Archive of SID

مطالعه تأثیر عصاره اتانولی ریشه گیاه باریجه بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی (Osteoblast)

زهرا محمودی[1]، مسعود سلیمانی[2]*، عباس سعیدی[3]، مهرداد ایرانشاهی[4]، آرزو عزیزسلطانی[5]

1- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
2- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
4- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
5- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی 5، گروه هماتولوژی
تلفن: 82884508 (021)، نمابر: 88013030 (021)
پست الکترونیک: soleimani.masoud@gmail.com

تاریخ دریافت: 91/3/21 **تاریخ تصویب:** 92/2/16

چکیده

مقدمه: پوکی استخوان به اختلال در بافت استخوانی اطلاق می‌شود که افزایش ریسک شکستگی استخوان‌ها را به دنبال دارد. یکی از راه‌های پیشنهادی در سال‌های اخیر، استفاده از گیاه درمانی برای مبارزه با بیماری پوکی استخوان می‌باشد.

هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه گیاه باریجه ***Ferula gummosa*** بر روند تکثیر و تمایز به استخوان در سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان انسان **(Human Mesenchymal Stem Cell) (hMSCs)** می‌باشد.

روش بررسی: بدین‌منظور از سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به دست آمده از مغز استخوان انسان **(hMSCs)** استفاده شد. تأثیرات عصاره بر توان زیستی و همچنین تکثیر سلولی با استفاده از تست **MTT assay** مورد بررسی قرار گرفت. میزان تأثیر برفرآیند استخوان‌سازی با استفاده از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روزهای هفتم و چهاردهم مرحله تمایز به استخوان اندازه‌گیری شد.

نتایج: با توجه به نتایج پس از طی بازه‌های **24**، **48** و **72** ساعت پس از تیمار سلول‌ها، عصاره ریشه باریجه سبب افزایش معنی‌داری در تکثیر سلول های بنیادی **hMSCs** در بازه غلظتی **0/5** تا **5** میکروگرم بر میلی‌لیتر شد. بررسی میزان تمایز نشان‌دهنده‌ی تأثیر مثبت عصاره باریجه در تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی بود به طوری که در بازه غلظتی **1** تا **10** میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایشی معنی‌دار در فعالیت آلکالین فسفاتاز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر عصاره باریجه دارای تأثیرات مثبت بر تکثیر و تمایز به استخوان در سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی می‌باشد.

گل‌واژگان: باریجه، پوکی استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، عصاره گیاهی، ***Ferula gummosa***

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بافت استخوان بافتی پیوسته است که از دو تیپ سلولی استئوبلاست و استئوکلاست تشکیل شده است. پایداری بافت استخوانی در گرو عملکرد مناسب و هماهنگ این دو تیپ متفاوت سلولی می‌باشد [1]. مراحلی که از آنها به عنوان بازسازی استخون نام برده می‌شود از طریق فرسایش بافت‌های استخوانی توسط سلول‌های استئوکلاست و جایگزینی حفره‌های حاصل آنها با بافت استخوانی جدید توسط سلول‌های استئوبلاست انجام می‌شود [2]. هورمون استروژن تأثیر خود را بر روند استخوان‌سازی از طریق تأثیر بر گیرنده‌های استروژن (ERs) (Estrogen Receptors) که در سلول‌های سازنده و فرساینده استخوان (استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها) وجود دارند، اعمال می‌کند [3]. بیماری پوکی استخوان یکی از معدود بیماری‌هایی است که طیف وسیعی از افراد سالمند را در سراسر جهان مبتلا می‌نماید. در اصطلاح پزشکی پوکی استخوان به شرایطی اطلاق می‌شود که در آن ضعف ساختاری در اسکلت بدن به دلیل کاهش توده استخوانی و زوال ریز ساختار بافت استخوان به وقوع می‌پیوندد که منجر به افزایش ریسک شکستگی استخوان می‌شود [4]. این بیماری در اثر فعالیت نامتعادل سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست و در نتیجه عدم توازن بین ساخت و فرسایش استخوان به وجود می‌آید [5]. حدود 80 در صد افراد مبتلا به پوکی استخوان را زنان تشکیل می‌دهند. این بیماری از علل اصلی شکستگی‌های استخوان در زنان یائسه و مسن است. در زنان روند فرسایش استخوان پس از یائسگی به علت کاهش سطح هورمون استروژن و به طبع آن سرعت گرفتن روند فرسایش استخوان‌ها در مقایسه با روند تشکیل استخوان صورت می‌گیرد [6]. در دهه‌های اخیر، معمول‌ترین راه برای درمان این بیماری استفاده از روش درمان با جایگزین هورمون (HRT) (Hormone replacement therapy) است. با اینکه HRT روش مؤثری در درمان بیماری پوکی استخوان محسوب می‌شود با این وجود در سال‌های اخیر به دلیل افزایش ریسک ابتلا به سرطان‌های سینه و رحم و افزایش احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی و تصلب شرایین در بیماران تحت درمان با این روش توصیه به استفاده از این روش درمانی کاهش بسزایی داشته است. به همین دلیل اخیراً دانشمندان درصدد یافتن جایگزین برای این روش درمان بوده‌اند [7]. گیاهان دارویی به عنوان منابعی در دسترس حاوی فیتواستروژن به عنوان جایگزین برای درمان پوکی استخوان پیشنهاد می‌شوند. فیتواستروژن‌ها یا استروژن‌های گیاهی، ترکیباتی هستند که با تغییراتی که از سوی فلور طبیعی بدن بر روی آنها اعمال می‌شود، عملکردی شبیه استروژن از خود نشان می‌دهند [8]. فیتواستروژن‌های موجود در گیاهان به صورت رقابتی به گیرنده‌های استروژنی متصل شده، در نتیجه باعث کاهش ابتلا به سرطان رحم و یا کاهش کلسترول خون و همچنین تأثیر مثبت بر استخوان‌سازی می‌شوند [9]. تا به حال چندین گونه از گیاهان دارای فیتواستروژن شناخته شده‌اند. گیاه باریجه با نام انگلیسی - Galbanum – گیاهی چند ساله منوکارپیک و یکی از گونه‌های جنس - *Ferula*- از خانواده گیاهی چتریان – *Apiaceae* – می‌باشد. جنس *Ferula* از جمله جنس‌های پرجمعیت خانواده چتریان می‌باشد که بالغ بر 130 گونه در دنیا دارد [10]. این گیاه در مناطق کوهستانی مرکزی و شمال شرق ایران می‌روید. صمغ رزینی *F. gummosa* تحت عنوان باریجه استفاده‌های زیادی در طب سنتی ایران دارد. باریجه اثر نیرودهنده، ضد نزله و ضد تشنج دارد. سابقاً به عنوان قاعده‌آور و رفع بیماری‌های رحمی مصرف داشته است. اخیراً در یک مطالعه تأثیر عصاره استونی بذر این گیاه در کاهش تشنج‌های دوره‌ای در موش‌های آزمایشگاهی اثبات شد [11]. در یک مطالعه خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی این گیاه گزارش شد [12]. در مطالعه دیگری تأثیر فراکشن کلروفورمی این گیاه بر کاهش وابستگی به مورفین از طریق اتصال به گیرنده‌های مورفین در رت‌های صحرایی گزارش شد [13]. در مطالعه‌ای دیگر عصاره این گیاه مؤثر بر اختلالات مغزی ناشی از پیری گزارش شد [14]. در یک مطالعه سزکویی‌ترپن

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج شده از گونه هرمونیس به عنوان محرک قوای جنسی در رت‌های ماده اثبات شده است [15]. در پژوهشی که بر ماده فروتنینین استخراج شده از گونه *F. hermonis* انجام شده، کاربرد متوالی عصاره اتانولی فروتینین سبب افزایش میل جنسی در رت‌های نر و کاربرد موردی فروتینین سبب کاهش میل جنسی شد. با توجه به نتایج استخراج شده از این پژوهش، عصاره تأثیرات محرک و بازدارندگی میل جنسی این گیاه در جنس نر مربوط به ترکیبات دارای خاصیت استروژنی و آنتی‌استروژنی عصاره در کنار هم می‌باشد [16]. مطالعات سیستمیک متعدد وجود سه دسته اصلی از ترکیبات استروژنی ترپنوید کومارین‌ها، سسکویی‌ترپن لاکتون‌ها و ترپنویید استرها را در این جنس گیاهی ثابت کرده است که دسته اخیر از این جنس گیاهی برای اولین بار استخراج شده‌اند [17]. با وجود حجم گسترده پژوهش‌های انجام شده در مورد گیاهان جنس فلورا، تعداد اندکی از مطالعات به بررسی خواص گیاهان این جنس در شرایط in vitro پرداخته‌اند. بنابراین از آنجایی که به نظر می‌رسد عصاره ریشه گیاه باریجه با دارا بودن ترکیبات فعال استروژنی در پروسه تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مؤثر باشد. هدف از تحقیق حاضر، بررسی نقش عصاره گیاه باریجه بر روند استخوان‌سازی در طی مرحله تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول استخوانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. ریشه گیاه باریجه از کوه‌های استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد و پس از تأیید در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی، ریشه‌ها شسته و به قطعات کوچک تقسیم و سپس در سایه خشک شد. قطعات ریشه سپس به وسیله دستگاه آسیاب به صورت پودر درآمده و در اتانول 95 درصد خیسانده شد و سپس با استفاده از دستگاه روتاری حلال اضافی تبخیر شد. عصاره به دست آمده سپس در حلال دی‌متیل سولفوکساید به میزان 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شده سپس به وسیله فیلتر 0/2 میکرومتر استریل شد.

کشت سلول‌های بنیادی انسانی: سلول‌های بنیادی مورد مطالعه از مغز استخوان انسانی (hMSCs) مورد استفاده در پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات هماتولوژی بیمارستان امام تهران از مغز استخوان و با کسب رضایت از فرد استخراج شد و در یک لوله هپارینه به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد. سپس با استفاده از بافر Sigma (Hank's buffered salt solution) (HBSS) هم دما با اتاق حجم نمونه‌ها به 25 میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از گرادیان غلظتی با فایکول (Pharmacia-Amersham) لایه سلولی مابین فایکول و HBSS جمع‌آوری و به لوله فالکون منتقل و شستشو شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی در فلاسک‌های 25 سانتی‌متری در محیط شامل DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (سیگما) و 10 درصد سرم جنینی گاوی (سیگما) همراه با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (100 واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسن (100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و 5 درصد CO_2 کشت داده شدند. برای روند مطالعه از سلول‌های پاساژ 3 استفاده شد.

بررسی توان زیستی: به منظور بررسی سمیت احتمالی عصاره ریشه باریجه در سلول‌های بنیادی انسانی، ابتدا در پلیت‌های 96 خانه‌ای به میزان 100 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که حاوی 5×10^3 سلول بود در هر چاهک کشت شده و پس از گذشت 24 ساعت محیط کشت قبلی با محیط کشت تازه به علاوه غلظت‌های مختلف عصاره باریجه تعویض شدند. سپس پلیت‌های آماده شده به مدت یک تا 3 روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و فشار 5 درصد CO_2 قرار گرفتند پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط رویی سلول‌ها را خارج شد و به هر چاهک 10 میکرولیتر محلول MTT به علاوه 90 میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و به مدت 3 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه شد. سپس به هر چاهک 100 میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید DMSO (Merck) جهت حل کردن بلورهای فورمازان افزوده و میزان جذب توسط دستگاه الایزا ریدر مدل Anthos 2020 (استرالیا) در طول موج 630 - 540 نانومتر قرائت شد.

کشت تمایز به استخوان: سلول‌های پاساژ 3 در پلیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

12 چاهکی و به میزان $10^5 \times 1$ در هر چاهک کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم 80 درصد محیط رویی سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان به همراه مقادیر مقادیر مختلف عصاره رازیانه حاوی 0/5 تا 10 میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، جایگزین شد. جهت مقایسه، یک تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. محیط تمایز به استخوان حاوی DMEM حاوی 10 درصد FBS، 10 میلی‌مولار بتا گلیسرو فسفات، 10 نانو مولار دگزامتازون و 50 میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید - 3 فسفات بود. محیط کشت هر 3 روز یک‌بار تعویض شد.

تست بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: به منظور بررسی تأثیر عصاره رازیانه بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، در بازه‌های زمانی مختلف در طول دوره تمایز، گروه‌های مختلف از لحاظ میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با یکدیگر مقایسه شدند. بدین‌منظور، ابتدا کل پروتئین موجود در چاهک‌های مربوط به گروه‌های مختلف عصاره‌ها با استفاده از محلول 200 میکرولیتر محلول ریپا (Radio-Immunoprecipitation Assay) (Ripa) استخراج شد. سپس فعالیت آنزیم با استفاده از کیت تجاری ساخت شرکت پارس آزمون کشور ایران که حاوی سوبسترای این آنزیم به نام پارانیتروفنول بود، اندزه‌گیری شد. میزان پروتئین کلی موجود در سلول نیز با استفاده از روش براد فورد اندازه‌گیری شده و میزان فعالیت آنزیم (U/L) با توجه میزان کلی پروتئین (mg/dl) نرمالایز شد. جهت بررسی وضعیت تمایزی سلول‌ها در گروه‌های متفاوت شامل گروه کنترل که شامل فقط محیط تمایزی و گروه‌های تیمار شامل محیط تمایزی به همراه مقادیر متفاوت عصاره گیاهی در غلظت‌های 50 - 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر دسته‌بندی شدند. همچنین به منظور مقایسه میزان تأثیر عصاره گیاهی با داروهای استاندارد، از استروژن سنتتیک 17- بتا استرادیول (ساخت شرکت سیگما) با غلظت 10 نانومولار در یک گروه جداگانه استفاده شد.

آنالیز آماری - تمامی آزمایش‌ها با 5 تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16.0 صورت گرفت. در این پژوهش از تست آماری one - way ANOVA استفاده شد. سطح معنی‌داری نتایج به صورت $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار و به صورت درصد کنترل بیان شد.

نتایج

(شکل شماره 1) نشان‌دهنده‌ی مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی قبل از تأثیر عصاره گیاهی می‌باشد.

نتایج بررسی تأثیر سمیت سلولی

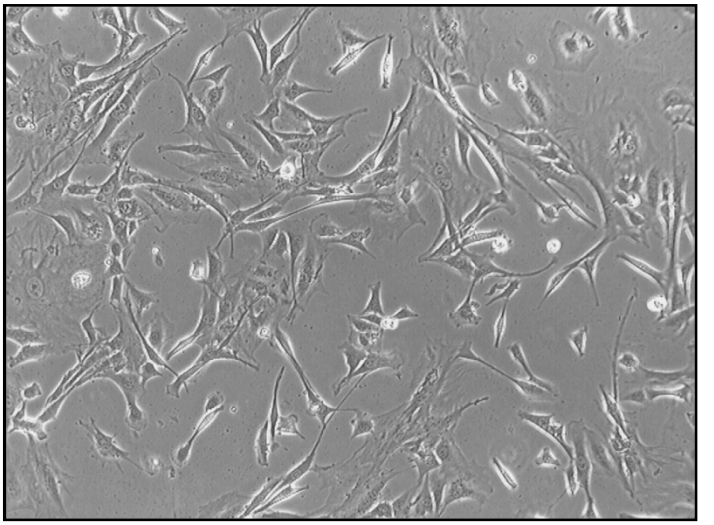
جهت بررسی تأثیر سمیت سلولی عصاره تام ریشه گیاه باریجه در غلظت‌های 1، 5، 10، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر، تهیه شد. همان‌طور که در نمودارهای شماره 1 و 2 مشخص است پس از طی بازه‌های زمانی 24، 48 و 72 ساعت، مواجهه سلول‌ها با عصاره گیاهی افزایش معنی‌داری در روند تکثیر سلولی در غلظت‌های به کار رفته در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. با توجه به نتایج مشخص شد که هر چند در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تام میزان جذب کاهش یافت، اما غلظت‌های 1، 5، 10، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌های زمانی مورد بررسی سمیت معنی‌داری بر سلول‌ها نداشتند. همچنین پس از آنالیز آماری داده‌ها مشخص شد بازه غلظتی 0/5 تا 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌های زمانی 48 و 72 ساعت پس از تیمار با عصاره سبب افزایش معنی‌داری در تکثیر سلولی در مقایسه با گروه کنترل شد و حداکثر تکثیر در غلظت 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد ($p \leq 0/05$).

نتایج بررسی تأثیر عصاره گیاهی بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

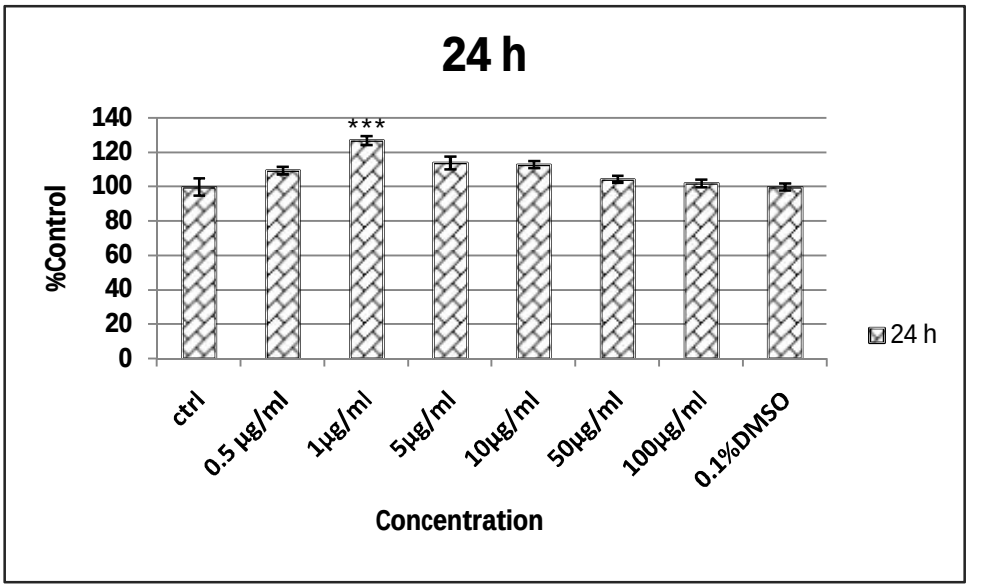
با توجه به نمودار شماره 3 میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز درگروه تیمار 1 تا 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری از خود نشان داد. همان‌طور که

www.SID.ir

Archive of SID



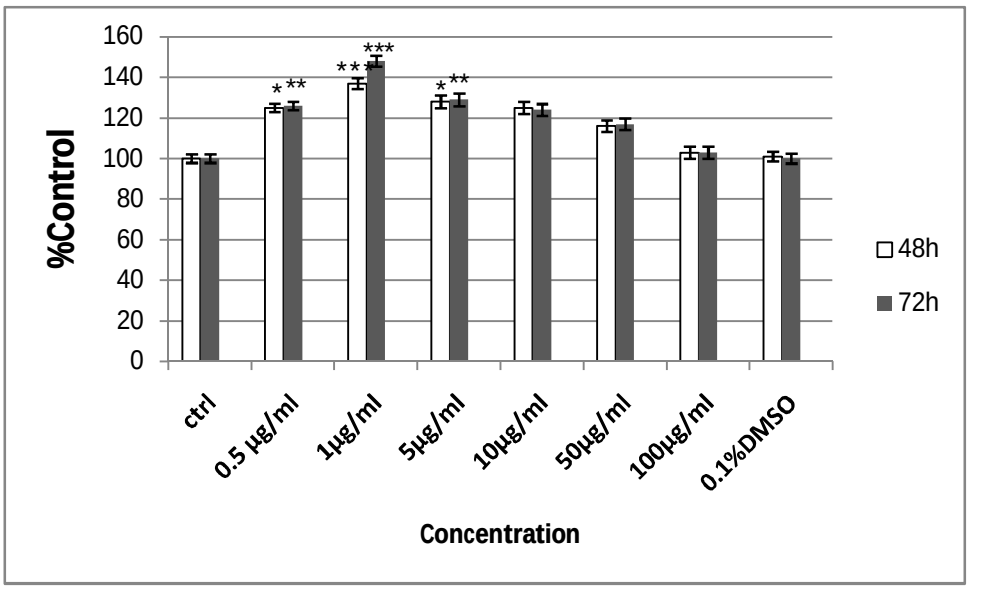
شکل شماره 1- نشان‌دهنده‌ی مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی قبل از تأثیر عصاره گیاهی می‌باشد



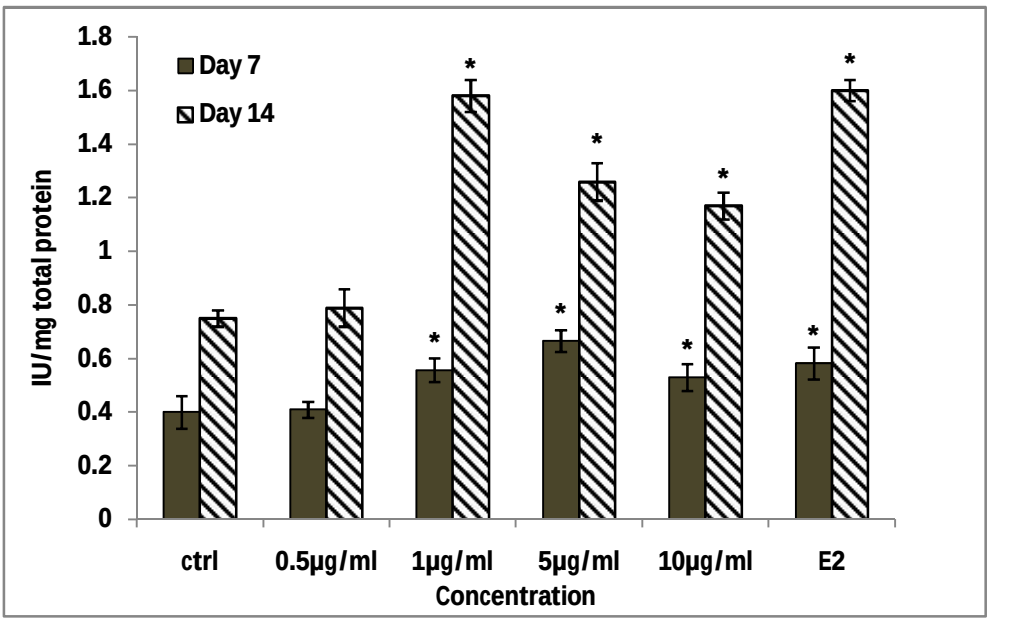
نمودار شماره 1- نمودار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان انسانی پس از 24 ساعت از تیمار با عصاره ریشه باریجه با استفاده از تست MTT * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در مقایسه با گروه کنترل است ($p\leq 0/001$)**

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره 2- نمودار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی پس از طی **48** و **72** ساعت از تیمار با عصاره ریشه گیاه باریجه، **(0/001≥ p ****)** و **(0/01≥ p **)** و **(0/05≥ p *)** نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری نتایج در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



نمودار شماره 3- الگوی تأثیر عصاره ریشه گیاه باریجه و تیمار **17-** بتا استرادیول (E_2) بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بازه‌های زمانی **7** و **14** روز پس از القاء تمایز، ***** نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری نتایج در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد **(0/5≥ p)**

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری در فعالیت این آنزیم در حضور عصاره رازیانه در غلظت‌ها 1 تا 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل در روزهای 7 و 14 تمایز وجود دارد. این افزایش در فعالیت در تیمار با 17- بتا استرادیول هم مشاهده شد (نمودار شماره 3).

بحث

در پژوهش حاضر تأثیر عصاره اتانولی گیاه باریجه بر روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی بررسی شد. در این مطالعه از تست MTT جهت بررسی تأثیر عصاره ریشه گیاه باریجه بر میزان تکثیر سلولی استفاده شد. با توجه به بررسی نتایج تست سمیت عصاره گیاه باریجه هیچ‌یک از غلظت‌های به کار رفته (0/5 تا 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از گذشت 24، 48 و 72 ساعت از تیمار دارای اثر سمیت بر سلول‌های بنیادی نبود. با توجه به نتایج تست MTT میزان تکثیر سلولی در حضور عصاره باریجه به صورت وابسته به زمان و غلظت تغییر کرد. سلول‌های مغز استخوان پس از 24، 48 و 72 ساعت پس از تیمار با غلظت 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای حداکثر تکثیر سلولی بودند و با افزایش غلظت به تدریج از میزان تکثیر سلولی کاسته شد. این نتایج با نتایج گزارش شده از پژوهش‌های پیشین یکسان بود. در تحقیقی که ژو و همکاران انجام دادند سمیت و همچنین میزان تکثیر سلولی در حضور ماده رسوراتول که از گیاهان استخراج می‌شود بر رده سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان انسانی بررسی شد. در این تحقیق ماده رسوراتول در غلظت‌های پایین یعنی 0/1 µM دارای اثرات تحریکی بر تکثیر سلولی بود و با افزایش غلظت در 10 µM تیمار یا ماده رسوراتول دارای اثر ممانعت‌کنندگی از تکثیر سلولی بود [18]. در مطالعه دیگری موراویوا و همکاران تأثیر منوترپنوئید فروتنین را که فیتواستروژنی قوی محسوب می‌شود و از ریشه گیاهان جنس فرولا استخراج شده است را بر میزان تکثیر رده سلول‌های شبه استئوبلاستی MC3T3-E1 در بازه‌های غلظتی 10^{-6} تا 10^{-12} و در بازه‌های زمانی 72 و 48، 24 ساعت پس از تیمار با عصاره بررسی کردند. با توجه به نتایج فروتنین در بازه زمانی 48 ساعت پس از تیمار در پایین‌ترین غلظت به کار رفته 10^{-6} دارای بیشترین تأثیر تکثیری بر رده سلول‌های شبه استئوبلاستی بود و به تدریج و با افزایش غلظت عصاره از شدت تکثیر سلول‌ها کاسته می‌شد که با الگوی ترسیم شده در مطالعه حاضر هماهنگی دارد [19]. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره اتانولی گیاهان دارویی باریجه دارای اثر افزایشی بر تکثیر سلول‌های بنیادی می‌باشند. از انجا که سلول‌های بنیادی مزانشیمال کاندیدای مناسبی جهت پیوند در مهندسی بافت محسوب می‌شوند، اثر تکثیری این عصاره می‌تواند دارای تأثیر مثبتی در استفاده از این سلول‌ها باشد.

در پژوهش حاضر به منظور بررسی اثرات عصاره ریشه گیاه باریجه روند تمایز به استخوان ازمیزان تغییرات در فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز استفاده شد. بافت استخوانی انسانی از ماتریکسی معدنی شده به همراه سلول‌های استخوانی تشکیل شده است. استئوبلاست‌ها سلول‌های بالغ و فعال بافت استخوانی محسوب می‌شوند که سبب ساختن این ماتریکس آلی و همچنین مسئول معدنی کردن آن می‌باشند. آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش کلیدی در پروسه تمایز سلول‌های استخوانی ایفاء کرده و اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم به عنوان یکی از مارکرهای اصلی تمایز به استخوان محسوب می‌شود [20]. همان‌طور که از نمودار شماره 2 مشخص است در هر دو بازه زمانی 14 و 7 روز پس از تمایز، بازه غلظتی 1 تا 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاهی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشته و در غلظت 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر این میزان حداکثر و مشابه با گروه بتا - استرادیول بود و افزایش غلظت عصاره سبب کاهش اثر تحریکی بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز شد. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روز 14 تمایز در حداکثر مقدار خود قرار داشت. در مطالعه‌ی وی و همکاران تأثیر پلی‌فنول استخراج شده از گیاه چای سبز را بر تمایز به استخوان سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان انسانی (hMSCs) بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

کردند. در این پژوهش تأثیر بازه‌ی غلظتی 0/1 µM تا 10 از پلی فنول مورد نظر بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به کار رفت که غلظت 0/1 µM دارای بیشترین تأثیر افزایشی بود و با افزایش غلظت از اثر افزایشی پلی‌فنول کاتشین کاسته شد [21]. از آنجایی که آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که نقش کلیدی را در معدنی شدن زمینه استخوانی از طریق بریدن گروه فسفات سوبستراهای فسفات‌دار ایفا می کند و معمولاً این پدیده قبل از شروع رسوب نمک‌های کلسیم‌دار رخ می‌دهد. بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم به عنوان یک شاخص زود هنگام استخوانی شدن قبلاً در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان گزارش شده است [20]. الگوی تأثیر عصاره گیاه باریجه بر روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسانی را می‌توان به وجود فیتواستروژن‌های مختلف در این عصاره گیاهی نسبت داد. تا به حال مطالعات گسترده‌ای بر روی ترکیبات فعال این گونه گیاهی انجام شده است. در مطالعه‌ای که اخیراً توسط جلالی و همکاران بر روی اسانس و رزین استخراج شده از گیاه باریجه صورت گرفته است ترکیبات منوترپنوییدی شامل 130 نوع ترکیب مختلف از جمله 24 نوع هیدروکربن، 52 ترکیب الکلی، شناسایی شده‌اند که از این بین تنها 25 مورد آن قبلاً گزارش شده است. همچنین بر اساس نتایج مطالعه الکل‌های منوترپنی درصد عمده‌ای از اسانس این گونه از فرولا را تشکیل می‌دهند [22،23]. مطالعاتی که اخیراً بر فایتواستروژن‌های استخراج شده از گونه‌های مختلف این جنس گیاهی انجام شده است منجر به استخراج ترکیباتی با خاصیت استروژنی قوی شدند [24]. در مطالعه‌ای تأثیر مثبت منوترپنویید استخراج شده از ریشه گیاهان فرولا بر تراکم توده استخوانی در رت‌های اوواریکتومی شده اثبات شد [25]. همچنین اخیراً مشتقات الکل از ریشه گیاهان این جنس استخراج شده‌اند که دارای اثر استروژنی قوی می‌باشند [2]. در مطالعه‌ای نازرولو و همکاران در سال 2008 بر روی تأثیر خواص استروژنی ترپنویید استرهای استخراج شده از جنس فرولا بر روی رحم موش‌های نژاد ویستار انجام دادند، با توجه به نتایج، بیشترین تأثیر استروژنی مربوط به منوترپنوییدهای فروتنین و تفریدین سپس سسکویی‌ترپنوییدهای شیمگین و شیمگانیندین بود [26]. با توجه به نتایج مطالعه حاضر گیاه باریجه دارای تأثیر مثبت بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که عصاره اتانولی گیاه باریجه دارای تأثیرات مثبت بر روند تکثیر و تمایز به رده استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال استخراج شده از مغز استخوان انسانی می‌باشد.

منابع

1. Szulc P P. Garnero, et al. Biochemical markers of bone formation reflect endosteal bone loss in elderly men—MINOS study. *Bone* 2005; 36: 13 - 21**.**

2. Kushida K, Takahashi M, Kawana K and Inoue T. Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995 August 1, 1995; 80: 2447 - 50.

3. Christensen C, Christensen MS, LARSEN N-E, et al. Pathophysiological Mechanisms of Estrogen Effect on Bone Metabolism. Dose-Response Relationships in Early Postmenopausal Women. *J. of Clinical Endocrinol. Metab.* 1982 December 1, 1982; 55: 1124 - 30.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Gronholz MJ. Prevention, Diagnosis, and Management of Osteoporosis-Related Fracture: A Multifactoral Osteopathic Approach. JAOA*: J. Am. Osteopath Assoc*. 2008; 108: 575 - 85.

5. Richards J.B, Zheng H.-F., et al. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13: 576 - 88.

6. Tielens S, Wymeersch F, Declercq H, Cornelissen M and Sato JD. Effect of 17β-estradiol on the in vitro differentiation of murine embryonic stem cells into the osteogenic lineage. *In Vitro Cell.* Dev-An. 2008; 44: 368 - 78.

7. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann. Int. Med*. 1992; 117: 1016 – 37.

8. Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H and Orimo H. Effect of Soy Protein on Bone Metabolism in Postmenopausal Japanese Women. *Osteoporos Int.* 2000; 11: 721 - 4.

9. Knight DC and Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1996; 87: 897 - 904.

10. Iranshahi M, Sahebkar A, Hosseini ST, Takasaki M, Konoshima T and Tokuda H. Cancer chemopreventive activity of diversin from Ferula diversivittata in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 2010; 17: 269 - 73.

11. Sayyah M, Mandgary A and Kamalinejad M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 82: 105 - 9.

12. Eftekhar F, Yousefzadi M and Borhani K. Antibacterial activity of the essential oil from Ferula gummosa seed. *Fitoterapia* 2004; 75: 758 - 9.

13. Ramezani M, Hosseinzadeh H and Mojtahedi K. Effects of *Ferula gummosa* Boiss. fractions on morphine dependence in mice. *J. Ethnopharmacol*. 2001; 77: 71 - 5.

14. Adams M, Gmünder F and Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders — A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol*. 2007; 113: 363 - 81.

15. Zavatti M, Benelli A, Montanari C and Zanoli P. The phytoestrogen ferutinin improves sexual behavior in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 2009; 16: 547 - 54.

16. Homady M.H., Khleifat K.M., Tarawneh K.A. and AL-Raheil L.A. Reproductive toxicity and infertility Effect of Ferula hormonis extract in mice.*Theriogenol.* 2002; 57: 2247 - 56.

17. Jalali HT, Ebrahimian ZJ, Evtuguin DV and Pascoal Neto C. Chemical composition of oleo-gum-resin from Ferula gummosa. *Ind. Crop. Prods.* 2011; 33: 549 - 53.

18. Zhou H, Shang L, Li X, Zhang X, Gao G, Guo C, et al. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.* 2009; 315: 2953 - 62.

19. Muravyeva Y. Thesis, title "Does Ferutinin Dose-Dependently Increase nodule formation in TNFα activated mt3t3 E1 cell line." College of Human Sience, Florida State University. 2011, 25 - 75.

20. Dang Z. C., Van Bezooijen R. L., et al. "Exposure of KS483 Cells to Estrogen Enhances Osteogenesis and Inhibits Adipogenesis. *J. Bone and Mineral Res.* 2002; 17 (3): 394 - 405.

21. Wei Y, Tsai K, Lin L, Lee Y, Chi C, Chang M, et al. Catechin stimulates osteogenesis by enhancing PP2A activity in human mesenchymal stem cells. *Osteoporos Int.* 2011; 22: 1469 - 79.

22. Jalali HT, Petronilho S, Villaverde JJ, Coimbra MA, Domingues MRM, Ebrahimian ZJ, et al. Deeper insight into the monoterpenic composition of Ferula gummosa oleo-gum-resin from Iran . *Ind. Crop. Prods.* 2012; 36: 500 - 7.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Miyazawa N, Nakanishi A, Tomita N, Ohkubo Y, Maeda T and Fujita A. Novel Key Aroma Components of Galbanum Oil, *J. Agric.* Food *Chem*. 2009; 57: 1433 - 9.

24. Rasulev BF, Saidkhodzhaev AI, Nazrullaev SS, Akhmedkhodzhaeva KS, Khushbaktova ZA and Leszczynski J. Molecular modelling and QSAR analysis of the estrogenic activity of terpenoids isolated from Ferula plants. *SAR and QSAR in Env Res*. 2007; 18: 663 – 73.

25. Palumbo C, Ferretti M, Bertoni L, Cavani F, Resca E, Casolari B, et al. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. *J. Bone Miner Metab*. 2009; 27: 538 - 45.

26. Nazrullaev S, Saidkhodzhaev A, Akhmedkhodzhaeva K, Syrov V, Rasulev B and Khushbaktova Z. Estrogen activity of terpenoids from plants of the genus, *Chem. Natural Products* 2008; 44: 572 - 7.

www.SID.ir