect of curcumin and chlorogenic acid on the survival rate of bone marrow mesenchymal stem cells.

Method: Twenty-four male mice were randomly divided into four groups of six; Control group, Curcumin, Chlorogenic acid and Dimethyl sulfoxide: DMSO group. 10 µmol/L Curcumin was added to the culture medium and the cells were exposed to curcumin dissolved in DMSO for 48 hours. Also, in the chlorogenic acid group, this substance was added to the culture medium with a dose of 10 mmol (for 24 hours). After isolation, culture and passage of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), the cells were trypsinized and then centrifuged. For cell counting, after mixing 10 µl of culture medium with cells and 10 µl of toluidine blue, the number of live and dead cells was counted.

Results: Exposure of stem cells to curcumin for 48 hours at a dose of 10 µmol resulted in a significant increase in cell viability compared to the control group. Also, the presence of mesenchymal stem cells with 10 mmol of chlorogenic acid for 24 hours significantly increased cell survival. Statistical analysis showed that there was a significant difference between the groups of curcumin and chlorogenic acid in cell survival and the effect of curcumin in this field was prominent than chlorogenic acid.

Conclusion: Comparison of the protective effect of curcumin on mesenchymal stem cells based on statistical analysis showed that the effect of curcumin is much greater than chlorogenic acid and a significant difference between these two treatment groups indicates that curcumin is more effective in protecting against death and increasing of live/dead cell ratio.

Key words: Curcumin, Chlorogenic acid, Mesenchymal stem cell, Cell viability

Just Accepted Manuscript Uncorrected Proof

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs)، سلول‌های تمایز نیافته ای هستند که قابل جداسازی از بافت های مختلف می باشند. مغز استخوان حاوی دو نوع سلول بنیادی ۱- سلول های بنیادی خونساز (Hematopoietic Stem Cells: HSCs) و ۲- سلول های استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: BMSCs) می‌باشد. BMSCs به دلیل چندتوان بودن، اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، دسترسی آسان، عدم ایمنی‌زایی و همچنین مزایای اخلاقی، به عنوان یک منبع ایده ال، کاندیدهای امیدوارکننده‌ای برای سلول‌درمانی، ژن درمانی و درمان سایر بیماریها محسوب می گردند (۳-۱). از محدودیت‌های مطرح در سلول درمانی با منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کاهش عملکرد و کم بودن زنده مانی آن‌هاست (۶-۴). اخیرا استراتژیهای ترکیبی مانند القای ژنتیکی، استفاده از مواد بیولوژیکی و آنتی اکسیدانی برای افزایش میزان زنده مانی و اثربخشی درمانی سلولهای بنیادی مزانشیمی بکار گرفته می شود. طی دهه گذشته مطالعاتی در زمینه استفاده از آنتی اکسیدان‌ها برای افزایش زنده مانی و تمایز سلول‌های بنیادی صورت گرفته است (۷). مطالعات متعددی در این زمینه صورت گرفته است که اثرات مهم آنتی اکسیدان ها را بر روی میزان زنده ماندن سلول، تکثیر و تمایز آن نشان می دهد. (۱۰-۸).

زردچوبه یکی از مهمترین و پرمصرف ترین ادویه جات با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی است که به ماده موثر آن کورکومین (Curcumin) می گویند (۱۱). مطالعات زیادی خواص آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی، ضد التهابی، ضد سرطان، ضد فشارخون و ضدآرترواسکلروز آن را نشان دادند (۱۵-۱۲). در مطالعه قبلی انجام شده، نشان داده شد که BMSCs پس از مجاورت با کورکومین در قلب ایسکمیک، باعث کاهش سایز ایسکمیک، تعداد سلولهای آپوپتوتیک، فاکتورهای سرمی آسیب قلبی و فیبروز می‌شود (۱۶). هنوز هم مطالعات بالینی فراوانی با استفاده از کورکومین به عنوان عامل درمانی تحت بررسی است (۱۸-۱۷).

اسید کلروژنیک یک ترکیب پلی فنول می‌باشد که از طریق مسیرهای درون سلولی آنتی اکسیداتیو و ضد التهابی اثرات گذاری می‌کند. خواص آنتی اکسیدانی و پراکنده کردن رادیکال های آزاد توسط CGA به خوبی شناخته شده است. CGA به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی با قدرت بالا به عنوان فاکتوری موثر سبب کاهش ریسک بروز بیماری‌های مزمن، افزایش توانایی، تحریک کاهش وزن آسان، کمک به سلامت قلب، کبد و طحال شناخته شده است (۲۵-۱۹).

از مطالعات محدود انجام شده در زمینه مواجهه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با کورکومین (۲۶) و اسید کلروژنیک (۲۷) تنها می‌توان به دوز احتمالی آنتی اکسیدانی مفید پی برد. در این تحقیق اثر این دو آنتی اکسیدان گیاهی در زمینه زنده مانی BMSCs مقایسه شده تا زمینه ای برای تحقیقات آینده فراهم شود.

مواد و روش ها

این مطالعه به روش تجربی بر روی ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ (محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم) انجام شد. آب و غذا به اندازه کافی در اختیار آنها قرار گرفت و در یک شرایط حرارتی ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد، نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبتی ۵۰-۴۰ درصد نگهداری شدند. برای انجام آزمایشات موش‌های مذکور با کتامین۱۰درصد (با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (با دوز۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش و سپس آسان کشی (با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی) شدند. سپس استخوان های ران و درشت نی تحت شرایط استریل جدا شدند، پس از آن بافت نرم و عضلات اطراف استخوان ها به طور کامل پاک شده و در داخل پتری دیش محتوای محیط کشت (DMEM : Dulecco modified Eagle medium) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی (FBS:Fetal Serum Bovin) ،۱۰۰ واحد بین المللی آنتی بیوتیک پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین قرارداده شد و به زیرهود منتقل گردید.

گروه های مورد مطالعه

۱-کنترل: با محیط کشت کم گلوکز بعد از پاساژ سوم بمدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند

۲-کورکومین: با دوز ۱۰ میکرو مول در لیتر مدت ۴۸ ساعت (حجم ۱۰۰ میکرولیتر) (۲۸)

۳- کلروژنیک اسید: با دوز ۱۰ میلی مول در لیتر مدت ۲۴ ساعت (حجم ۱۰۰ میکرولیتر) (۲۷)

۴- DMSO: به میزان ۱۰ میکرو مول در لیتر مدت ۴۸ ساعت

نحوه آماده سازی کورکومین

در این مطالعه از کورکومین با درجه خلوص ۹۶ جهت افزایش زنده‌مانی سلول‌ها استفاده شد. در گروه تحت درمان ۲، کورکومین (Sigma, USA) پس از حل شدن در(Sigma, USA) DMSO به میزان ۱۰ میکرو مول در لیتر (میزان دوز بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد) به محیط کشت اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در معرض کورکومین حل شده در DMSO قرار گرفت (۲۸).

نحوه آماده سازی اسید کلروژنیک

مقدار ۴۰- ۲۰ میلی گرم اسید کلروژنیک در ۰/۲ میلی لیتر فسفات بافر حل شده و پس از فیلتر با دوز ۱۰ میلی مول مدت ۲۴ ساعت به محیط کشت اضافه شد (۲۷).

کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از سلول های مغز استخوان موش صحرایی

به کمک قیچی استریل دو انتهای استخوان قطع و مغز استخوان با استفاده از یک سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲ حاوی محیط (DMEM) به روش Flashin در یک لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری تخلیه شد و سلول های بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند، پس از آن محیط رویی تخلیه شده و پلاک سلولی تشکیل شده، در ۱میلی لیتر محیط (DMEM) تازه معلق گردید و سپس ۵/. میلی لیتر از سلول، به هر فلاسک استریل کشت سلول که حاوی ۶ سی سی محیط کشت است اضافه شد، سپس فلاسک حاوی سلول به انکوباتور بادمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ co۲ منتقل گردید و بعداز ۳ روزمحیط رویی تعویض و سلول های غیر چسبنده، خارج گردیده و محیط تازه به فلاسک، اضافه گشت و محیط سلول ها هر۳- ۴ روز یکبار تعویض شد تا به سطح confluency ۸۰٪ برسند، سپس با استفاده از EDTA و Tripsin سلو ل ها ازکف فلاسک جدا و در فلاسک های جدید کشت داده شدند . در این مطالعه سلول های پاساژ سوم مورد استفاده قرار گرفت.

Just Accepted Manuscript Uncorrected Proof

رنگ آمیزی سلول‌ها باتولوئیدین بلو

بعد از گذشت ۴۸ ساعت برای کورکومین و ۲۴ ساعت برای اسیدکلروژنیک سلول‌ها را تریپسینه کرده (یک میلی لیتر تریپسین به مدت ۳ دقیقه داخل انکوباتور) و از کف پلیت جدا و سانتریوفیوژ نموده و با ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت مخلوط شدند. پس از پیپتاژ مکرر، ۱۰میکرو لیتر از محیط سلول دار و ۱۰ میکرولیتر از تولوئیدین بلو را ترکیب شد. سلول‌های مرده با جذب رنگ آبی تولوئیدین بلو به رنگ آبی پررنگ در آمده در حالیکه سلول های سالم با داشتن غشا سلول مانع از ورود محلول رنگی به داخل سلول می شود و بی رنگ دیده می شود. تعداد سلول‌های زنده و مرده در فضاهای مربوطه شمرده شده و میانگین آن‌ها هر کدام به تفکیک محاسبه شد، سپس درصد سلول‌های زنده در یک میلی‌لیتر مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\frac{\text{میانگین سلول‌های زنده/ میانگین سلول‌های مرده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times 100$$

روش تحلیل داده‌ها (Data Processing and Statistical Analysis)

پس از جمع آوری اطلاعات نتایج با استفاده از نرم افزار Spss (version 16) بررسی شدند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه آزمون one-way ANOVA و tukey post-test انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. از نظر آماری در آزمون‌های فوق $p<۰/۰۵$ معنی‌دار محسوب شد.

یافته ها

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می کنید، سلول های BMSCs با داشتن زوائد طویل چند وجهی و تنه دوکی‌شکل خود را نمایان کرده اند.

در این مطالعه به منظور بررسی اثر کورکومین و کلروژنیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان، در گروه‌های موردمطالعه تعداد سلول‌های زنده و مرده در خانه‌های بزرگ چهارگانه (۱۶ خانه) لام نئوبار بعد از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو شمارش‌شده و میانگین سلول‌های زنده و مرده به تفکیک برای هر نمونه محاسبه شد (شکل ۲).

چنانکه در نمودار ۱ مشاهده می‌شود مجاورت سلول‌های بنیادی با کورکومین به مدت ۴۸ ساعت با دوز ۱۰ میکرو مول منجر به افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم شده است. همین‌طور مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ده میلی مول کلروژنیک اسید به مدت ۲۴ ساعت نیز باعث افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) زنده‌مانی سلول‌ها شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های کورکومین و کلروژنیک اسید در زنده‌مانی سلول‌ها دیده می‌شود و تأثیر کورکومین در این زمینه چشمگیرتر از کلروژنیک اسید بوده است.

بحث

پیری MSCs عبارت از کاهش و محدود شدن توانایی ترمیم سلولی است (۲۹). در MSCs با افزایش تعداد پاساژها، خلوص سلولی افزایش می یابد و از طرفی افزایش سن MSCs باعث کاهش تعداد مارکرهای CD_{146} شده و خاصیت خود تکثیری کاهش پیدا می کند (۳۰). در مطالعات اخیر مشخص شده وزیکل های مترشحه از سلول های بنیادی پیر محتوی mRNA های اتوفاژیک بوده و قدرت خود ترمیمی وزیکل های مترشحه از سلول های مزانشیمی جوان بیشتر است (۳۱). پیری سلول های بنیادی مزانشیمی از محدودیت های رایج در سلول درمانی است، لذا اخیرا تحقیقاتی که در ارتباط با افزایش سن سلول های بنیادی است مورد توجه قرار گرفته است (۲۷). در تحقیق حاضر تاثیر دو آنتی اکسیدان طبیعی کورکومین و کلروژنیک اسید بر افزایش زنده مانی BMSCs بررسی شده است. مجاور کردن سلول ها با ۱۰ میکرومول بر لیتر کورکومین به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش زنده مانی سلول ها،

Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof

کاهش سلول های مرده و افزایش چشمگیر نسبت سلول های زنده به مرده شده است. کورکومین در سال ۱۹۱۰ از زردچوبه استخراج شده (۳۲) و تحقیقات مختلف in vitro و in vivo در زمینه خواص مفید آن انجام شده است (۳۳). Kim و همکاران در مطالعه خود نشان دادند کورکومین با دوز ۰/۵ mM به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش تعداد سلول های با Brdu مثبت و زنده مانی سلول های بنیادی عصبی (neural stem cells) شده است و این اثر از طریق تحریک ERK (extracellular signal-regulated kinase) و$P_{38}MAP$ (p38 mitogen-activated protein kinases) هدایت شده است (۳۴). در گزارش های منتشر شده دیگر، افزایش تکثیر سلول های پیش ساز چربی با دوز پایین کورکومین به مدت ۲۴ ساعت (۳۵) و کاهش آسیب اکسیداتیو سلولی که نتیجه افزایش سن سلول است بررسی شده است (۳۶). مطالعه اثر نانوذره کورکومین بر MSCs مستخرج از بافت چربی انسانی، خواص تکثیر دهندگی، آنتی اکسیدانی و تنظیم ایمنی را با تکیه بر آنالیزهای فلوسایتومتری، MTT، PCR و فعالیت سیتوکین ها نشان داده که این نانوذره باعث ترشح سیتوکین های Transforming growth factor beta: TGF-b و Interleukin-2: IL2 می شود که نقش اساسی در تکثیر سلولی دارند. علاوه بر این، آپوپتوز سلول ها در دوزهای کمتر از ۱۲ mM (۲۰ برابر) مهار شده و تکثیر سلولی نسبت به گروه کنترل ۲/۲ برابر شده است. آبشار ROS و سیتوکین های التهابی مهار شده و آنزیم های اکسیداتیو مانند "لیپواکسیژناز" و "سیکلواکسیژناز" توسط شاخه های متوکسی و فنولیک کورکومین مهار می شوند (۳۷).

همچنین در مطالعه حاضر بررسی اثر مجاورت ۱۰ میلی مول بر لیتر کلروژنیک اسید (CGA) به مدت ۲۴ ساعت نیز منجر به افزایش معنی دار زنده مانی BMSCs نسبت به گروه کنترل شد؛ مطالعه in vivo نکروز فمور موش صحرایی نشان می دهد که درمان توام نکروز با سلول های بنیادی مزانشیمی مستخرج از چربی انسانی همراه با تزریق ۲۰ mg/kg (CGA) به مدت چهار هفته باعث افزایش معدنی شدن سلول های بنیادی، افزایش جریان خون سر و گردن فمور، مهار افزایش بیان Bax وکاهش Bcl-۲ و کاهش بروز آپوپتوز در بافت استخوانی شده است (۳۸). تاثیر CGA از بعد آنتی اکسیدانی بر روی فیبروبلاست ها انجام شده است. سرب از عواملی است که باعث پیری پوست شده و در آلاینده های محیطی یافت می شود. سلول های فیبروبلاست که از عوامل اصلی تولید کلاژن پوست هستند به مدت ۴ ساعت با کلروژنیک اسید ۲۵ Mg/ml و ۴۰۰ Mg سرب مجاور شدند و پس از گذشت این دوره میزان TNFa و IL10 و ROS به عنوان اصلی ترین فاکتورهای التهابی در محیط سلول ها از طریق تست الایزا بررسی شدند و نتایج نشان دهنده کاهش معنی دار این فاکتورها نسبت به گروه کنترل بود (۳۹). بررسی اثر محافظتی CGA از بروز استرس اکسیداتیو سلولی بر روی استئوبلاست ها نشان داد که CGA باعث تکثیر استئوبلاست، افزایش زنده مانی سلول و کاهش فعالیت caspase-3 می شود و به این ترتیب سلول ها از پراکسیداسیون لیپید و هجوم رادیکال های آزاد در امان مانده و با افزایش آنزیم H0-1 مکانیسم دفاعی سلولی فعال شده و میزان محافظت افزایش می یابد (۴۰).

نتیجه گیری

مقایسه اثر محافظتی این آنتی اکسیدان طبیعی بر سلول های بنیادی مزانشیمی با تکیه بر آنالیز آماری نشان می دهد که تاثیر کورکومین به مراتب بیشتر از کلروژنیک اسید بوده و اختلاف معنی دار بین این دو گروه درمانی حاکی از موثرتر بودن کورکومین در محافظت از مرگ و افزایش نسبت سلول های زنده به مرده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی ارومیه حمایت شده است. (شماره مصوب پایان نامه: ۹۵۳۶، کد اخلاق در پژوهش: IR.UMSU.REC.1398.500). در ضمن تمام پیشنهادات و دستورات کمیته محترم اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه لحاظ شد.

منابع

Just Accepted Manuscript Uncorrected Proof

1. Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal stem cells current clinical applications: a systematic review. Arch Med Res 2021;52(1):93-101.

2. Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z. et al. Wound healing effects of curcumin: A short review. Curr Pharm Biotechnol 2016;17(11):1002-7.

3. Jamwal R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. J Integr Med 2018;16(6):367-74.

4. García-Bernal D, García-Arranz M, Yáñez RM, Hervás-Salcedo R, CortésA, Fernández-García M. et al. The Current Status of Mesenchymal Stromal Cells. Front Cell Dev Biol 2021;16;9:650664.

5. Lyublinskaya O, Borisov YG, Pugovkina N, Smirnova I, Obidina JV, Ivanova JS. et al. Reactive oxygen species are required for human mesenchymal stem cells to initiate proliferation after the quiescence exit. Oxid Med Cell Longev 2015;15(10):42-50.

6. Pérez Estrada C, Covacu R, Sankavaram SR, Svensson M, Brundin L. Oxidative stress increases neurogenesis and oligodendrogenesis in adult neural progenitor cells. Stem Cell Develop 2014;23(19):2311-27.

7. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Review article Oxidative stress mitigation by antioxidantshttps. Eur J Med Chem 2021;1;209:112891.

8. Halabian R, Tehrani HA, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. Lipocalin-2-mediated upregulation of various antioxidants and growth factors protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against unfavorable microenvironments. Cell stress and chaperones 2013;18(6):785-800.

9. Kumar Mekala N, Raju Baadhe R, Rao Parcha S, Devi Y. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord blood stem cells by L-ascorbic acid, in vitro. Curr Stem Cell Res Therapy 2013;8(2):156-62.

10. Drowley L, Okada M, Beckman S, Vella J, Keller B, Tobita K. et al. Cellular antioxidant levels influence muscle stem cell therapy. Mol Therapy 2010;18(10):1865-73.

11. Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z. et al. Wound Healing Effects of Curcumin: A Short Review. Current Pharmaceutical biotechnol 2016;17(11):1002-7.

12. Kuo M-L, Huang T-S, Lin J-K. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Dis 1996;1317(2):95-100.

13. Farhood B, Mortezaee K, Goradel NH, Khanlarkhani N, Salehi E, Nashtaei MS. et al. Curcumin as an anti-inflammatory agent: Implications to radiotherapy and chemotherapy. J Cell Physiol 2019;234(5):5728-40.

14. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. Bio Med Res Int 2014;2014:186864.

Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof

15. Du W, Zhang K, Zhang S, Wang R, Nie Y, Tao H. et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer. Biomaterials 2017;133:70-81.

16. Javanmard M. Curcumin Improves the Efficacy of BMSCs in Myocardial Ischemia Injury in Rat. Iranian Red Crescent Med J. 2019:135(2)146-59.

17. Wang N, Wang F, Gao Y, Yin P, Pan C, Liu W. et al. Curcumin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. J Pharmacol Sci 2016;132(3):192-200.

18. Ao XX, Huang H. Curcumin protects mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced apoptosis via Akt/mTOR/p70S6K pathway. Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6655-64.

19. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol 2011;25(2):287-302.

20. Marjault H-B, Allemand I. Consequences of irradiation on adult spermatogenesis: between infertility and hereditary risk. Mutat Res 2016;770:340-8.

21. Ståhl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E. et al. Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. Hum Reprod 2006;21(12):3199-205.

22. Cheng D, Zhang X, Tang J, Kong Y, Wang X, Wang S. Chlorogenic acid protects against aluminum toxicity via Mapk/Akt signaling pathway in murine raw264. 7 macrophages. J Inorg Biochem 2019;190:113-20.

23. Vukelić I, Detel D, Pučar LB, Potočnjak I, Buljević S, Domitrović R. Chlorogenic acid ameliorates experimental colitis in mice by suppressing signaling pathways involved in inflammatory response and apoptosis. Food Chemical Toxicol 2018;121:140-50.

24. Kato M, Ochiai R, Kozuma K, Sato H, Katsuragi Y. Effect of chlorogenic acid intake on cognitive function in the elderly: A pilot study. Evid Based Complement 2018;20(2):13-18.

25. Song J, Guo D, Bi H. Chlorogenic acid attenuates hydrogen peroxide‐induced oxidative stress in lens epithelial cells. Int J Mol Med 2018;41(2):765-72.

26. Pirmoradi S, Fathi F, Farahzadi R, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Zarghami N. Curcumin affects adipose tissue-derived mesenchymal stem cell aging through TERT gene expression. Drug Res 2018;68(04):213-21.

27. Li S, Bian H, Liu Z, Wang Y, Dai J, He W. et al. Chlorogenic acid protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic pathway. Eur J Pharmacol 2012;674(2-3):65-72.

28. Attari F, Zahmatkesh M, Aligholi H, Mehr SE, Sharifzadeh M, Gorji A. et al. Curcumin as a double-edged sword for stem cells: dose, time and cell type-specific responses to curcumin. J Pharm Sci 2015;23(1):33.

29. Zhang M, Du Y, Lu R, Shu Y, Zhao W, Li Z. et al. Cholesterol retards senescence in bone marrow mesenchymal stem cells by modulating autophagy and ROS/p53/p21Cip1/Waf1 pathway. Oxidat Med Cellular Longev 2016;15(4):25-30.

Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof

30. Abolhasani M, Rezaee MA, Mohammadi M, Ghadimi T, Mohammadi M, Rahmani MR. Immunomodulatory properties of umbilical cord vein mesenchymal stromal cells influenced by gestational age and in vitro expansion. Immunol Lett 2018;194:62-8.

31. Chung IH, Yamaza T, Zhao H, Choung PH, Shi S, Chai Y. Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. Stem Cell 2009;27(4):866-77.

32. Sharma R, Gescher A, Steward W. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005;41(13):1955-68.

33. Ye J, Zhang Y. Curcumin protects against intracellular amyloid toxicity in rat primary neurons. Int J Clin Experimen Me 2012;5(1):44-50.

34. Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M, Kim M-S, Kim HS. et al. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. J Biol Chem 2008;283(21):14497-505.

35. Kim J-H, Park S-H, Nam S-W, Kwon H-J, Kim B-W, Kim W-J. et al. Curcumin stimulates proliferation, stemness acting signals and migration of 3T3-L1 preadipocytes. Int J Mol Med 2011;28(3):429-35.

36. McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ, Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. Int J Mol Med 2007;19(1):165-72.

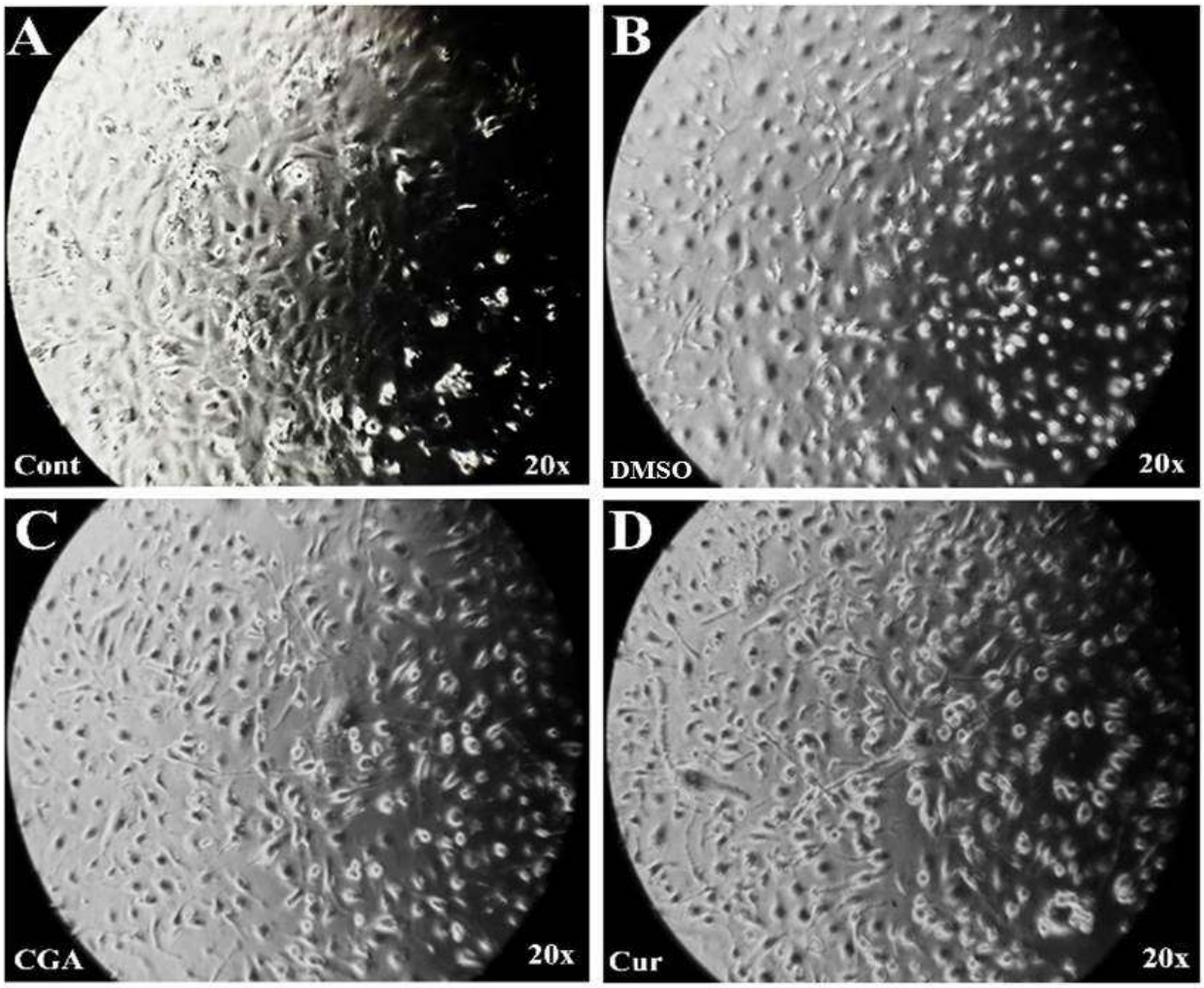
37. Yousefi F, Arab FL, Jaafari MR, Rastin M, Tabasi N, Hatamipour M. et al. Immunoregulatory, proliferative and anti-oxidant effects of nanocurcuminoids on adipose-derived mesenchymal stem cells. Neurochem Res 2019;38:405.

38. Zhang M, Hu X. Mechanism of chlorogenic acid treatment on femoral head necrosis and its protection of osteoblasts. Biomed Report 2016;5(1):57-62.

39. Girsang E, Lister I, Ginting C, Nasution S, Suhartina S, Munshy U. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activity of chlorogenic acid on lead-induced fibroblast cells. J Phys Conf Ser 2019: IOP Publishing.

40. Han D, Chen W, Gu X, Shan R, Zou J, Liu G. et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. Oncotarget 2017;8(9):14680.

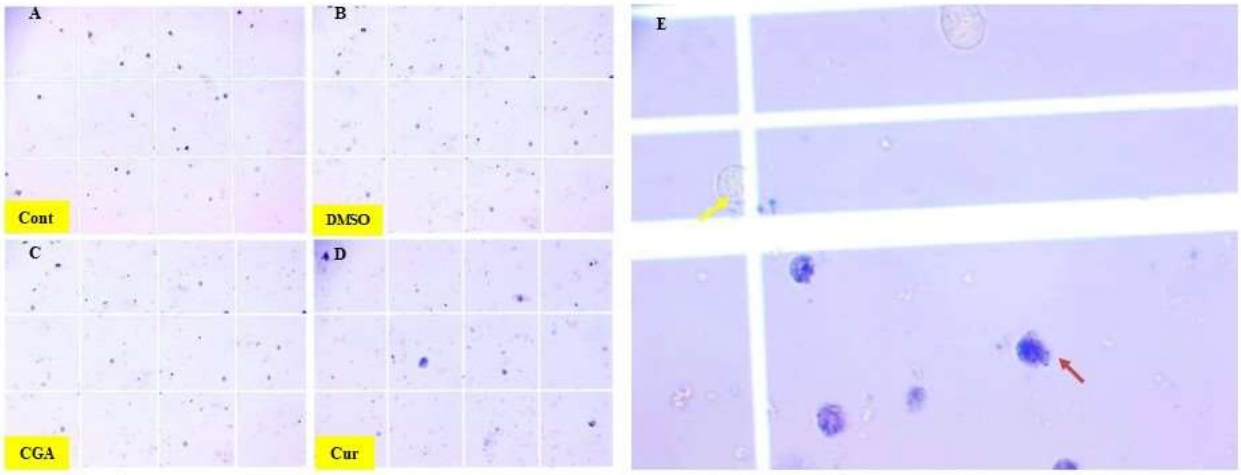
Just Accepted Manuscript, Uncorrected Proof



Just Accepted

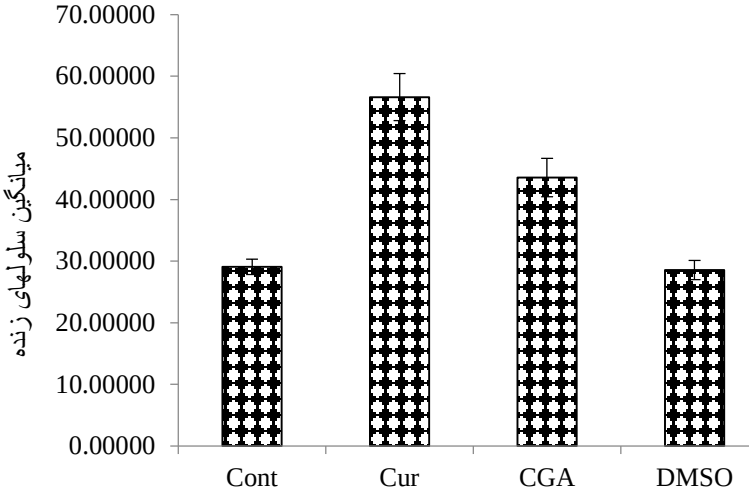
شکل ۱: تأثیر کورکومین و کلروژنیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

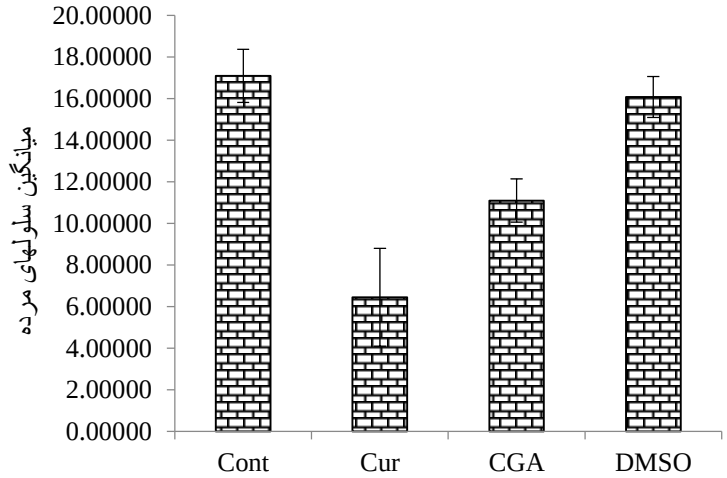
(A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروه کنترل که با داشتن زوائد طویل چند وجهی و تنه دوکی‌شکل مشخص‌شده‌اند. (B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با DMSO. (C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۴ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میلی مول کلروژنیک اسید. (D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میکرو مول کورکومین. Cont: کنترل، CGA: کلروژنیک اسید، Cur: کورکومین.

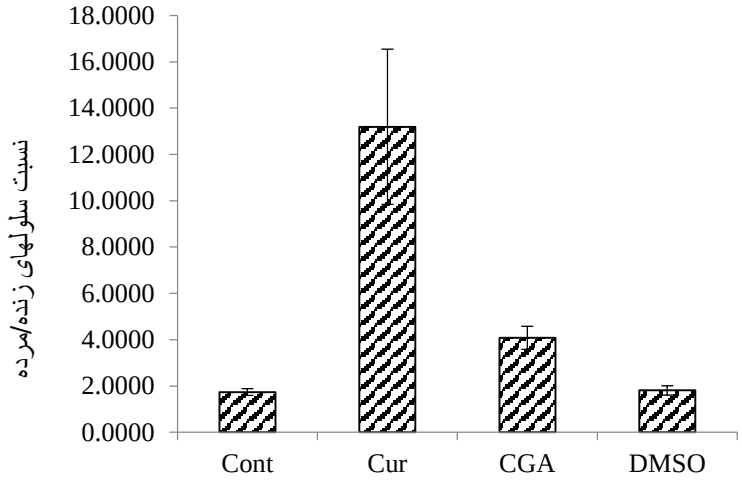


شکل ۲: بررسی اثر کورکومین و کلروژنیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های موردمطالعه با رنگ آمیزی تریپان بلو: A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروه کنترل , سلولهای مرده با رنگ آبی مشخص شده اند و سلولهای زنده بصورت بیرنگ دیده میشوند. B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با روغن‌زیتون. C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۴ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میلی مول کلروژنیک اسید. D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میکرو مول کورکومین. در تصویر با بزرگنمایی بالا (E) پایین فلش قرمز رنگ نشان دهنده سلول مرده و فلش زرد سلول زنده را نشان میدهد. Cont: کنترل، CGA: کلروژنیک اسید، Cur: کورکومین

Just Accepted Manuscript, Uncorrected







نمودار ۱: میانگین تعداد سلول‌های زنده (A)، مرده (B) و نسبت سلول های زنده به مرده (C) در گروه‌های موردمطالعه

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی دار تعداد سلولهای زنده در مقایسه با گروه کنترل و علامت # نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کورکومین می‌باشد. نتایج براساس میانگین ± خطای معیار (Mean± SEM) گزارش شده است. Cont: کنترل، CGA: کلروژنیک اسید، Cur: کورکومین.

Just Accepted, Unco