Jundishapur
Scientific Medical Journal

Research Paper

Comparison of the Effect of Curcumin and Chlorogenic Acid on the Survival Rate of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Masoumeh Zirak Javanmard[1], Negin Setareh[2], *Neda Abedpour[1]

1. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
2. Medical Student, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Zirak Javanmard M, Setareh N, Abedpour N. [Comparison of the Effect of Curcumin and Chlorogenic Acid on the Survival Rate of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2023; 22(2):247-257. 10.32592/JSMJ.22.2.247

https://doi.org/10.32592/JSMJ.22.2.247

ABSTRACT

Background and Objectives The present study aimed to determine the effect of curcumin and chlorogenic acid (CGA) on the survival rate of bone marrow mesenchymal stem cells.

Subjects and Methods Twenty-four male mice were randomly divided into four groups of six: Control, Curcumin, CGA, and Dimethyl sulfoxide (DMSO). Around 10 µmol/L Curcumin was added to the culture medium, and the cells were exposed to curcumin dissolved in DMSO for 48 h. In addition, in the CGA group, this substance was added to the culture medium with a dose of 10 mmol (for 24 h). 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 h at a dose of 10 µmol resulted in a significant increase in cell viability compared to the control group. Furthermore, the presence of mesenchymal stem cells with 10 mmol of CGA for 24 h significantly increased cell survival. Statistical analysis revealed a significant difference between the groups of curcumin and CGA in cell survival, and the effect of curcumin was more significant than CGA.

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 CGA, and a significant difference between these two treatment groups indicates that curcumin is more effective in protecting against death and increasing the live/dead cell ratio.

Keywords Cell viability, Chlorogenic acid, Curcumin, Mesenchymal stem cell

Received: 01 Feb 2023
Accepted: 19 Jul 2023
Available Online: 22 Jul 2023

Corresponding Author:
Neda Abedpour
Address: Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
Tel: (+44)32780803
E-Mail: abedpour.n@umsu.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells that can be isolated from different tissues. Bone marrow contains two types of stem cells: 1- Hematopoietic Stem Cells (HSCs) and 2- Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs). The BMSCs are promising candidates for cell therapy, gene therapy, and treatment of other diseases due to their pluripotency, immunomodulatory effects, easy access, non-immunogenicity, and ethical advantages. Recently, combined strategies, such as genetic induction and biological and antioxidant substances, are used to increase the viability and effectiveness of mesenchymal stem cell therapy. Turmeric is among the most important and widely used spices with strong antioxidant properties, and its active ingredient is called Curcumin. Many studies showed its anti-inflammatory, antimicrobial, anti-cancer, anti-hypertensive, and anti-artherosclerosis properties. Our previous study showed that BMSCs after exposure to curcumin in ischemic heart reduced ischemic size, number of apoptotic cells, serum heart damage factors, and fibrosis [16].

Chlorogenic acid (CGA) is a polyphenol compound that effects through anti-oxidative and anti-inflammatory intracellular pathways. The antioxidant and free radical scavenging properties of (CGA) are well known. The CGA has been known as an effective factor in reducing the risk of chronic diseases, increasing ability, stimulating easy weight loss, and helping the health of the heart, liver, and spleen due to its strong antioxidant properties. Based on all available knowledge, there is no information on the effect of these two natural antioxidants on the survival of BMSCs. The present study aimed to ivestigate the effect of curcumin and CGA on the survival rate of bone marrow mesenchymal stem cells.

Methods

This study was conducted experimentally on 24 adult male mice (weight range 250-300 g). Twenty-four male mice were randomly divided into four groups of six; Control, Curcumin, CGA, and Dimethyl sulfoxide (DMSO). Around 10 µmol/L Curcumin was added to the culture medium, and the cells were exposed to curcumin dissolved in DMSO for 48 h. In addition, in the CGA group, this substance was added to the culture medium with a dose of 10 mmol (for 24 h).

After isolation, culture and passage of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), the cells were trypsinized, and then centrifuged. For cell counting, after 48 h for curcumin and 24 h for CGA, 10 µl of culture medium with cells and 10 µl of toluidine blue were mixed, and the number of live and dead cells was counted. Dead cells were colored deep blue by absorbing toluidine blue dye, while intact cells prevented the colored solution from entering the cell and were seen colorless. The number of live and dead cells in the respective spaces was counted, and their average was calculated separately. Then, the percentage of live cells in one milliliter was calculated according to the following formula:

$$\frac{100 \times \text{mean live cells/mean dead cells}}{\text{Total number of cells}}$$

After data collection, the results were analyzed using SPSS software (version 16). Comparison between groups was done using one-way ANOVA and Tukey post-test, and the results were expressed as mean ± standard deviation.

Results

Exposure of stem cells to curcumin for 48 h at a dose of 10 µmol resulted in a significant increase in cell viability compared to the control group. In addition, the presence of mesenchymal stem cells with 10 mmol of CGA for 24 h significantly increased cell survival. Statistical analysis showed a significant difference between the groups of curcumin and CGA in cell survival, and the effect of curcumin in this field was more prominent than CGA.

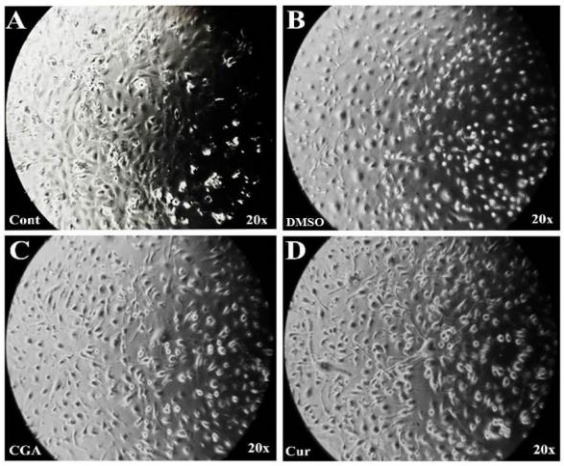


Figure 1. Effect of curcumin and CGA on the survival of mesenchymal stem cells. (A) Mesenchymal stem cells of the control group characterized by long polyhedral processes and spindle-shaped trunks. MSCs (B) 48 h after exposure to DMSO, (C) 24 h after exposure to 10 mM CGA, (D) 48 h after exposure to 10 µmol curcumin. Cont: Control, CGA: Chlorogenic acid, Cur: Curcumin

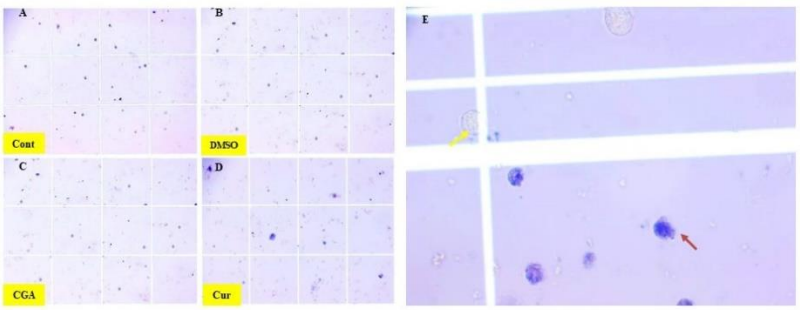


Figure 2. Effect of curcumin and chlorogenic acid on the survival of mesenchymal stem cells in the studied groups with trypan blue staining: A) mesenchymal stem cells of the control group, dead cells are marked with blue, and living cells are seen as colorless. B) Mesenchymal stem cells 48 h after exposure to olive oil. C) Mesenchymal stem cells 24 h after exposure to 10 mM CGA. D) Mesenchymal stem cells 48 h after exposure to 10 µmol curcumin. In the high-magnification image (E), the red arrow shows the dead cell, and the yellow arrow shows the live cell. Cont: control, CGA: chlorogenic acid, Cur: curcumin

Jundishapur
Scientific Medical Journal

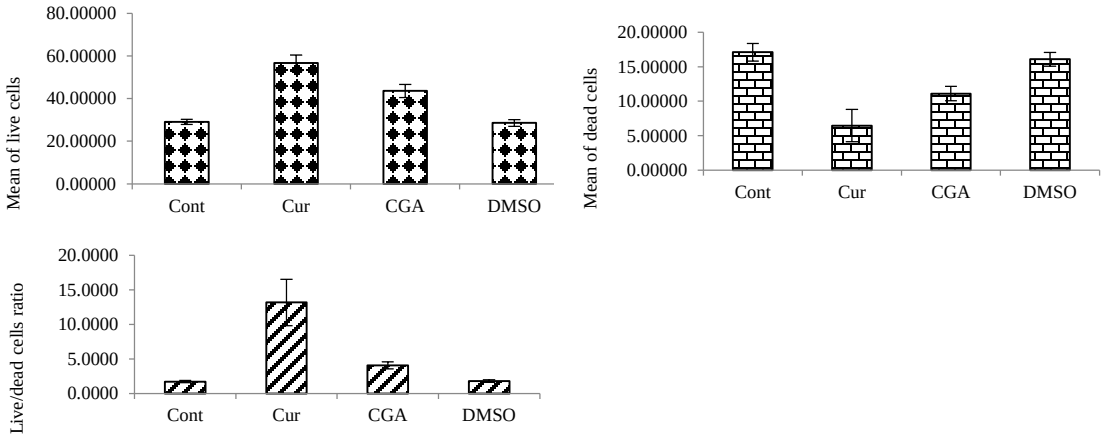


Chart 1. Mean of live cells (A), dead cells (B), and the live/dead cell ratio (C) in the studied groups. The results are reported based on mean ± standard error (Mean ± SEM).
* Indicates a significant difference in the number of living cells compared to the control group.
# Indicates a significant difference compared to the curcumin group.
Cont: Control, CGA: Chlorogenic acid, Cur: Curcumin

Conclusion

In this research, the effect of two natural antioxidants, curcumin and CGA, on increasing the survival of BMSCs has been investigated. Treatment of MSCs to 10 µmol/L curcumin for 48 h increased cell viability, decreased dead cells, and significantly increased the live/dead cell ratio. The previous reports investigated that a low dose of curcumin for 24 h increased the proliferation of adipose progenitor cells and decreased intracellular ROS and oxidative cell damage (that is the couse of cell aging). The study of the effect of curcumin nanoparticles on MSCs derived from human adipose tissue showed its proliferative, antioxidant, and immunomodulatory properties based on flow molecular methods, and cytokine activity analysis. In addition, they demonstrated that this nanoparticle causes the secretion of transforming growth factor-beta: TGF -b and Interleukin-2: IL2, which play an essential role in cell proliferation.

Furthermore, in the current study, investigating the effect of the proximity of 10 mmol/L CGA (CGA) for 24 h also led to a significant increase in the survival of BMSCs compared to the control group. An *in vivo* study showed that combined treatment of necrosis using MSCs derived from human fat + 20mg/kg CGA for four weeks increased stem cell mineralization and decreased incidence of apoptosis in bone tissue. The comparison of the protective effect of this natural antioxidant on mesenchymal stem cells based on statistical analysis shows that the effect of curcumin is far greater than that of the CGA, and the significant difference between these two treatment groups indicates that curcumin is more effective in protecting against death and increasing the live/dead cell ratio.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

Animals were housed in polypropylene cages bedded with a standard animal pellet diet and were maintained under conventional and management conditions. The ethical code of this study is IR.UMSU.REC.1398.210 which is issued by Urmia University, West Azerbaijan, Iran. these experiments were conducted according to established animal welfare guidelines.

Funding

This study was supported by Urmia University of Medical Sciences.

Authors contributions

Neda Abedpour; Masoumeh Zirak Javanmard: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper. Negin Setareh; Performed the experiments.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors give thanks to the Urmia University of Medical Sciences.

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

مقاله پژوهشی

بررسی اثر کورکومین و کلروژنیک‌اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان

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

۱. گروه علوم تشریح، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. دانشجوی پزشکی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Zirak Javanmard M, Setareh N, Abedpour N. [Comparison of the Effect of Curcumin and Chlorogenic Acid on the Survival Rate of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2023; 22(2):247-257. 10.32592/JSMJ.22.2.247

https://doi.org/10.32592/JSMJ.22.2.247

CC BY NC

چکیده

زمینه و هدف هدف از این مطالعه تعیین اثر کورکومین و اسیدکلروژنیک بر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان است.

روش بررسی تعداد ۲۴ موش نر به‌صورت اتفاقی، به چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند: گروه کنترل، کورکومین، کلروژنیک‌اسید و گروه DMSO (Dimethyl sulfoxide). کورکومین به میزان ۱۰ میکرومول در لیتر به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، در معرض کورکومین حل‌شده در DMSO قرار گرفتند. همچنین، در گروه اسیدکلروژنیک، این ماده با دوز ۱۰ میلی‌مول (به مدت ۲۴ ساعت) به محیط کشت اضافه شد. پس از مراحل جداسازی، کشت و پاساژ سلول بنیادی استخراج‌شده از مغز استخوان، سلول‌ها تریپسینه و سپس، سانتریوفیوژ شدند. برای شمارش سلولی پس از ترکیب ۱۰میکرولیتر از محیط سلول‌دار و ۱۰ میکرولیتر از تولوئیدین‌بلو، تعداد سلول‌های زنده و مرده شمرده شد.

یافته‌ها مجاورت سلول‌های بنیادی با کورکومین به مدت ۴۸ ساعت، با دوز ۱۰ میکرومول، به افزایش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم منجر شد. همین‌طور، مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ۱۰ میلی‌مول کلروژنیک‌اسید به مدت ۲۴ ساعت نیز باعث افزایش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها شد. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کورکومین و کلروژنیک‌اسید در زنده‌مانی سلول‌ها دیده می‌شود و تأثیر کورکومین در این زمینه، چشمگیرتر از کلروژنیک‌اسید بوده است.

نتیجه گیری مقایسه‌ی اثر محافظتی کورکومین بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تکیه بر آنالیز آماری نشان داد که تأثیر کورکومین به مراتب بیشتر از کلروژنیک‌اسید است و اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه درمانی حاکی از مؤثرتر بودن کورکومین در محافظت از مرگ و افزایش نسبت سلول‌های زنده به مرده است.

کلیدواژه‌ها کورکومین، اسیدکلروژنیک، سلول بنیادی مزانشیمی، زنده‌مانی سلول

تاریخ دریافت:۱۲ بهمن ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۲۸ تیر ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۱۳ تیر ۱۴۰۲

نویسنده مسئول:
ندا عابدپور
نشانی: گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
تلفن: ۳۲۷۸۰۸۰۳ (۹۸۴۴+)
رایانامه: abedpour.n@umsu.ac.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) سلول‌های تمایزنیافته‌ای هستند که می‌توان آن‌ها را از بافت‌های مختلف جداسازی کرد. مغز استخوان حاوی دو نوع سلول بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells: HSCs) و استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: BMSCs) است. BMSCs به‌دلیل چندتوان بودن، اثرهای تعدیل‌کننده‌ی ایمنی، دسترسی آسان، نداشتن ایمنی‌زایی و همچنین، مزایای اخلاقی، به‌عنوان منبعی ایدئال، کاندیدهای امیدوارکننده‌ای برای سلول‌درمانی، ژن‌درمانی و درمان سایر بیماری‌ها محسوب می‌شوند [۳-۱].

از محدودیت‌های مطرح در سلول‌درمانی با منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کاهش عملکرد و کم بودن زنده‌مانی آن‌هاست [۶-۴]. به‌تازگی، استراتژی‌های ترکیبی مانند القای ژنتیکی، استفاده از مواد بیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی برای افزایش میزان زنده‌مانی و اثربخشی درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار گرفته می‌شود. طی دهه‌ی گذشته، مطالعاتی در زمینه‌ی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای افزایش زنده‌مانی و تمایز سلول‌های بنیادی صورت گرفته است [۷]. مطالعات متعددی در این زمینه صورت گرفته است که اثرهای مهم آنتی‌اکسیدان‌ها را بر میزان زنده ماندن سلول، تکثیر و تمایز آن نشان می‌دهد [۱۰-۸].

زردچوبه یکی از ادویه‌های مهم و پرمصرف با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که به ماده‌ی مؤثر آن کورکومین (Curcumin) می‌گویند [۱۱]. مطالعات زیادی خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضدالتهابی، ضدسرطان، ضدفشارخون و ضدآرترواسکلروز آن را نشان داده‌اند [۱۵-۱۲]. در مطالعه‌ی قبلی، 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 به‌عنوان عامل درمانی، تحت بررسی است [۱۸-۱۷].

اسیدکلروژنیک ترکیبی پلی‌فنول است که از طریق مسیرهای درون‌سلولی آنتی‌اکسیداتیو و ضدالتهابی، اثرگذاری می‌کند. خواص آنتی‌اکسیدانی CGA و پراکنده کردن رادیکال‌های آزاد توسط آن به‌خوبی شناخته شده است. CGA به‌دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت بالا، به‌عنوان فاکتوری مؤثر، سبب کاهش ریسک بروز بیماری‌های مزمن، افزایش توانایی، تحریک کاهش وزن آسان، کمک به سلامت قلب، کبد و طحال می‌شود [۲۵-۱۹].

از مطالعات محدود انجام‌شده در زمینه‌ی مواجهه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با کورکومین [۲۶] و اسیدکلروژنیک [۲۷]، تنها می‌توان به دوز احتمالی آنتی‌اکسیدانی مفید پی برد. در این تحقیق، اثر این دو آنتی‌اکسیدان گیاهی بر زنده‌مانی BMSCs مقایسه شد تا زمینه‌ای برای تحقیقات آینده فراهم شود.

روش بررسی

این مطالعه به روش تجربی، درباره‌ی ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ (محدوده‌ی وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) انجام شد. آب و غذا به اندازه‌ی کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت و در وضعیت حرارتی ۲۰ تا ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، وضعیت نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و وضعیت رطوبتی ۴۰ تا ۵۰ درصد نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌ها، موش‌های مذکور با کتامین ۱۰ درصد (با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و سپس، آسان‌کشی (با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی) شدند.

سپس، استخوان‌های ران و درشت‌نی تحت شرایط استریل، جدا شدند و پس از آن، بافت نرم و عضلات اطراف استخوان‌ها به‌طور کامل، پاک شد و در داخل پتری‌دیش محتوی محیط کشت Dulecco modified Eagle medium (DMEM : medium)، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum:FBS)، ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین قرار داده شد و به زیر هود انتقال یافت.

گروه‌های مورد مطالعه

۱. کنترل: با محیط کشت کم‌گلوکز بعد از پاساژ سوم، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدن

۲. کورکومین: با دوز ۱۰ میکرومول در لیتر، مدت ۴۸ ساعت (حجم ۱۰۰ میکرولیتر) [۲۸]

۳. کلروژنیک‌اسید: با دوز ۱۰ میلی‌مول در لیتر، مدت ۲۴ ساعت (حجم ۱۰۰ میکرولیتر) [۲۷]

۴. DMSO: به میزان ۱۰ میکرومول در لیتر، مدت ۴۸ ساعت

نحوه‌ی آماده‌سازی کورکومین

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

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

نحوه‌ی آماده‌سازی اسیدکلروژنیک

مقدار ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم اسیدکلروژنیک در ۰/۲ میلی‌لیتر فسفات بافر حل شد و پس از فیلتر با دوز ۱۰ میلی‌مول، به مدت ۲۴ ساعت، به محیط کشت اضافه شد [۲۷].

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی

به کمک قیچی استریل، دو انتهای استخوان قطع شد و مغز استخوان با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره‌ی ۲۲ حاوی محیط DMEM، به روش Flashin، در لوله‌ی فالکون ۱۵میلی‌لیتری تخلیه شد و سلول‌های به‌دست‌آمده به مدت ۱۰ دقیقه، با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ شدند. پس از آن، محیط رویی تخلیه شد و پلاک سلولی تشکیل‌شده در ۱میلی‌لیتر محیط DMEM تازه معلق شد و سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر از سلول به هر فلاسک استریل کشت سلول که حاوی ۶ سی‌سی محیط کشت است، اضافه شد. سپس، فلاسک حاوی سلول به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 منتقل شد و بعد از ۳ روز، محیط رویی تعویض شد و سلول‌های غیرچسبنده خارج شدند و محیط تازه به فلاسک اضافه شد و محیط سلول‌ها هر ۳ الی ۴ روز یک بار تعویض شد تا به سطح confluency ۸۰ درصد برسند. سپس، با استفاده از EDTA و Tripsin، سلول‌ها از کف فلاسک جدا و در فلاسک‌های جدید کشت داده شدند. در این مطالعه، از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تولوئیدین‌بلو

بعد از گذشت ۴۸ ساعت برای کورکومین و ۲۴ ساعت برای اسیدکلروژنیک، سلول‌ها تریپسینه شدند (یک میلی‌لیتر تریپسین به مدت ۳ دقیقه داخل انکوباتور). سپس، از کف پلیت جدا و سانتریوفیوژ شدند و با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مخلوط شدند. پس از پیپتاژ مکرر، ۱۰ میکرولیتر از محیط سلول‌دار و ۱۰ میکرولیتر از تولوئیدین‌بلو ترکیب شدند.

سلول‌های مرده با جذب رنگ آبی تولوئیدین، به رنگ آبی پررنگ درآمدند؛ درحالی‌که غشای سلولی مانع از ورود محلول رنگی به داخل سلول‌های سالم شد و در نتیجه، سلول‌های سالم بی‌رنگ ماندند. تعداد سلول‌های زنده و مرده در فضاهای مربوط شمرده شد و میانگین آن‌ها به‌تفکیک محاسبه شد. سپس، درصد سلول‌های زنده در یک میلی‌لیتر مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

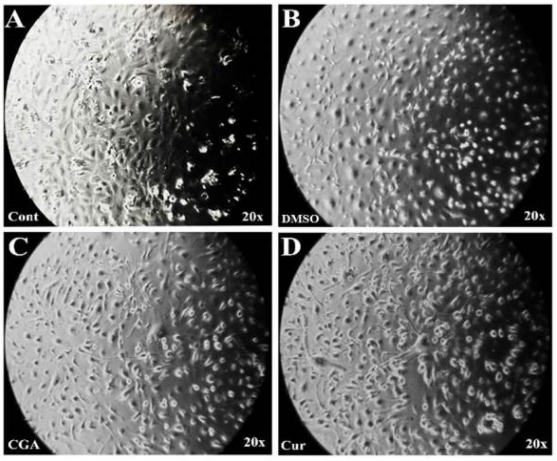
$$\frac{\text{میانگین سلول‌های زنده / میانگین سلولهای مرده}}{\text{تعداد کل سلولها}} * 100$$

روش تحلیل داده‌ها (Data Processing and Statistical Analysis)

پس از جمع‌آوری اطلاعات، نتایج با استفاده از نرم‌افزار Spss (version 16) بررسی شدند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه‌ی آزمون one-way ANOVA و tukey post-test انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. از نظر آماری، در آزمون‌های فوق، $P<0/05$ معنی‌دار محسوب شد.

یافته ها

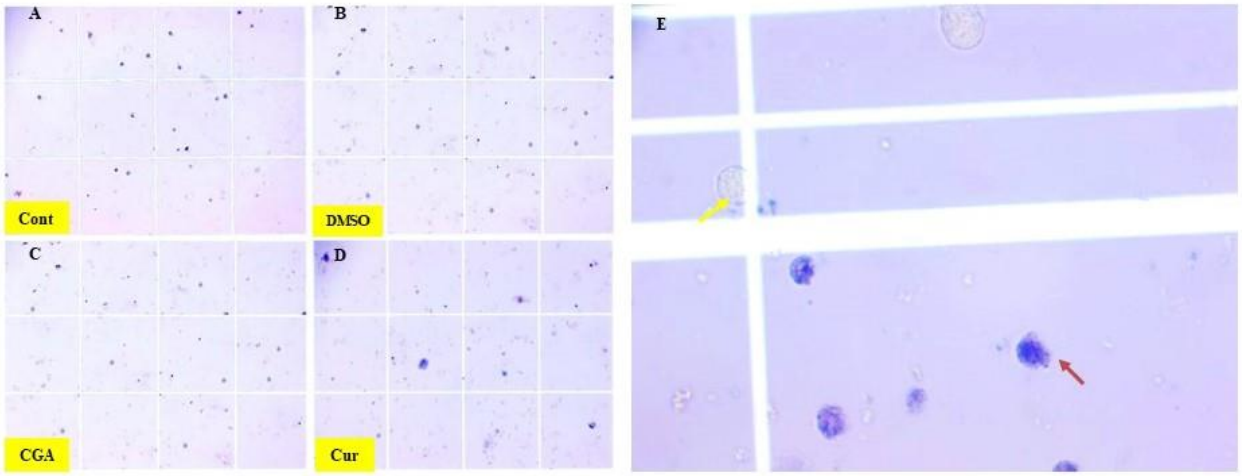
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سلول‌های BMSCs با داشتن زوائد طویل چندوجهی و تنه‌ی دوکی‌شکل، خود را نمایان کرده‌اند.



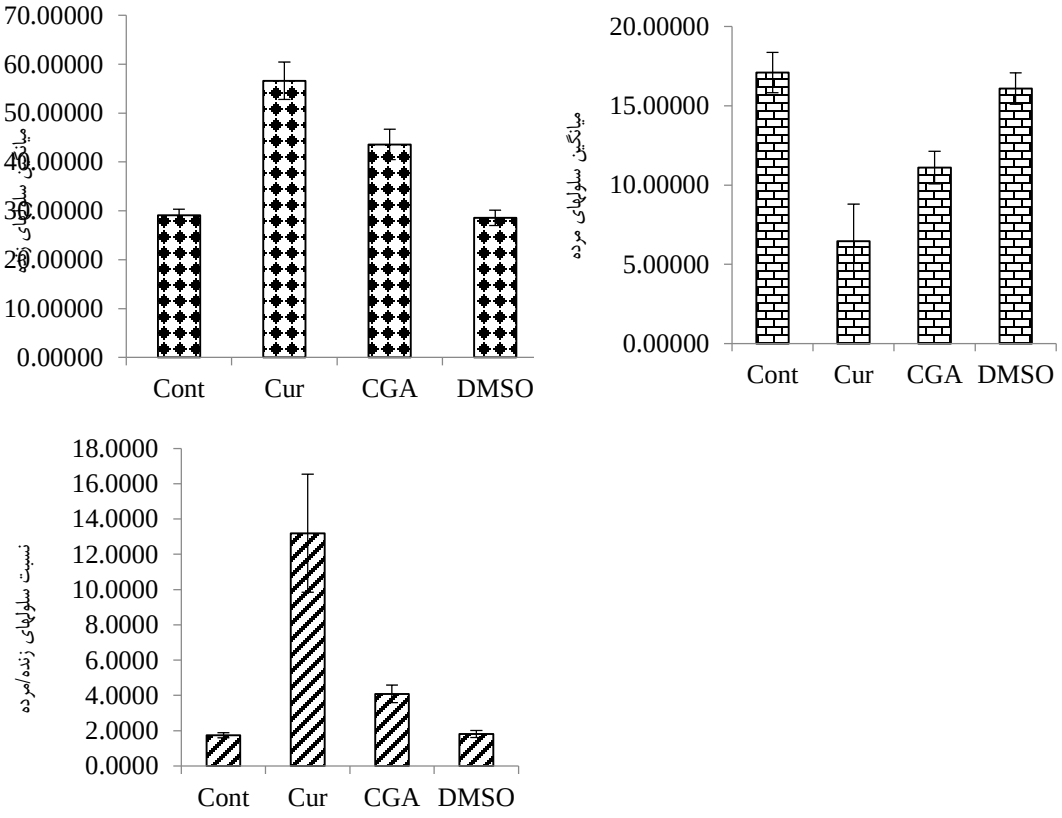
شکل ۱. تأثیر کورکومین و کلروژنیک‌اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

(A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروه کنترل که با داشتن زوائد طویل چندوجهی و تنه‌ی دوکی‌شکل مشخص شده‌اند؛ (B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با DMSO؛ (C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۴ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میلی‌مول کلروژنیک اسید؛ (D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میکرومول کورکومین. Cont: کنترل، CGA: کلروژنیک‌اسید، Cur: کورکومین.

به‌منظور بررسی اثر کورکومین و کلروژنیک‌اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان در گروه‌های مطالعه‌شده، تعداد سلول‌های زنده و مرده در خانه‌های بزرگ چهارگانه‌ی (۱۶ خانه) لام نئوبار بعد از رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو شمارش شد و میانگین سلول‌های زنده و مرده به‌تفکیک برای هر نمونه محاسبه شد (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی اثر کورکومین و کلروژنیک‌اسید بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های موردمطالعه با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو: A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروه کنترل، سلول‌های مرده با رنگ آبی مشخص شده‌اند و سلول‌های زنده به‌صورت بی‌رنگ دیده می‌شوند؛ B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با روغن زیتون؛ C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۴ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میلی‌مول کلروژنیک‌اسید؛ D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۸ ساعت بعد از مجاورت با ۱۰ میکرو مول کورکومین. در تصویر با بزرگ‌نمایی بالا (E) پایین فلش قرمزرنگ نشان‌دهنده سلول مرده است و فلش زرد سلول زنده را نشان می‌دهد. Cont: کنترل، CGA: کلروژنیک‌اسید، Cur: کورکومین.



نمودار ۱. میانگین تعداد سلول‌های زنده (A)، مرده (B) و نسبت سلول‌های زنده به مرده (C) در گروه‌های موردمطالعه
علامت * نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار تعداد سلول‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل و علامت # نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کورکومین است. نتایج بر اساس میانگین ± خطای معیار (Mean± SEM) گزارش شده است. Cont: کنترل، CGA: کلروژنیک‌اسید، Cur: کورکومین.

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

چنان‌که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، مجاورت سلول‌های بنیادی با کورکومین به مدت ۴۸ ساعت با دوز ۱۰ میکرومول، به افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم منجر شده است. همین‌طور، مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ۱۰ میلی‌مول کلروژنیک‌اسید به مدت ۲۴ ساعت، باعث افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) زنده‌مانی سلول‌ها شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کورکومین و کلروژنیک‌اسید در زنده‌مانی سلول‌ها دیده می‌شود و تأثیر کورکومین در این زمینه، چشمگیرتر از کلروژنیک‌اسید بوده است.

بحث

پیری MSCs عبارت است از: کاهش و محدود شدن توانایی ترمیم سلولی [۲۹]. در MSCs با افزایش تعداد پاساژها، خلوص سلولی افزایش می‌یابد و از طرفی، افزایش سن MSCs باعث کاهش تعداد مارکرهای CD_{146} می‌شود و خاصیت خودتکثیری کاهش پیدا می‌کند [۳۰]. در مطالعات اخیر، مشخص شده است که وزیکل‌های ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی پیر حاوی mRNAهای اتوفاژیک هستند و قدرت خودترمیمی وزیکل‌های ترشح‌شده از سلول‌های مزانشیمی جوان بیشتر است [۳۱]. پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی از محدودیت‌های رایج در سلول‌درمانی است؛ لذا، به‌تازگی، به تحقیقاتی که درباره‌ی افزایش سن سلول‌های بنیادی است، توجه شده است [۲۷]. در تحقیق حاضر، تأثیر دو آنتی‌اکسیدان طبیعی کورکومین و کلروژنیک‌اسید بر افزایش زنده‌مانی BMSCs بررسی شده است. مجاور کردن سلول‌ها با ۱۰ میکرومول بر لیتر کورکومین به مدت ۴۸ ساعت، باعث افزایش زنده‌مانی سلول‌ها، کاهش سلول‌های مرده و افزایش چشمگیر نسبت سلول‌های زنده به مرده شد. کورکومین در سال ۱۹۱۰، از زردچوبه استخراج شد [۳۲] و تاکنون، تحقیقات مختلف in vitro و in vivo در زمینه‌ی خواص آن انجام شده است [۳۳]. Kim و همکاران در مطالعه‌ی خود نشان دادند که کورکومین با دوز ۰/۵ mM به مدت ۲۴ ساعت، باعث افزایش تعداد سلول‌های با Brdu مثبت و زنده‌مانی سلول‌های 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 گزارش‌های منتشرشده‌ی دیگر، افزایش تکثیر سلول‌های پیش‌ساز چربی با دوز پایین کورکومین به مدت ۲۴ ساعت [۳۵] و کاهش آسیب اکسیداتیو سلولی که نتیجه‌ی افزایش سن سلول است، بررسی شده است [۳۶]. مطالعه‌ی اثر نانوذره‌ی کورکومین بر MSCs مستخرج از بافت چربی انسانی، خواص تکثیردهندگی، آنتی‌اکسیدانی و تنظیم ایمنی را با تکیه بر آنالیزهای فلوسایتومتری، MTT، PCR و فعالیت سیتوکین‌ها نشان داده و مشخص کرده است که این نانوذره باعث ترشح سیتوکین‌های Transforming growth factor beta: TGF-b و Interleukin-2: IL2 می‌شود که نقش اساسی در تکثیر سلولی دارند. علاوه بر این، آپوپتوز سلول‌ها 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 سیتوکین‌های التهابی و آنزیم‌های اکسیداتیو مانند لیپواکسیژناز و سیکلواکسیژناز را شاخه‌های متوکسی و فنولیک کورکومین مهار می‌کنند [۳۷].

همچنین، در مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر مجاورت ۱۰ میلی‌مول بر لیتر کلروژنیک‌اسید (CGA) به مدت ۲۴ ساعت، به افزایش معنی‌دار زنده‌مانی BMSCs نسبت به گروه کنترل منجر شد. مطالعه‌ی in vivo نکروز فمور موش صحرایی نشان می‌دهد که درمان نکروز با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مستخرج از چربی انسانی همراه با تزریق ۲۰ mg/kg کلروژنیک‌اسید به مدت چهار هفته، باعث افزایش معدنی شدن سلول‌های بنیادی، افزایش جریان خون سر و گردن فمور، مهار افزایش بیان Bax و کاهش Bcl-۲ و کاهش بروز آپوپتوز در بافت استخوانی شده است [۳۸].

تأثیر CGA از بعد آنتی‌اکسیدانی بر فیبروبلاست‌ها مشخص شده است. سرب از عواملی است که باعث پیری پوست می‌شود و در آلاینده‌های محیطی وجود دارد. سلول‌های فیبروبلاست که از عوامل اصلی تولید کلاژن پوست هستند، به مدت ۴ ساعت با کلروژنیک‌اسید ۲۵ Mg/ml و ۴۰۰ Mg سرب مجاور شدند و پس از گذشت این دوره، میزان TNFa و IL10 و ROS به‌عنوان فاکتورهای اصلی التهابی در محیط سلول‌ها از طریق تست الایزا بررسی شدند و نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش معنی‌دار این فاکتورها نسبت به گروه کنترل بود [۳۹]. بررسی اثر محافظتی CGA از بروز استرس اکسیداتیو سلولی روی استئوبلاست‌ها نشان داد که CGA باعث تکثیر استئوبلاست، افزایش زنده‌مانی سلول و کاهش فعالیت caspase-3 می‌شود و به این ترتیب، سلول‌ها از پراکسیداسیون لیپید و هجوم رادیکال‌های آزاد در امان می‌مانند و با افزایش آنزیم H0-1، مکانیسم دفاعی سلولی فعال می‌شود و میزان محافظت افزایش می‌یابد [۴۰].

نتیجه گیری

مقایسه‌ی اثر محافظتی این آنتی‌اکسیدان طبیعی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تکیه بر آنالیز آماری نشان می‌دهد که تأثیر کورکومین به مراتب بیشتر از کلروژنیک‌اسید است و اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه درمانی حاکی از مؤثرتر بودن کورکومین در محافظت از مرگ و افزایش نسبت سلول‌های زنده به مرده است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه به روش تجربی، بر روی ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ انجام شد. آب و غذا به اندازه کافی در اختیار آنها قرار گرفت و در وضعیت استاندارد نگهداری شدند. برای انجام آزمایشها، موشهای مذکور با کتامین و زایلازین بیهوش و سپس، آسان کشی)با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی(شدند. کد اخلاقی این پژوهش IR.UMSU.REC.1398.210 صادر شده توسط دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران می باشد. این آزمایش ها بر اساس دستورالعمل های رفاهی حیوانات انجام شد.

حامی مالی

این مطالعه با حمایت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انجام شد.

مشارکت نویسندگان

ندا عابدپور و معصومه زیرک جوانمرد: ایده و طراحی آزمایش ها، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها و نوشتن مقاله و ویرایش آن، نگین ستاره: انجام آزمایش.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه را دانشگاه علوم پزشکی ارومیه حمایت کرده است. نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تشکر می کنند. (کد اخلاق در پژوهش: IR.UMSU.REC.1398.210). در ضمن، تمام پیشنهادها و دستورهای کمیته‌ی محترم اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه لحاظ شد.

References

[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. [DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006] [PMID]

[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. [DOI: 10.2174/1389201017666160721123109] [PMID]

[3] Jamwal R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. J Integr Med. 2018;16(6):367-74. [DOI: 10.1016/j.joim.2018.07.001] [PMID]

[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. [DOI: 10.3389/fcell.2021.650664] [PMID] [PMCID]

[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. [DOI: 10.1155/2015/502105] [PMID] [PMCID]

[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. [DOI: 10.1089/scd.2013.0452] [PMID]

[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. [DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112891] [PMID]

[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. [DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112891] [PMID]

[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. [DOI: 10.2174/1574888x11308020006] [PMID]

[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. [DOI: 10.1038/mt.2010.160] [PMID] [PMCID]

[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. [DOI: 10.2174/1389201017666160721123109] [PMID]

[12] Kuo M-L, Huang T-S, Lin J-K. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. Biochim Biophys Acta. 1996;1317(2):95-100. [DOI: 10.1016/s0925-4439(96)00032-4] [PMID]

[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):5728-5740. [DOI: 10.1002/jcp.27442] [PMID]

[14] Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. Biomed Res Int. 2014;2014:186864. [DOI: 10.1155/2014/186864] [PMID] [PMCID]

[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. [DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.030] [PMID]

[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. [DOI: 10.5812/ircmj.86592]

[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. [DOI: 10.1016/j.jphs.2016.10.005] [PMID]

[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. [Link]

[19] Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25(2):287-302. [DOI: 10.1016/j.beem.2010.09.007] [PMID]

[20] Marjault H-B, Allemand I. Consequences of irradiation on adult spermatogenesis: between infertility and hereditary risk. Mutat Res Rev Mutat Res. 2016;770:340-348. [DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.07.004] [PMID]

[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. [DOI: 10.1093/humrep/del292] [PMID]

[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. [DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.11.001] [PMID]

[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. [DOI: 10.1016/j.fct.2018.08.061] [PMID]

[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 Alternat Med. 2018:8608497. [DOI: 10.1155/2018/8608497] [PMID]

[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. [DOI: 10.3892/ijmm.2017.3302] [PMID] [PMCID]

[26] Pirmoradi S, Fathi E, 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. [DOI: 10.1055/s-0043-119635] [PMID]

[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. [DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.06.033] [PMID]

[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. [DOI: 10.1186/s40199-015-0115-8] [PMID] [PMCID]

[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. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7524308. [DOI: 10.1155/2016/7524308] [PMID] [PMCID]

[30] bolhasani 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;194:62-68. [DOI: 10.1016/j.imlet.2017.11.008] [PMID]

[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 Cells. 2009;27(4):866-77. [DOI: 10.1002/stem.2] [PMID]

[32] Sharma R, Gescher A, Steward W. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer. 2005;41(13):1955-68. [DOI: 10.1016/j.ejca.2005.05.009] [PMID]

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

[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. [DOI: 10.1074/jbc.M708373200] [PMID]

[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. [DOI: 10.3892/ijmm.2011.680] [PMID]

[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. [PMID]

[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. [DOI: 10.17179/excli2019-1366] [PMID]

[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. [DOI: 10.3892/br.2016.679] [PMID]

[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. [DOI: 10.1088/1742-6596/1374/1/012006]

[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. [DOI: 10.18632/oncotarget.14747] [PMID] [PMCID]