


Fatemeh Keranian<sup>1</sup>,  
Mohammad Reza Mansouri<sup>2</sup>,  
Shokofeh Zamani<sup>3</sup>, Shahrzad  
Pahlavan<sup>4</sup>, Atefeh Shamosi<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Anatomy,  
School of Medicine, Alborz  
University of Medical  
Sciences, Karaj, Iran

<sup>2</sup> Students Research Committee,  
Alborz University of Medical  
Sciences, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Department of Internal  
Disease, School of Medicine,  
Alborz University of Medical  
Sciences, Karaj, Iran

<sup>4</sup> Pathology Lab, School of  
Medicine, Alborz University of  
Medical Sciences, Karaj, Iran

## Effects of Olibanum Extract on Differentiation of Bone Marrow Stem Cells to Neurons

Received: 25 Jul. 2017; Accepted: 22 May 2018

### Abstract

**Introduction:** Central nervous system has the low potential for regeneration of damaged neurons. The lack of suitable treatments for neurodegenerative diseases has placed the huge financial burden on the community. Stem cells have self-renewing capabilities and can differentiate into adult cell types under the appropriate conditions. The chemical properties of some plants affect the growth rate and cell proliferation. Previous studies have shown that Olibanum plant plays a role in the formation of dendritic spines and neuronal regeneration. In the present study, the effect of olibanum on the differentiation of bone marrow-derived stem cells (BMSCs) to neuron was investigated.

**Material and Methods:** Bone marrow stem cells were cultured in a Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 10% fetal bovine serum, Fibroblast growth factor 2, and Epidermal growth factor (DMEM, FBS, FGF2, and EGF). Olibanum extract 5%, 10%, and 20% were added to culture medium. Then microscopic observations, MTT assay, and immunocytochemistry examination were used to assess morphological, proliferation and differentiation factors.

**Results:** Microscopic observations and viability cell test showed that the 5% Olibanum extract was non-toxic to BMSCs. Immunocytochemistry result denoted that 5% Olibanum extract can increase the differentiation of BMSCs into neuron-like cells. However, when Olibanum extract 10% and 20% were added to the culture medium, such an increase was not seen in treated groups.

**Conclusion:** These findings suggest that the application of 5% Olibanum extract in cell culture medium was shown to have a suitable effect on BMSCs differentiation into the neuron.

**Keywords:** Stem cell, Olibanum, Differentiation, Neuron

**\*Corresponding Author:**  
Department of Anatomy, School of  
Medicine, Alborz University of  
Medical Sciences, Karaj, Iran

Tel: 0935- 8148955  
E-mail: a.shamosi@gmail.com

## تأثیر صمغ کندر بر تمایز سلول‌های عصبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش

تاریخ دریافت مقاله ۹۶/۵/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۱

### چکیده

**مقدمه:** سیستم عصبی مرکزی دارای ظرفیت محدودی برای احیای نورون‌های آسیب دیده است. فقدان درمان مناسب برای بیماری‌های نورودژنراتیو، بار مالی بزرگی را بر جامعه تحمیل کرده است. سلول‌های بنیادی قادر به خود تکثیر بوده و در شرایط مناسب می‌توانند به انواع سلول‌های بالغ تمایز یابند. خواص شیمیایی برخی گیاهان، بر سرعت رشد و تکثیر سلولی اثر می‌گذارد. مطالعات قبلی نشان داده اند که گیاه کندر در تشکیل خارهای دندریتی و ترمیم نورونها نقش دارد. در این مطالعه، تأثیر عصاره کندر بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) به نوروون بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم، EGF و FGF2 کشت داده شدند. عصاره کندر با سه غلظت ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ به محیط‌های کشت اضافه و بمنظور ارزیابی عوامل مورفولوژیکی، تکثیر و تمایز، از مشاهدات میکروسکوپی، تست MTT و آزمایش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد.

**نتایج:** مشاهدات میکروسکوپی و آزمایش بقای سلولی نشان داد که عصاره کندر با غلظت ۵٪ سمیتی بر سلول‌های BMSCs ندارد. نتایج ایمنوسیتوشیمی نشان می‌دهد که عصاره ۵٪ عصاره کندر در محیط نورونیک می‌تواند تمایز BMSC ها را به سلول‌های نوروون مانند افزایش دهد. با این وجود، زمانی که عصاره کندر ۱۰٪ و ۲۰٪ به محیط کشت افزوده شد، چنین افزایشی در گروه‌های تحت تیمار مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها نشان می‌دهد که استفاده از عصاره ۵٪ کندر در محیط کشت سلولی تأثیر مطلوبی بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به نوروون دارد.

**کلمات کلیدی:** سلول بنیادی، کندر، تمایز، نوروون

فاطمه کرمانیان<sup>۱</sup>، محمدرضا منصوری<sup>۲</sup>، شکوفه زمانی<sup>۳</sup>، شهرزاد پهلوان<sup>۴</sup>، عاطفه شموسی<sup>۵\*</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران  
<sup>۲</sup>دانشجوی دندانی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران  
<sup>۳</sup>استادیار گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران  
<sup>۴</sup>کارشناس آزمایشگاه گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

\*نویسنده مسئول:

استادیار گروه تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۰۹۳۵- ۸۱۴۸۹۵۵  
E-mail: a.shamosi@gmail.com

## مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی که از آنها به عنوان سلولهای بنیادی بزرگسال نیز نام برده می شود، سلولهایی پرتوان و با قابلیت تکثیر بالا هستند که قابلیت تمایز به انواع مختلفی از سلولهای رده مزانشیمی را دارند. این سلولها در ترمیم بافتی با منشأ مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت کرده و توانایی ازدیاد و تکثیر در محیط آزمایشگاهی را به خوبی نشان داده اند. سلولهای بنیادی مزانشیمی قابل جدا سازی از استخوانهای ایلیوم، تیبیا و فمور بوده و از منابع دیگری مانند خون بند ناف و مایع آمنیوتیک نیز قابل جداسازی هستند<sup>۱</sup>.

این سلولها توانایی ازدیاد و تکثیر در محیط آزمایشگاه با قابلیت چسبندگی به کف ظروف پلاستیکی کشت را دارند. سلولهای بنیادی مزانشیمی توانایی تبدیل شدن به سلولهایی از ردههای مختلف مانند سلول استخوانی، سلول عضلانی، سلول چربی و نورون را در شرایط آزمایشگاه دارند. توانایی تبدیل سلولهای بنیادی مزانشیمی به نورون با توجه به خصوصیات فیزیولوژیکی که کسب می کنند آنها را بعنوان مهمترین درمان برای ترمیم اعصاب مطرح کرده است. نورون ها سلولهایی هستند که قابلیت ترمیم ندارند و در صورت آسیب با اسکار از جنس سلولهای گلیال پر می شوند که این بافت اسکار فاقد ویژگیهای فیزیولوژیک نورون است. تحقیقات جدید بر تمایز هر چه بهتر سلول بنیادی به عصب متمرکز شده است<sup>۲</sup>.

یکی از عوامل مهم در تمایز یکی از عوامل مهم در تمایز سلولهای بنیادی به سلول های عصبی، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی ۲ (FGF2) و فاکتورهای رشد اپیدرمال (EGF) می باشد. به نظر می رسد فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ (FGF2) غالب ترین و اثرگذار ترین فاکتوری است که در زیست شناختی سلولهای مزانشیمی نقش و کاربرد اساسی دارد. فاکتور رشد FGF2 تکثیر تمام سلولهای مشتق از مزودرم را تحریک می کند به طوری که خاصیت بازدارندگی این سلولها در حین رشد و تماس را از بین برده و سلولها می توانند به جای تک لایه به صورت چند لایه رشد نمایند<sup>۳،۲</sup>.

شیوع بالای بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی امروزه یکی از معضلات هزینه بر سیستم های بهداشتی است. مهم ترین مسئله در این مشکلات، عدم ترمیم بافت عصبی است. از آنجایی که پیوند سلولهای بالغ عصبی به موجود زنده فاقد کارایی لازم برای بهبود ضایعات بوده و این سلولهای تمایز یافته قادر به هماهنگ شدن و ترمیم نمی باشند، در پیوندهای ترمیمی سیستم اعصاب مرکزی سعی می شود از سلولهای پیش ساز عصبی که در واقع سلولهای متعهد شده و در عین حال نابالغ هستند استفاده گردد. اما مشکل این است که سلولهای بنیادی اکثرا بعد از پیوند، به آستروسیت تمایز می یابند، بنابراین یافتن عواملی که بتواند درصد تمایز این سلولها را به عصب افزایش دهد حایز اهمیت است<sup>۴،۵</sup>.

نتایج حاصل از بررسی های مختلف نشان داد که بمنظور بدست آوردن نتیجه مناسب، لازم است که از ترکیبی از فاکتورهای رشد و عوامل شیمیایی برای نیل به این هدف استفاده گردد. با توجه به اینکه در بررسی های گذشته استفاده از فاکتورهای رشد BDNF و B27 در به راه انداختن مسیرهای آبخاری درون سلولی این سلولها در تمایزشان به سلولهای نورونی به اثبات رسیده بود، این دو فاکتور در روش القایی ذکر شده در مطالعه ما نیز مورد استفاده قرار گرفتند<sup>۶،۷</sup>.

کندر (Olibanum) گیاهی دارویی از راسته افراسانان (Sapindales) و متعلق به خانواده بوسراسه است که در طب سنتی، به عنوان دارویی برای تقویت سیستم عصبی از آن استفاده می شود. Boswellia Sacra یا Boswellia thurifera نام علمی این گیاه است. در کتاب قانون از کندر به عنوان دارویی جهت درمان فراموشی، افزایش هوش و حافظه نام برده شده است. به نظر می رسد کندر در تکامل سیستم عصبی مرکزی و شکل گیری درخت های دندریتی، آکسونها و برقراری اتصالات میان آنها نقش داشته باشد<sup>۸</sup>.

با توجه به استفاده از کندر در طب سنتی و تأثیر آن در Neurogenesis و Synapsogenese در این طرح در کنار فاکتورهای رشد رایج در تمایز سلولهای بنیادی، تأثیر کندر در تمایز به نورون مطالعه شده و اثر کندر در دو گروه آزمایشی و شاهد، مورد بررسی قرار گرفت.

هدف از این طرح، بررسی تأثیر عصاره صمغ گیاه کندر بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به نوروں می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز

#### استخوان:

در این مطالعه از ۶ سر موش نر بالغ نژاد Wistar با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. موشها در محیط حیوان خانه با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتیگراد و روشنی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. پس از کشتن موش‌ها، استخوان ران و درشت نی حیوانات جدا شدند و پس از حذف عضلات و در شرایط استریل، مغز قرمز استخوان به روش فلاشینگ جمع‌آوری شده<sup>۹</sup> و سلول‌ها به محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی FBS ۱۰٪ و ۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین (Gibco) منتقل شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم  $70-80 \times 10^4$  به کمک تریپسین ۰/۲۵٪ (sigma) و EDTA ۰/۱٪ (sigma) سلولها از کف فلاسک جدا شدند. هر ۳-۴ روز یکبار محیط کشت تعویض شد. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد.

### بررسی تکثیر و بقا سلولی بر روی داربست با استفاده از

#### آزمون MTT

به منظور بررسی بقا و تکثیر سلول‌های کشت داده شده از آزمون MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte- bromide trazolium) استفاده شد. این تست بر مبنای شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده می‌باشد. سلول‌های زنده با میتوکندری فعال می‌توانند بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ ایجاد کنند که این بلورهای نامحلول توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. سپس سلول‌ها به مدت ۳ و ۵ روز در محیط کشت DMEM در انکوباتور CO2 با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند و در زمان‌های بیان شده (۳ و ۵ روز بعد از کشت) آزمون رنگ سنجی MTT انجام گردید. در این روش ۱۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر به

داخل چاهک اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس درون هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) ریخته شد. میزان جذب هر چاهک توسط دستگاه Eliza Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و تعداد سلول‌های زنده با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.<sup>۱۰</sup>

### تهیه صمغ کندر

جهت تهیه صمغ کندر ابتدا میزان ۳۰۰ گرم گیاه کندر از عطاری تهیه گردید. ابتدا یک گرم صمغ کندر را در ۱۰۰ سی سی محیط کشت حل کردیم. سپس با رقیق سازی این محلول (۱/کندر، محلول استوک) غلظت‌های ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ را آماده نمودیم. محلول‌های حاصله در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به سلول‌های

#### عصبی

سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش را با غلظت  $5 \times 10^4$  سلول به ظرف ۱۲ خانه ای پوشیده شده با poly L-Lysin منتقل نموده و ۲۴ ساعت بعد، محیط کشت تمایزی عصب به سلول‌ها اضافه شد. این محیط حاوی ۶۰٪ N2 supplement، DMEM/F12 و (Sigma) (۲۰ng/ml) FGF2 به مدت ۵ روز بود. پس از ۵ روز، محیط کشت سلول‌ها با محیط جدید شامل (۲۰ng/ml) FGF2 و (Sigma) (۲۰ng/ml) EGF به مدت ۸ روز تیمار گردید. سپس محیط کشت جدید حاوی (۲۰ng/ml) FGF2 و شامل (۱۰ng/ml) BDNF بدون کندر و همراه با غلظت‌های مختلف کندر (۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ از محلول استوک) به مدت ۸ روز به سلول‌ها اضافه گردید<sup>۱۱</sup> (جدول ۱). ۲۱ روز بعد از اضافه نمودن محیط کشت تمایزی، سلولها از لحاظ مارکرهای عصبی بررسی شدند. محیط کشت هر دو روز یک بار تعویض شد. شرایط نگهداری در شرایط کاملاً بهداشتی و به دور از عوامل پاتوژن بود. به منظور بررسی میزان بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی عصبی از روش‌های ایمونوسیتوشیمی استفاده گردید.

جدول ۱: تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی در محیط‌های کشت بدون عصاره کندر و حاوی عصاره کندر

روز ۸	روز ۸	روز ۵	
FGF2+BDNF	FGF2+EGF	FGF2+ N2 Supp	گروه کنترل
غلظت‌های مختلف کندر (۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪) و FGF2+BDNF	FGF2+EGF	FGF2+ N2 Supp	گروه تیمار ۱
غلظت‌های مختلف کندر (۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪)	-	-	گروه تیمار ۲

صورت میانگین انحراف معیار (Mean±SD) گزارش گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 18) انجام و تست آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان داده‌های معنی دار گزارش گردید.

### نتایج

#### جداسازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش

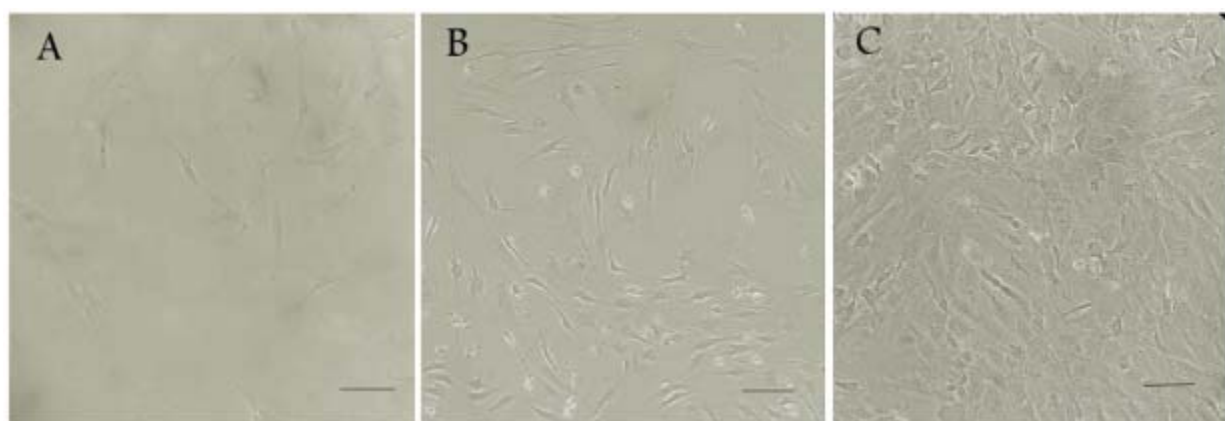
در روز دوم کشت، سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش، به صورت سلول‌های دوکی شکل منفرد چسبیده به کف فلاسک کشت سلول مشاهده شدند (شکل ۱A). از روزهای سوم تا هفتم، سلول‌ها رشد و تکثیر بیشتری داشتند (شکل ۱B) و پس از ۱۴ روز، کلونی‌های سلولی شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل با تراکم سلولی ۸۰٪ مشاهده شدند (شکل ۱C).

#### آزمایش ایمنوسیتوشیمی

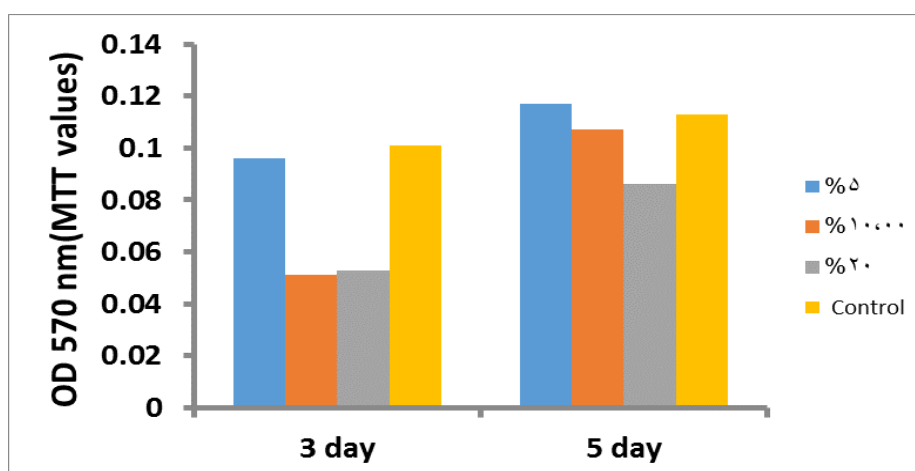
ابتدا نمونه‌ها با پارافرم‌آلدهید ۴٪ فیکس شدند. به منظور افزایش نفوذ پذیری دیواره سلولی و بلوکه نمودن آنتی ژن‌های غیر اختصاصی، تریتون X-100 با غلظت ۰/۲٪ و محلول سرم آلبومین گاوی ۵٪ استفاده شد.<sup>۱۲</sup> نمونه‌ها با آنتی بادی‌های اولیه Nestin (۱:۱۰۰ v/v; Sigma-Aldrich) به مدت یک شبانه روز انکوبه شدند. پس از شستشو، آنتی بادی ثانویه goat anti-mouse IgG FITC با غلظت ۱:۵۰۰ اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. همچنین هسته با استفاده از رنگ DAPI رنگ آمیزی شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51, Japan) بررسی شدند.

#### بررسی‌های آماری

تمام آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار انجام شدند و داده‌ها به



شکل ۱: مرفولوژی سلول‌های بنیادی مغز استخوان. سلول‌ها ظاهر دوکی داشته و شبه فیبروبلاستی می‌باشند (Scale bar: 50µm)



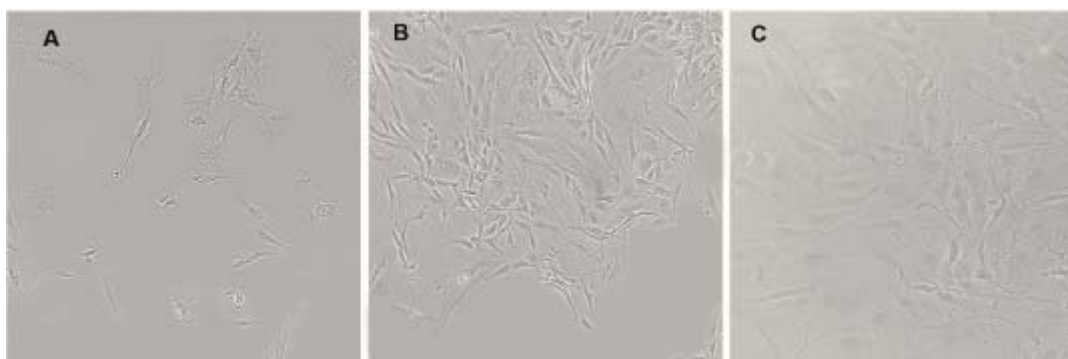
نمودار ۱: نتایج حاصل از آزمایش MTT برای گروه‌های شاهد و مورد با سه غلظت مختلف کندر

### تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به سلول‌های عصبی در محیط‌های کشت بدون عصاره کندر و حاوی عصاره کندر

جهت القای سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به نوروں در محیط کشت بدون عصاره کندر و حاوی عصاره کندر، از فاکتور رشد اپیدرمال، فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲، N2 supplement و BDNF به مدت ۲۱ روز استفاده شد. تغییرات مورفولوژی سلول‌ها در حین القای نوروںی، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شد (شکل ۲). سلول‌های بنیادی مغز استخوان پس از تمایز عصبی، کم‌کم مورفولوژی شبه فیبروبلاستی خود را از دست داده و دارای سیتوپلاسم کشیده با جسم سلولی کوچک و یک یا چند زائده سیتوپلاسمی گردیدند.

### ارزیابی میزان بقای سلول‌ها (Viability assay)

بررسی میزان بقای سلول‌های بنیادی مغز استخوان همراه با غلظت‌های مختلف کندر (۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪) و بدون کندر (کنترل)، در روزهای ۳ و ۵ انجام گرفت. روش MTT بر مبنای احیا شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان به وسیله آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی حاصل از سلول‌های زنده از جنبه متابولیکی انجام می‌گیرد. نتایج حاصله بیان‌کننده افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی مغز استخوان در طی دوره ۵ روزه در محیط کشت حاوی کندر ۵٪ در مقایسه با سایر گروه‌ها بود. مقایسه میزان بقای سلول‌ها در دو گروه کنترل و تیمار بعد از گذشت یک روز، تفاوت معناداری را نشان نداد اما در سومین و پنجمین روز بعد از کشت سلول‌ها در محیط کشت حاوی کندر ۵٪، در مقایسه با سایر گروه‌ها معنی‌دار بود (نمودار ۱).

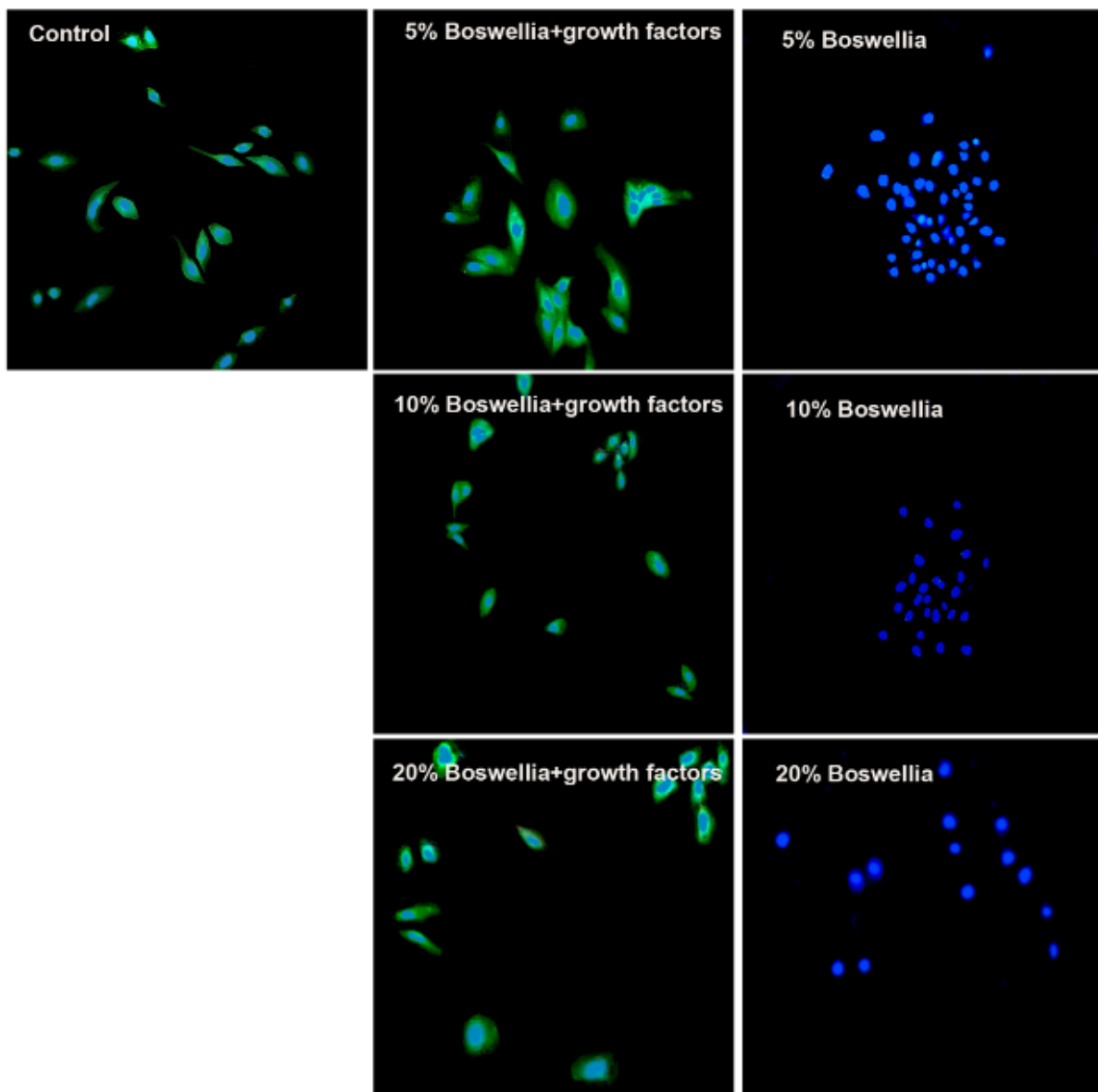


شکل ۲: تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان در حین القاء به سلول عصبی

استخوان موش به سلول عصبی در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده بیان بیشتر این مارکر در سلول‌های تمایز یافته همراه با کندر ۵٪ در مقایسه با سایر گروه‌ها بود. (شکل ۳). این نتیجه می‌تواند تاییدی بر نتایج حاصله از ارزیابی میزان بقای سلول‌ها (تست MTT) باشد.

### بررسی ایمنوسیتوشیمی

تعیین هویت سلول‌های نورونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه Nestin (مارکر اختصاصی سلول‌های نورونی) بر روی سلول‌های کشت داده شده با کندر و بدون کندر انجام شد. نتایج ایمنوسیتوشیمی مارکرهای Nestin، ۲۱ روز بعد از القای سلول‌های بنیادی مغز



شکل ۳: تعیین هویت سلول‌های نورونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مغز استخوان با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه Nestin (مارکر اختصاصی سلول‌های نورونی) بر روی سلول‌های کنترل و سلول‌های کشت داده شده با کندر

## بحث

(تحت فاکتورهای رشد نورونی) با کندر در مقایسه با گروه‌های دیگر معنادار بود. تغییرات مورفولوژیکی سلولی نیز در راستای نتایج حاصل از تکنیک ایمونوسیتوشیمی هستند.

سایر مطالعات نیز با افزودن مواد مختلف به محیط کشت توانسته‌اند میزان تمایز به نورون را افزایش دهند. Guillermo با استفاده از تهیه بستر مناسبی از پروتئین‌های L-لیزین و ترکیبی از القاکننده‌های شیمیایی، ماده فورسکولین و فاکتور رشد FGF2 توانست سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در موش صحرایی تا حدود ۶۰٪ به سلول‌های شبه عصبی تمایز دهد. نتایج بیانگر این مطلب است که مکانیسم مولکولی دخیل در این تمایز، خاموش شدن بیان ژن‌های مرتبط با تمایز مزانشیمی در مقابل بیان ژن‌های تمایز نورونی می‌باشد.<sup>۱۳</sup> نتایج حاصل از بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که بمنظور به دست آوردن نتیجه مناسب، لازم است از ترکیبی از فاکتورهای رشد و عوامل شیمیایی استفاده شود. لذا با توجه به اینکه در مطالعات گذشته استفاده از فاکتورهای رشد BDNF و B27 در به راه انداختن مسیرهای آبخاری درون سلولی سلول‌های بنیادی و القای تمایزشان به سلول‌های نورونی به اثبات رسیده است، بنظر می‌رسد در مطالعه حاضر نیز کندر از طریق همان مکانیسم‌ها میزان تمایز به عصب را افزایش داده باشد.<sup>۱۴، ۱۵</sup>

مطالعات نشان داده‌اند که دژنراسیون آکسونی بدنبال تخریب میکروتوبولها یکی از علل ایجاد بیماری‌های ضعف حافظه و نورودژنراتیو سیستم عصبی است.<sup>۱۶</sup> در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Karima و همکاران انجام شده مشاهده کردند که کندر با افزایش سنتز توبولین و رشد میکروتوبولها موجب افزایش رشد آکسون در نوریت القایی هیپوکامپ در محیط کشت شده است.<sup>۱۷</sup> همچنین طی تحقیقی Spelman و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که عصاره کندر با افزایش ماتریکس خارج سلولی شرایط بهتری را برای رشد نورون‌ها فراهم می‌کند.<sup>۱۸</sup> Hosseini و همکاران در ۲۰۱۰ نشان دادند که عصاره کندر اختلال حافظه ناشی از هیپوتیروئیدی در رت را کاهش می‌دهد.<sup>۱۹</sup> آنها مکانیسم این اثر کندر را ترشح مواد نوروتروفیک ذکر کرده‌اند. Jiang در سال ۲۰۱۶ مطالعاتی در زمینه تأثیر کندر بر بازساخت اعصاب محیطی، ترمیم و

از آنجایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱/۰ تا ۰/۰۰۱ درصد از جمعیت سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان انسان را تشکیل می‌دهند لذا در کشت‌های اولیه بصورت جمعیت ناخالص می‌باشند و در پاساژهای سلولی به تدریج بصورت خالص در می‌آیند. در کلونی‌های خالص سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیروبلاست و دوکی شکل می‌باشند. سلول‌های تمایز یافته در محیط کشت سلول، علاوه بر اینکه باید به لحاظ مورفولوژیکی و بیان پروتئین‌های اختصاصی خصوصیات سلول‌های نورونی را داشته باشند، در عین حال، فعال بودن آنها هم مسئله قابل تاملی است. قبلاً گفته شد که این سلول‌ها شاخص‌های سطح سلولی CD۷۳ و CD۱۰۵ را به میزان بالایی بیان می‌کنند و در مقابل، شاخص سطح سلولی CD۴۵ در این سلول‌ها بیان نمی‌شود. علاوه بر این بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که این سلولها بصورت ذاتی توانایی بیان برخی از مارکرهاي اختصاصی سلول‌های عصبی را در حد پائین دارا می‌باشند که مارکرهاي اختصاصی نستین در حدود ۵۴٪ و توبولین در حدود ۴۲٪ در این سلول‌ها بیان می‌گردند.

در این تحقیق نتایج MTT، کندر ۵٪ را بعنوان بهترین پاسخ مشخص نمود. پس از آنکه صمغ کندر با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰٪ به محیط کشت افزوده شد، نتایج MTT نشان داد که در روزهای ۳ و ۵ مناسب‌ترین محیط برای رشد سلولها با غلظت ۵٪ کندر ایجاد می‌شود.

جهت بررسی بیان ژنهای هدف در تمایز سلولی با تکنیک Immunocytochemistry (ICC) بیان مارکرهاي تمایزی برای تعیین محل آنتی ژن‌ها در سطح سلول‌های تمایز یافته مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه این تست بر روی سلولهای تحت کشت در محیطی که چندین روز با کندر ۵٪ تیمار شده بود، نشان داد که هیچگونه بیان ژن مربوط به نستین به سبب تأثیر تنهای کندر، رخ نداده است و کندر به تنهایی قادر به تغییر مورفولوژی سلول نشد، ولی بیان بیشتر این مارکرهای نورونی در سلول‌های تمایز یافته



مثبتی در تقویت فرایند حافظه و ترمیم نورونها داشته به نظر می‌رسد می‌تواند به عنوان یک ماده القایی به منظور افزایش تولید سلول‌های نرونی مورد استفاده قرار گیرد. این توانایی کندر می‌تواند آن را بعنوان یک القا کننده جهت تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به نرون معرفی کند. به این ترتیب کندر بعنوان گیاهی در دسترس می‌تواند کاربرد زیادی در درمان بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی مرکزی مانند جراحات مغزی یا نخاعی داشته باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی البرز به جهت حمایت‌های مادی انجام این تحقیق اعلام می‌دارند. این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب کمیته تحقیقات دانشجویی مورخ ۹۴/۱۲/۱ شماره ۲۷۶۲۰ می‌باشد.

بهبود عملکرد آن انجام داده که نشان از تأثیر کندر بر تمایز سلولهای بنیادی دارد. نتایج آنها تأثیر کندر را بر روی سلولهای ساتلایت که نوعی از سلولهای گلیا می باشند نشان داده است. کندر با تحریک این سلولها که نقش مهمی در ترمیم عصب دارند موجب ترمیم عصب سیاتیک شده است<sup>۷</sup>. آنها با اضافه کردن کندر با غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/L پرولیفراسیون سلولهای ساتلایت در محیط کشت را گزارش نمودند. آنها مکانیسم عمل کندر را خروج سلولها از مرحله G0 در فاز تکثیر بیان نمودند<sup>۷</sup> Moussaieff و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ انجام دادند متوجه شدند که ماده فعال موجود در کندر یعنی incensole acetate موجب مهار التهاب از طریق آزادسازی سیتوکین ها می شود. دوز بالای کندر فاقد این اثر بوده است.<sup>۲۰</sup>

### نتیجه گیری

با توجه به اینکه عصاره کندر با مکانیسم های مختلف تأثیر

### References

1. Pournasr KhakbaZ B, Baharvand H. Human Mesenchymal Stem Cells and Their, Clinical Application. Journal of Iranian Anatomical Sciences. 2007; 5(19 & 20): 167-215.
2. Nemati Sh, Zare Mehrjerdi N, Baharvand H. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to neural- like cells in vitro. Tehran University Medical Journal. 2009; 67(8): 527-534.
3. Baghaban Eslaminejad MR, Nazarian H, TaghiyarL. Mesenchymal stem cells with high growth rate in the supernatant medium from rat bone marrow primary culture. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2008; 10(2): 12-22.
4. Muñoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. Stem Cells. 2003;21(4):437-48
5. Maisel M, Herr A, Milosevic J, Hermann A. Transcription Profiling of Adult and Fetal Human Neuroprogenitors Identifies Divergent Paths to Maintain the Neuroprogenitor Cell State. Stem cells 2007 (11): 1617-1634.
6. Huang E, Reichardt L. Neurotrophins: roles in neural development and function. :Annu Rev Neurosci. 2001;(24): 677-736
7. Jiang X, Ma J, Wei Q. Effect of Frankincense Extract on Nerve Recovery in the Rat Sciatic Nerve Damage Model. Evid Based Complem Alter Med. 2016; doi: 10.1155/2016/3617216.
8. Behnam Rasoli M, Hossein Zadeh Hossein, Ghafari Moghadam Gh. Olibanum extract and Memory Improvement. Tarbiat Moallem University of Science journal. 2001; 1(1): 1-13.
9. Baharvand H, Hassani SN. A new chemical approach to the efficient generation of mouse embryonic stem cells. Methods Mol Biol. 2013;997:13-22.
10. Shamosi A, Mehrabani D, Azami M, Ebrahimi-Barough S, Siavashi V, Ghanbari H, Sharifi E, Roozafzoon R, Ai J. Differentiation of human endometrial stem cells into endothelial-like cells on gelatin/chitosan/bioglass nanofibrous scaffolds. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017 Feb;45(1):163-173.
11. Ebrahimi-Barough S, Ai J, Kouchesfehane HM. Isolation and Characterization of Human Endometrial Stem Cells and Evaluation of their Differentiation Potential. Experimental Animal Biology. 1392; 2(1): 25-31.
12. Safford KM1, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. Exp Neurol. 2004 Jun;187(2):319-28.
13. Guillermo M, Dale W, Irab B. Marrow Stromal Cells, Mitosis, and Neuronal Differentiation: Stem Cell and Precursor Functions. Stem Cells. 2003;21:437-448.

14. Yang JD1, Cheng-Huang, Wang JC, Feng XM, Li YN, Xiao HX. The isolation and cultivation of bone marrow stem cells and evaluation of differences for neural-like cells differentiation under the induction with neurotrophic factors. *Cytotechnology*. 2014 Dec;66(6):1007-19.
15. Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol*. 2004 Jun;187(2):266-78.
16. Nakayama T, Sawada T (2002) Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicines. *Pharmacol Biochem Behav* 71:119–138.
17. Karima O, Riazi Gh, Yousefi R, Movahedi A. The enhancement effect of beta-boswellic acid on hippocampal neurites outgrowth and branching (an in vitro study). *Neurol Sci* 2010, DOI 10.1007/s10072-010-0220-x
18. Spelman K, Aldag R, Hamman A, Kwasnik E, Mahendra MA, Obasi TM, et al. Traditional Herbal Remedies that Influence Cell Adhesion Molecule Activity. *Phytother. Res.* 2011; 25: 473–483.
19. Hosseini M, Hadjzadeh M, Derakhshan M, Havakhah SH, Rassouli F, Rakhshandeh H, Saffarzadeh F. The Beneficial Effects of Olibanum on Memory Deficit Induced by Hypothyroidism in Adult Rats Tested in Morris Water Maze. *Arch Pharm Res Vol* 33, No 3, 463-468, 2010.
20. Moussaieff A., Shein N. A., Tsenter J., Grigoriadis S., Simeonidou C., Alexandrovich, A. G., et al. (2008). Incensole acetate: a novel neuroprotective agent isolated from *Boswellia carterii*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(7), 1341-1352.