

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Insulin Producing Cells Using the Extracts of *Allium ursinum* and *Silybum marianum*

Hossein Ranjbaran¹,
Saeid Abediankenari²,
Mohammad Azadbakht³,
Alireza Khalilian⁴,
Marzei Momeninezhad Amiri⁵,
Seyed Saeed Hosseini⁶,
Atena Majidi⁷

¹ PhD Student in Immunogenetics, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ PhD Student in Traditional Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ PhD Student in Traditional and Complementary Medicine, Traditional and Complementary Medicine Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 7, 2017 Accepted September 12, 2017)

Abstract

Background and purpose: Today, increased rate of demand for insulin is predictable due to increasing cases of diabetics in the world. Therefore, it is necessary to develop economic approaches and increasing the production of insulin for the future and medicinal plants could be regarded as a promising prospect for insulin production.

Materials and methods: The *Allium ursinum* and *Silybum marianum* were collected. Each herbarium was identified in School of Pharmacy affiliated with Mazandaran University of Medical Sciences and the extract was used by percolation with 70% ethanol extraction, after the solvent was evaporated by using the rotary. After the successful isolation of mesenchymal stem cells (MSCs), Wharton's jelly was derived and approved. Then, the mesenchymal stem cells were differentiated to pancreatic beta cells with two herbal extracts.

Results: Compared with the control group, there was a significant difference between the levels of insulin in the culture medium obtained from the two plants ($P= 0.0001$). In addition, via specific dithizone staining, the insulin producing cells (IPCs) were proven.

Conclusion: The extracts of *Allium ursinum* and *Silybum marianum* were found capable in inducing differentiation of the mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly into IPCs. *Allium ursinum* was seen with the highest rate of insulin production, while *Silybum marianum* had the lowest rate of insulin production, therefore, *Allium ursinum* could be more effective in treatment of diabetes.

Keywords: mesenchymal stem cells, insulin producing cells, *Allium ursinum*, *Silybum marianum*

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال به سلول های تولید کننده انسولین توسط گیاه والک کوهی و خار مریم

حسین رنجبران¹سعید عابدیان کناری²محمد آزاد بخت³علیرضا خلیلیان⁴مرضیه مومنی نژاد امیری⁵سید سعید حسینی⁶آتنا مجیدی⁷

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از سلول های بنیادی (Stem Cells)، که توانایی تمایز به سلول های بتا پانکراس را دارند، به عنوان روش جدیدی در درمان بیماری دیابت مورد استفاده قرار گرفته است. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی، افزایش تقاضا برای هورمون انسولین قابل پیش بینی است. روبرو شدن با این میزان تقاضا، توسعه روش های ارزان و ظرفیت تولید بالای انسولین برای آینده ضروری به نظر می رسد. استفاده از پتانسیل گیاهان دارویی، می تواند چشم انداز نوید بخشی برای تولید انسولین باشد.

مواد و روش ها: پس از جمع آوری پیاز والک و دانه خار مریم در هریاروم دانشکده داروسازی، و جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال از ژله وار تون (WJ-MSCs) و تمایز این سلول ها با استفاده از عصاره های گیاهی والک کوهی و خار مریم به سلول های بتای پانکراس، سطح انسولین ترشح شده در مایع رویی کشت سلولی این دو گیاه با استفاده از کیت الیزا اندازه گیری شد.

یافته ها: میزان سطح انسولین در سوپر ناتانت محیط کشت حاصل از این دو گیاه در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری بوده است. ($P = 0/0001$) ترشح انسولین توسط والک کوهی 160 U/ML و در خار مریم 3/14 به دست آمده است. همچنین با کمک رنگ آمیزی اختصاصی دیتیزون، سلول های تولید کننده انسولین مورد بررسی قرار گرفت.

استنتاج: والک کوهی و خار مریم هر دو توانایی القای تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال به سلول های تولید کننده انسولین (IPCs) را دارا می باشند. و بین این دو عصاره گیاهی، والک کوهی بیش ترین تولید انسولین و خار مریم کم ترین میزان تولید انسولین را داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت، در درمان دیابت استفاده از والک کوهی در مقایسه با خار مریم عصاره گیاهی موثرتری می باشد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs)، سلول های تولید کننده انسولین (IPCs)، دیابت، والک کوهی، خار مریم

مقدمه

شیمیایی، کم اثر و بی اثر بودن بعضی از این داروها در مصارف طولانی مدت، استفاده از گیاهان دارویی به

مصرف گیاهان دارویی در جوامع مختلف رو به افزایش است. و به دلیل نگرانی از عوارض داروهای

Email: abedianlab@yahoo.co.uk azadbakhtm@hotmail.com

مؤلف مسئول: سعید عابدیان کناری و محمد آزاد بخت - ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی و داروسازی ساری

1. دانشجوی دکتری پژوهشی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استاد، آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. دانشجوی دکتری طب سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

6. دانشجوی دکتری پژوهشی، مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

7. دانشجو داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1396/5/16 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1396/6/15 تاریخ تصویب: 1396/6/21

صورت جایگزین یا مکمل داروهای شیمیایی در حال گسترش می‌باشد. البته استفاده از داروهای گیاهی از ابتدای تمدن بشر رواج داشته است (1، 2). در بعضی از موارد نیز استفاده از داروهای گیاهی با عوارض کمتر و اثر بخشی بیشتر به جای درمان‌های طب رایج، ثابت شده است (3، 9).

دیابت شایع‌ترین اختلال متابولیکی در جهان محسوب می‌شود و در این بیماری توانایی تولید انسولین دچار اختلال می‌گردد. بروز دیابت ممکن است به علت کاهش ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس، یا مقاومت به انسولین و یا شامل هر دو مورد باشد (10). بر اساس آمار ارائه شده توسط IDF (International Diabetes Federation) در سراسر جهان 382 میلیون نفر مبتلا به دیابت هستند که 8/3 درصد آن بزرگسالان هستند و اکثریت آن‌ها نیز به دیابت نوع 2 مبتلا هستند. و برآورد می‌شود تا سال 2035 تعداد مبتلایان به دیابت به 592 میلیون نفر یعنی حدود 10 درصد از جمعیت بزرگسالان جهان را شامل شود (11، 13). به طور عمده دیابت به دو تیپ 1 و 2 تقسیم می‌شود. دیابت تیپ 1، اختلالی است که با تخریب خود ایمن سلول‌های بتای پانکراس به وجود می‌آید. در دیابت تیپ 2 اغلب مقاومت پیش‌رونده بدن به انسولین ایجاد می‌شود که در نهایت ممکن است به تخریب سلول‌های بتای پانکراس و نقص کامل تولید انسولین منجر شود. هر چند تا به حال علت دقیق بیماری مشخص نشده است ولی شواهدی مبنی بر تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی در القاء خود ایمنی وجود دارد (14). از طرفی تاکنون روش درمان قطعی برای دیابت پیدا نشده است، البته استفاده از داروهای خوراکی و تزریقی انسولین از درمان‌های رایج این بیماری محسوب می‌شود. هم‌چنین از روش پیوند پانکراس و سلول‌های جزایر لانگرهانس نیز استفاده می‌گردد. هر چند به دلیل رشد روز افزون بیماری دیابت و کمبود افراد اهدا کننده، استفاده از پیوند پانکراس دچار محدودیت است.

در این راستا استفاده از سلول‌های بنیادی (Stem Cells) که توانایی تمایز به سلول‌های بتا پانکراس را دارند به عنوان روش جدید، مورد استفاده قرار گرفته می‌شود (15). سلول‌های بنیادی، سلول‌های تخصص یافته با قدرت تکثیر بالا هستند که دارای دو ویژگی اصلی شامل، قابلیت تمایز (Differentiation) و خود نوسازی (Self-Renewal) می‌باشند (16). سلول‌های بنیادی می‌توانند تقسیم‌های مکرر انجام داده و خاصیت چند توانگی (Multipotency) خود را نیز حفظ کرده و در صورتی که محرک خاصی به آن اضافه شود، قادرند به انواع گوناگون سلول‌های اختصاصی تمایز یابند (17). سلول‌های پانکراس در حال تکوین، فاکتورهای را تولید می‌نماید که سبب تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شوند (18). سه شرط اثبات هویت سلول‌های مزانشیمال از سایر سلول‌ها شامل اتصال و چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک در محیط کشت، بیان بعضی از مارکرها و عدم بیان مارکهای دیگر و قابلیت تمایز به سلول‌های چربی، استخوان و غضروف می‌باشند. با توجه به این که تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان بسیار مشکل است و در بعضی از موارد ممکن است رعایت مسائل اخلاقی صورت نگیرد، پژوهشگران به دنبال استفاده از منابع جایگزین، مانند خون بند ناف، ژله وارتون و جفت می‌باشند (19، 21). چون این بافت‌ها (بند ناف و ژله وارتون پس از زایمان دور ریخته می‌شوند بنابراین هیچ گونه خطری برای نوزاد و مادر ایجاد نمی‌کنند. امروزه گرایش به سمت استفاده از این منابع به جای مغز استخوان می‌باشد.

لئون-کوئینتو (Leon- Quinto) و همکاران در سال 2004، تعدادی فاکتور اگزوزن را کشف کردند که در صورت استفاده اصولی قادر به القا تمایز هستند. این سیستم شامل روش کار سه مرحله‌ای انتخاب تمایز است، هم‌چنین این روش انتخابی با کاهش غلظت سرم از 15 درصد به 3 درصد و اضافه کردن فاکتورهای

انتخابی از قبیل نیکوتین آمید و Sonic hedgehog منجر به تمایز سلول ها به سمت سلول های پانکراس شده است (22، 23).

سگو (Segev) و همکاران در سال 2004، گزارش کردند که می توان با استفاده از سلول های بنیادی جنینی انسان، سلول های ترشح کننده انسولین را تولید کرد. این تغییرات در مرحله آخر تمایز با کاهش غلظت گلوکز در محیط، حذف bFGF و اضافه کردن نیکوتین آمید به کشت انجام شد (24).

آمور (Amour) و همکاران در سال 2005، تاکید کردند که استفاده ی منطقی از چندین فاکتور تمایزدهنده با تقلید از شرایط موجود زنده، می تواند به تولید سلول های بتای حقیقی با راندمان بالا کمک کند (25).

سیپون (Sipione) و همکاران در سال 2004، هانسون و همکاران در سال 2004، و راجا گوپال (Rajagopal) و همکاران در سال 2003، در مطالعاتشان به این موضوع پرداختند که سلول های بنیادی پیوندی موجب بهبودی دیابت می شود. در این مطالعات آن ها گزارش کرده اند که مولدین اصلی انسولین / پروانسولین در محیط کشت، نورون ها و پیش سازهای عصبی هستند (26، 28).

در مطالعه دیگر در سال 2016، بر روی عصاره برگ Myrtus نشان داده شد به طور معنی داری باعث کاهش گلوکز سرم در موش های دیابتی شده است (29).

والک یکی از گونه های سیر و به اصطلاح سیرکوهی می باشد. نام علمی آن *Allium ursinum* L و نام انگلیسی آن Wild Garlic یا Board-Leaved Garlic و از خانواده Liliaceae محسوب می شود. والک بسیار ملایم تر و شیرین تر از سیر معمولی است و بیش تر مصرف دارویی دارد. والک دارای ترکیبات گوگردی است و خواص دارویی متعددی برای آن بیان شده است. اثرات ضد میکروبی، سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدان نیز برای آن ذکر شده است. برای قرن ها والک در پزشکی سنتی استفاده شده است. با این حال،

مطالعات در مورد ترکیب و فعالیت دارویی آن نسبتا جدید می باشد (30).

گیاه خار مریم از تیره کاسنی است که به نام علمی *Silybum marianum* (L) Gearth شناخته می شود. عصاره بذر این گیاه دارای ترکیبات زیادی است مانند: سیلی دیانین، سیلیپین A و B، آپی ژنین، سیلی کریستین، دی هیدرو سیلیپین، دی اکسی سیلی کریستین، دی اکسی سیلی دیانین و ... می باشد. عصاره دانه خشک خار مریم دارای 1 تا 4 درصد سیلی مارین است که شامل فلاونوئیدها از جمله سیلیپین A و B، دی هیدرو سیلیپین، سیلی دیانین و سیلی کریستین است (31). مطالعات تایید می کند که سیلی مارین، پانکراس را از آسیب ناشی از مواد شیمیایی از جمله آلوکسان و سیکلو سپورین محافظت می نماید (جدول شماره 1) (32، 33).

جدول شماره 1: مشخصات *Allium ursinum* L and *Silybum marianum* (L)

خانواده	نام بومی گیاه	نام طب سنتی	نام علمی گیاه	نام لاتین گیاه	ردیف
رشته کوه های البرز	سیر جنگلی	والک کوهی	<i>Allium ursinum</i> L.	Wild garlic	1
سرآبر جهان به ویژه ایران	خار مریم	حرشف	<i>Silybum marianum</i> (L)	Milk thistle	2

تلاش های فراوانی جهت تولید سلول های مولد انسولین (IPCs) یا (Insulin producing cells)، در درمان دیابت با استفاده از سلول درمانی صورت گرفته است. تمایز سلول های بنیادی به IPCs یکی از روش های جدید در درمان دیابت به ویژه نوع یک به شمار می رود (34).

تاکنون تحقیقات زیادی جهت تولید سلول های بنیادی مزانشیمال و تمایز آن ها به سلول های بتای پانکراس با استفاده از مولکول های مختلف انجام شده است ولی موفق به تولید کامل سلول های بتای پانکراس نشده اند. لذا هدف از این پژوهش جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال از ژله وار تون و تمایز آن ها با استفاده از دو عصاره گیاهی *Allium ursinum* L (والک کوهی) و *Silybum marianum* (L) (خار مریم) در محیط کشت سلولی به سلول های تولید کننده انسولین (IPCs) می باشد تا از این طریق بتوان روشی نو در تولید

سلول‌های بتای پانکراس با هزینه کم‌تر و منابع بیش‌تر ترسیم نماییم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی (Experimental)، بند ناف در هنگام زایمان توسط فوق تخصص زنان و زایمان در اتاق عمل مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) شهرستان ساری از جنین تازه به دنیا آمده جدا گردید. بند ناف در شرایط کاملاً استریل به روش سزارین الکتیوازی بیش از 8 مادر که فرم رضایت کتبی و آگاهانه را امضاء کردند به دست آمد. سپس بند ناف را در محیط کشت سلولی DMEM در ظرف استریل درب دار قرار داده و در مدت یک ساعت آن را به آزمایشگاه دانشکده پزشکی ساری با رعایت زنجیره سرما (دمای منفی 4 درجه سانتی گراد) انتقال داده شد. آنگاه در زیر هود لامینار در یک پلیت 10 میلی متری، کلیه لخته‌های خونی و عروق از بند ناف جدا و سپس به روش مکانیکی به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. به این قطعات کوچک بندناف که از آن سرخرگ و سیاهرگ خارج شده است و حاوی لایه ژلاتینی می‌باشند ژله وارتون می‌گوییم. سپس این ژله به دست آمده، در PBS در دور 1250 RPM به مدت 5 دقیقه شستشو داده شد. و 30 میلی لیتر از محلول کلاژناز (آمریکا، سیگما) به غلظت 1 میلی گرم در میلی لیتر به آن اضافه شد سپس در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد و 5 درصد CO₂ به مدت 1 ساعت انکوبه گردید. سپس ژله وارتون به دست آمده را به محیط کشت High Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium (HG-DMEM)+ FBS (Fetal Bovine Serum) 15%+Penicillin 100U/ml+ Streptomycin 100µg/ml (2mMOL-L Glutamin) انتقال داده شد.

سپس محلول حاصل در همان شرایط قبل سانتریفوژ گردید، و به رسوب سلولی، محلول تریپسین 0/25 درصد که حاوی 1 میلی مولار EDTA است (آمریکا، سیگما) اضافه شد و در انکوباتور با شرایط قبلی به مدت 30 دقیقه انکوبه گردید. سپس رسوب

سلولی را دو بار شستشو و سانتریفوژ کرده و از فیلتر با منافذ 70 میکرون عبور داده شد. به منظور لیز RBC های باقی مانده در نمونه، 2 میلی لیتر از محلول هایپوتونیک کلرید آمونیوم (آمریکا، فارمین ژن) به نمونه افزوده و پس از 10 دقیقه مجدداً شستشو گردید. رسوب سلولی حاصل که شامل سلول‌های جدا شده از بافت جفت است، به فلاسک T75 منتقل، و در محیط Dulbecco's HG-DMEM-F12 (آمریکا، جیبکو) همراه با FBS 15 درصد (آمریکا، جیبکو) کشت داده شد. سلول‌های مزانشیمی در مخلوط سلولی به کف فلاسک متصل شده و دو کی شکل شدند. پس از 24 ساعت با تعویض محیط کشت، سلول‌های معلق (غیر مزانشیمی) از محیط دور شد، و سلول‌های مزانشیمال با اتصال به کف فلاسک، پس از چند روز تشکیل کلنی داده و تکثیر شدند. زمانی که سطح فلاسک بیش از 90 درصد توسط سلول‌ها پوشیده شد، با استفاده از محلول تریپسین 0/25 درصد که حاوی 1 میلی مولار EDTA است، سلول‌ها از فلاسک جدا شده و تعداد 2×10^5 سلول مجدداً در فلاسک T75 جدید و درون 10 ml محیط DMEM-F12HG کشت داده شد. برای بررسی تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت، از میکروسکوپ اینورت استفاده گردید. هم‌چنین برای اثبات هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمال از بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمال مانند CD44، CD90، CD105 و هم‌چنین CD34، IHLA-DR از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. چون محیط کشت همواره از سلول‌های مرده پاکسازی شود. محیط کشت به دست آمده، هر 2 روز یک بار تعویض شد به این صورت پاساژهای متوالی از این سلول‌ها فراهم شده و نمونه‌ای از هر پاساژ، پس از افزودن محلول DMSO به همراه دکستران DEX40 (آلمان، کرایوشور) به نسبت 4 به 1، در ازت مایع فریز شد تا در شرایطی که نیاز به بررسی مجدد بر روی یک نمونه باشد، منبع سلولی قابل اطمینانی در دسترس قرار گیرد.

نحوه تهیه عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی

والک از منطقه فولاد محله کیاسر شهرستان ساری و خار مریم از حوالی شهرستان نکاء جمع آوری گردید. نام علمی از روی هرباریوم تهیه شده، و مشخص گردید. پیاز والک و دانه خار مریم در سایه خشک شد. و هر کدام جداگانه به اندازه مش 355 پودر شدند و به روش پرکولاسیون با حلال اتانولی 70 درصد عصاره گیری و پس از تبخیر حلال با استفاده از دستگاه روتاری، سپس عصاره به دست آمده در دمای 20 - درجه سانتی گراد نگهداری شد.

15 گرم از پودر تهیه شده هر یک از این دو گیاه را به 250 میلی لیتر حلال (اتانول-آب به نسبت 7-1) اضافه گردید و به مدت 40 دقیقه در حمام آب 100 درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس عصاره به کمک کاغذ صافی میلی پور چند بار صاف شد. حاصل استخراج توسط اسید کلریدریک اسیدی شده و توسط اتیل استات سه بار و هر بار با 100 میلی لیتر دکانته شد. حاصل استخراج اتیل استاتی توسط دستگاه دوار تقطیر در خلاء (rotary evaporator, EYELA Japanese (N1000SW220V-IP در دمای 40 درجه سانتی گراد خشک شد و در نهایت عصاره محتوی فلاونوئیدهای پیاز والک کوهی و دانه خار مریم تا زمان به کار گیری در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد نگهداری شد (36). (35).

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال به سلول های تولید کننده انسولین (IPCs) با استفاده از عصاره گیاهی والک کوهی و خار مریم

منبع سلولی به دست آمده به مدت 6 تا 10 دقیقه در انکوباتور قرار داده و سپس جهت تمایز آن ها با استفاده از دو عصاره گیاهی *Allium ursinum* L (والک کوهی) و *Silybum marianum* (L) (خار مریم)، به صورت مجزا در محیط کشت سلولی پس از حدود 28 روز، به سلول های تولید کننده انسولین (IPCs) تبدیل شدند. به منظور بهینه سازی عصاره گیاهان تعیین شده در

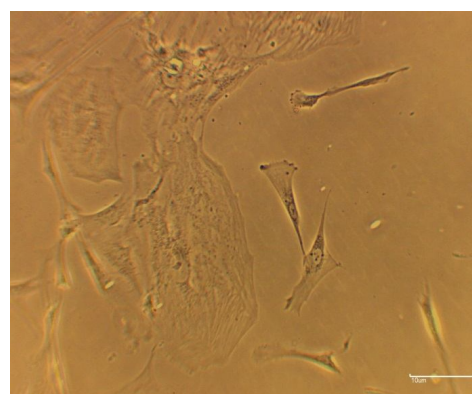
رقت های مختلف، در محیط کشت مورد بررسی قرار دادیم تا رقت ایتیمم آن ها را به دست آوریم. در این پژوهش از 300 میکروگرم در میلی لیتر از هر عصاره گیاه، در محیط کشت استفاده شد.

آن گاه به منظور تحریک تکثیر سلولی، افزودنی هایی مانند (Gibco)N2, (Gibco)B27 به محیط کشت اضافه، و برای بررسی مورفولوژی سلول های تمایز یافته از رنگ آمیزی دیتیزون (Dithizone) استفاده گردید. 50 میلی گرم دیتیزون (Merck) در 5 میلی لیتر دی متیل سولفو کسید (Dimethyl Sulphoxide) (sigma) حل، و به عنوان محلول استوک در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در هنگام استفاده دیتیزون با غلظت نهایی 10 میکرو مولار به سلول ها اضافه گردید و به مدت 15 دقیقه در انکوباتور انکوبه شدند. سلول هایی که در نتیجه ی این رنگ آمیزی به رنگ قرمز در آمده اند سلول های تولید کننده انسولین می باشند. جهت شمارش سلول های تمایز یافته و سلول های تمایز نیافته از لام نئوبار استفاده گردید. برای هر نمونه 5 بار شمارش تکرار شد، به این صورت که سلول های رنگ آمیزی شده بعد از سانتریفوژ با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری برای شمارش مشاهده شدند.

برای تعیین میزان ترشح انسولین توسط سلول های تمایز یافته در روز 28 پس از تمایز، محیط کشت سلول های تمایز یافته با استفاده از کیت استاندارد به روش الیزا (Demeditec, Germany) مورد آزمایش قرار گرفت. میزان ترشح انسولین پس از القاء به وسیله هر یک از دو عصاره گیاهی، به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. و هر نمونه سه بار اندازه گیری شد.

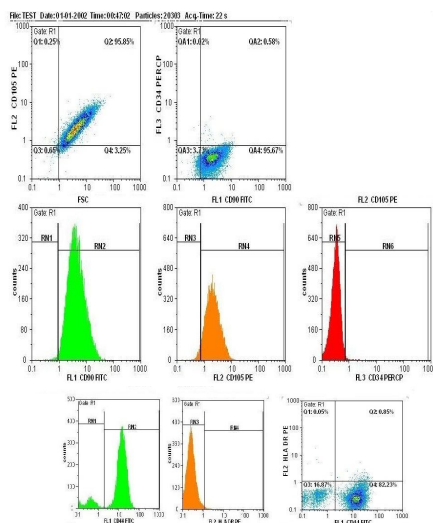
یافته ها

در بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وار تون (WJ-MSCs)، 4 روز پس از قرار دادن قطعات ژله وار تون در محیط کشت، به تدریج سلول‌های بنیادی مزانشیمال از لبه‌های بافت شروع به جدا شدن کردند این سلول‌ها دوکی، فیبروبلاستی شکل و چسبیده به کف فلاسک بودند (تصویر شماره 1). و بعد از 6 روز کف فلاسک توسط MSCs پوشانده گردید. میزان جدا سازی سلول در هر سانتی متر مکعب محیط کشت سلولی 105×2 بوده است.



تصویر شماره 1: سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وار تون، به صورت دوکی و فیبروبلاستی شکل نشان می‌دهد که در حال جدا شدن از بافت ژله وار تون می‌باشند

در بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمال، به منظور بررسی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از ژله وار تون، بیان مارکرهای سطحی با استفاده از فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای مزانشیمال CD44، CD90 و CD105 را به صورت مثبت بیان کرده است و از نظر بیان مارکرهای خونی و آنتی ژن لکوسیتی انسانی CD34، HLA-DR منفی هستند (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 2: نتیجه فلوسایتو متری سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وار تون

میزان ترشح انسولین با استفاده از کیت الیزا

برای تعیین میزان ترشح انسولین توسط سلول‌های تمایز یافته در روز 28 پس از تمایز، محیط کشت سلول‌های تمایز یافته با کیت الیزا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های تمایز یافته نسبت به سلول‌های تمایز نیافته، توانایی تولید انسولین را دارند و هم چنین می‌توانند سلول‌های مولد انسولین ساز را بسازند (جدول شماره 2).

جدول شماره 2: مقایسه نتایج به دست آمده از روش آلیزا از نمونه‌های القاء یافته به سلول‌های بتای پانکراس نسبت به گروه کنترل (کنترل منفی)

گروهها	ترکیب سلول بنیادی و گلیک	انسولین گروه تعداد U/ml	انسولین گروه کنترل U/ml
1	ولکت کوهی + سلول بنیادی مزانشیمال	160	0
2	خارمریم + سلول بنیادی مزانشیمال	14,3	0

بحث

در بیماری دیابت، بدن نمی تواند انسولین تولید کند یا به درستی از آن استفاده کند. اگر چه انسولین عموماً در باکتری یا مخمر برای استفاده تجاری تولید می شود اما در حال حاضر تحقیقات بر روی روش های دیگر تولید از جمله تولید پروتئین انسولین در گیاهان متمرکز شده است. امروزه مردم زیادی در جهان، به نوعی از دیابت مرتبط با انسولین رنج می برند. هم چنین تخمین زده شده است که در آینده ای نزدیک تعداد افراد مبتلا به دیابت دو برابر خواهد شد. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی در دنیا، افزایش تقاضا برای هورمون انسولین (با رشد 3 الی 4 درصد در سال) قابل پیش بینی است. روبرو شدن با این میزان تقاضا، توسعه روش های ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیت تولید بالا را برای آینده ضروری می نماید. با توجه به پتانسیل بالای گیاهان برای تولید زیست دارو ها، با بهره گیری از زراعت مولکولی (Molecular farming) تولید و عرضه انسولین با استفاده از گیاهان نیز می تواند چشم انداز نوید بخشی برای جامعه بشری باشد.

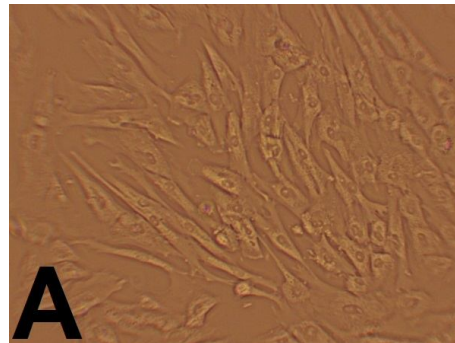
فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات گیاهی پلی فنلی با خواص ضد دیابتی، ضد التهابی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی هستند که سبب حفاظت بدن در مقابل بیماری های اختلالات متابولیک و بیماری های کرونری می شوند. این ترکیبات پلی فنلی قادر هستند با تحریک ترشح انسولین، سبب ترمیم سلول های بتای پانکراس و مهار آپوپتوز شده و از پیشرفت دیابت قندی جلوگیری نمایند از فلاونوئیدها برای القاء تمایز سلولی نیز استفاده شده است (38).

وانگ (Wang) در سال 2011، و هم چنین Phuc و همکاران در سال 2011، موفق به تولید سلول های بتای پانکراس از سلول های بنیادی مزانشیمال به دست آمده از خون بند ناف شدند که پس از تزریق به موش دیابتی توانستند سطح گلوکز خون را کاهش دهند. آن ها در

اثبات هویت IPCs حاصل از تمایز WJ-MSCs با

رنگ آمیزی دیتیزون (DTZ)

دیتیزون عامل متصل شونده به فلز روی می باشد. که به صورت انتخابی سلول های بتای پانکراس را به رنگ قرمز در می آورد (37). در این مطالعه با کمک رنگ آمیزی اختصاصی دیتیزون، سلول های تولید کننده انسولین به اثبات رسیدند. سلول های دوکی شکل MSCs تحت تاثیر عصاره گیاهی تغییر مرفولوژی دادند و به حالت کروی و خوشه ای و به صورت تجمع می (مانند جرایر لانگرهانس) به رنگ آجری قرمز در آمدند (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 3: A: نشان دهنده ی مرفولوژی سلول های بنیادی

مزانشیمال انسانی قبل از تأثیر عصاره گیاه والک کوهی می باشد. (بیمار نشده و کنترل منفی)، B: سلول های دیتیزون (DTZ) مثبت می باشند و توده سلولی خوشه ای شکل آجری مایل به رنگ قرمز را نشان می دهد که وجود سلول های انسولین ساز (IPCs) حاصل از MSCs تحت اثر القای عصاره گیاه والک کوهی را تایید می نماید. (بیمار شده) (×100)

این مطالعه دریافتند که سلول‌های بنیادی مزانشیمال دیواره‌ی سیاهرگ بند ناف نسبت به سلول‌های مزانشیمال ژله وارتون و خون بند ناف از توان تمایزی پایین‌تری برخوردار هستند. این توان تمایزی کمتر، در تمایز این سلول‌ها به استخوان و چربی نیز مشاهده شد (40) (39).

ریکوار (Raikwar) و همکاران در سال 2013 گزارش کردند، بیان اکتوپیک Pdx-1 Pancreatic and duodenal (homeobox Factor-1) که یک فاکتور رونویسی ضروری پانکراس است، منجر به افزایش تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شود (41).

در این مطالعه پس از جداسازی موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCs) و تایید آن از طریق چسبیدن سلول‌های فیرو بلاستیک دو کی شکل به کف فلاسک، و بررسی CD مارکرهای مثبت و منفی، در مرحله بعد، تمایز به سلول‌های بتای پانکراس، با دو عصاره گیاهی انجام گردید. و با اپتیمایز کردن غلظت آن‌ها در رقت‌های مختلف در محیط کشت توانستیم به تولید مناسب سلول‌های انسولین ساز (IPCs) دست پیدا کنیم. از نشانه‌های مهم عملکرد سلول‌های بتای پانکراس، ترشح انسولین است. از این جهت در این مطالعه، میزان ترشح انسولین در MSCs تمایز یافته به وسیله کیت ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه به ترتیب میزان ترشح انسولین از دو عصاره گیاهی مورد استفاده جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCs) به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPCs) که با استفاده از کیت الیزا بررسی شدند، *Allium ursinum* L (والک کوهی) با u/ml 160 و *Silybum marianum* L (خار مریم) با u/ml 14,3 می‌باشند.

به‌طور خلاصه می‌توان گفت که این دو عصاره گیاهی قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال

مشتق از ژله وارتون به IPCs هستند. و بین این دو عصاره گیاهی، والک کوهی بیش‌ترین تولید انسولین، و خار مریم کمترین میزان تولید انسولین را دارد.

پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی عملکرد IPCs به دست آمده از این پژوهش و استفاده در کارهای درمانی و سل‌تراپی، پیوند این سلول‌ها به حیوانات مبتلا به دیابت و ارزیابی بهبود و طبیعی شدن سطح گلوکز خون در این مدل‌های آزمایشگاهی بررسی شوند و اثر بخشی آن در مقایسه با انسولین رایج و حیوانی، مورد توجه قرار گیرد. با توجه به نقش موثری که محیط داخل بدن می‌تواند در مقایسه با محیط خارج از بدن بر روی تمایز داشته باشد، این موضوع ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاهی والک کوهی (*Allium ursinum* L) و خار مریم (*Silybum marianum* L) دارای تأثیرات مثبت بر روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وارتون (WJ-MSCs) به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPCs) می‌باشند. و هم‌چنین در این مطالعه مشخص گردید تولید انسولین به وسیله عصاره گیاهی والک کوهی به مراتب بیشتر از عصاره گیاهی خار مریم می‌باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه به شماره طرح 93-1462 در مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک دانشکده پزشکی ساری می‌باشد. بدین وسیله از زحمات سرکار خانم دکتر زهرا رحمانی و پرسنل اتاق عمل مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) ساری که در تهیه بند ناف نوزادان همکاری صمیمانه داشته‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Dattner AM. From medical herbalism to Phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatol. Ther.* 2003; 16(2): 106 - 113.
2. Fong HH. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. *Integer Cancer Ther.* 2002; 1(3): 287 - 293.
3. Vahedi Larijani L, Ghasemi M, AbedianKenari S, Naghshvar F. Evaluating the effect of four extracts of avocado fruit on esophageal squamous carcinoma and colon adenocarcinoma cell lines in comparison with peripheral blood mononuclear cells. *Acta Med Iran.* 2014;52(3):201-205.
4. Hussein HF, Darvishzadeh F, Heshmat R, Jafariaraz Z, Raza M, Larijani B. The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res.* 2009; 23 (8): 1186 - 1189.
5. AbedianKenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4+ T cells proliferation. *Iran Biomed J.* 2011;15(1-2):1-5.
6. Thatte UM, Rege NN, Phatak SD, Dahanukar SA. The flip side of Ayurveda. *J Postgrad Med.* 1993; 39 (4): 179 - 182.
7. Rege NN, Thatte UM, Dahanukar SA. Adaptogenic properties of six rasayana herbs used in Ayurvedic medicine. *Phytother Res.* 1999; 13(4):275 - 291.
8. Parab S, Kulkarni R, Thatte U. Heavy metals in herbal T medicines. *Indian J Gastroenterol.* 2003; 22(3): 111 -112.
9. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int J Immunopharmacol.* 2000; 22 (9): 729 - 740.
10. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 36(Suppl 1):S67-74.
11. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2013. Accessed at: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf
12. Janson SP, Fall K, Brus O, Magnuson A, Wändell P, Östgren CJ, et al. Prevalence and incidence of diabetes mellitus: a nationwide population-based pharmaco-epidemiological study in Sweden. *Diabetes Med.* 2015;32(10): 1319-1328.
13. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 for the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2): 137-149.
14. Maclaren N, Atkinson M. Is insulin dependent diabetes mellitus environmentally induced. *N Engl J Med.* 1992;327(5): 348-349.
15. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et

- al. In vivo and in vitro characterization of insulin- producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*.2004; 53(7):1721-1732.
16. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287(5457):1427-1430.
 17. Abediankenari S, Ghasemi M. Generation of immune inhibitory dendritic cells and CD4+T regulatory cells inducing by TGF-beta. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2009 ;8(1):25-30. (Persian)
 18. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cell: flip side of the coin. *Cancer Res*.2009; 69(4):1255-1258.
 19. Mafi R, Hindocha S, Mafi P, Griffin M, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications-a systematic review of the literature. *Open Orthop J* 2011;5Suppl 2:242-248.
 20. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5):1669-1675.
 21. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2011; 7(2):463-477.
 22. Leon- Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia*, 2004.47(8): 1442-1451.
 23. Oster A, Jensen J, Serup P, Galante P, Madsen OD, Larsson LI. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (pdx-1 and Nkx 6.1). *J Histochem Cytochem* .1998;46(6): 707-715.
 24. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* .2004 ;22(3): 265-274.
 25. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* .2005; 23(12): 1534 –15 41.
 26. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbitt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia*. 2004;47(3): 499-508.
 27. Hansson M, Tonning A, Frandsen U, Petri A, Rajagopal J, Englund MC, et al. Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* .2004 ; 53(10): 2603-2609.
 28. Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* .2003;299(5605): 363.
 29. Panjeshahin MR, Azadbakht M, Akbari N. Antidiabetic Activity of Different Extracts of *Myrtus Communis* in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*.2016. 23(2):183-190.
 30. Danuta Sobolewska, Irma Podolak, and Justyna Makowska-Wąs (2013). *Allium ursinum*: botanical, phytochemical and

- pharmacological overview. *Phytochem Rev.* 2015; 14(1): 81–97.
31. Schulz V, Hansel R, Tyler VE. *Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine.* Berlin: Springer. 1997.
32. Soto CP, Perez BL, Favari LP, Reyes JL. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1998; 119(2): 125-129.
33. Von Schonfeld J, Weisbrod B, Muller MK. Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cyclosporine A toxicity. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53(11-12): 917-920.
34. Tanhaye Kalate Sabz F, Farokhi F, Delirezh N, Chapari H. In-vitro differentiation of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Tehran Univ Med J.* 2011; 69(4): 211-217. (Persian).
35. Markham KR. *Techniques of flavonoid identification.* 3rd ed. New York: Academic Press; 1982.
36. Rahman A. *Studies in Natural Products Chemistry.* *Stud Nat Prod Chem* 2005; 30(1): 1-10.
37. Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells.* 2002; 20(4): 284-292.
38. Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J Neurochem* 2004; 90(5): 1144-1155.
39. Wang HS, Shyu JF, Shen WS, Hsu HC, Chi TC, Chen CP, et al. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. *Cell Transplant.* 2011; 20(3): 455-466.
40. Phuc PV, Nhung TH, Loan DT, Chung DC, Ngoc PK. Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011; 47(1): 45-63.
41. Raikwar SP, Zavazava N. Differentiation and lineage commitment of murine embryonic stem cells into insulin producing cells. *Methods Mol Biol.* 2013; 1029: 93-108.