ORIGINAL ARTICLE

Evaluation the Effects of both Aqueous and Alcoholic Extract Derived from the Root of Rubia Tinctorum on the Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells

Rezvan Yazdian-Robati [1]
Zeinab Asghari Ayask [2]
Sepideh Arabzadeh [2]
Maryam Hashemi [3,4]
Fatemeh Kalalinia [5,2]

[1] Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] Nanotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[5] Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received September 11, 2023 ; Accepted November 19, 2023)

Abstract

Background and purpose: The osteogenic differentiation of MSCs plays a key role in bone tissue engineering and regenerative medicine, making it essential to explore natural compounds that may enhance this process. This aim this study was to investigate the osteogenic potential of both aqueous and alcoholic extracts derived from the root of Rubia tinctorum on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs).

Materials and methods: Aqueous and alcoholic extracts were prepared from the root of Rubia tinctorum. Rat BM-MSCs were isolated and cultured and their osteogenic differentiation was assessed in the presence of varying concentrations of the extracts using alizarin red staining and alkaline phosphatase (ALP) activity. Cytotoxic effect of root extract of Rubia tinctorum was evaluated using MTT assay.

Results: The MTT assay demonstrated that the root extract of Rubia tinctorum was cytotoxic at 1000 µg/ml. Additionally, the alizarin red assay showed that the most significant color intensity at 1 and 10 µg/ml concentrations on the 14th day. In terms of bone differentiation induction which measured via the alkaline phosphatase test, both the aqueous and alcoholic extracts at 1 and 10 µg/ml concentrations led to substantial increases (14.9- and 14.57-fold for the aqueous extract and approximately 7.37- and 7-fold for the alcoholic extract, respectively) in alkaline phosphatase activity compared to the negative control.

Conclusion: This study sheds light on the osteogenic effects of Rubia tinctorum root extracts, emphasizing their potential as natural agents in promoting bone regeneration and tissue engineering applications. Further investigations into the underlying molecular mechanisms and in vivo studies are warranted to comprehensively evaluate the feasibility of utilizing these extracts for therapeutic bone regeneration purposes

Keywords: Rubia tinctorum, osteogenic differentiation, mesenchymal stem cells, natural extracts, bone tissue engineering

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 281-290 (Persian).

Corresponding Author: Fatemeh Kalalinia - Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. (E-mail: Kalaliniaf@mums.ac.ir)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ویژه نامه ۲ آذر سال ۱۴۰۲ (۲۹۰-۲۸۱)

بررسی اثرعصاره آبی و الکلی ریشه گیاه روناس در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت به سلول های استخوانی

رضوان یزدیان رباطی[۱]
زینب اصغری آیسک[۲]
سپیده عرب زاده[۲]
مریم هاشمی[۳و۴]
فاطمه کلالی نیا[۲و۵]

چکیده

سابقه و هدف: تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش مهمی در مهندسی بافت استخوان و پزشکی بازساختی ایفا می‌کند و کشف ترکیبات طبیعی که ممکن است این فرآیند را بهبود بخشد ضروری است. این مطالعه با هدف بررسی پتانسیل استخوان‌زایی عصاره‌های آبی و الکلی مشتق شده از ریشه *روبیا تنکتوروم* (روناس) بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی (BM-MSCs) انجام شد.

مواد و روش‌ها: از ریشه گیاه روناس عصاره‌های آبی و الکلی تهیه شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش جدا و کشت داده شدند و تمایز استخوانی آن‌ها در حضور غلظت‌های مختلف عصاره ها با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) ارزیابی شد. اثر سیتوتوکسیک عصاره ریشه روناس با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سنجش MTT نشان داد که عصاره ریشه روناس در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتوتوکسیک است. علاوه بر این، آزمون آلیزارین قرمز نشان دهنده بیشترین شدت رنگ در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روز چهاردهم بود. از نظر القای تمایز استخوانی که از طریق آزمایش آلکالین فسفاتاز اندازه‌گیری شد، عصاره‌های آبی و الکلی هر دو در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۱۴/۹ و ۱۴/۵۷ برابر برای عصاره آبی و تقریباً ۷/۳۷ و ۷ برابر برای عصاره الکلی) منجر به افزایش قابل‌توجهی در فعالیت آلکالن فسفاتاز در مقایسه با کنترل منفی شدند.

استنتاج: این مطالعه اثرات استخوان‌زایی عصاره ریشه روناس را مشخص می‌کند و بر پتانسیل آن‌ها به‌عنوان عوامل طبیعی در ترویج بازسازی استخوان و کاربردهای مهندسی بافت تاکید می‌کند. تحقیقات بیش‌تر در مورد مکانیسم‌های مولکولی اساسی و مطالعات درون‌تنی برای ارزیابی جامع امکان‌سنجی استفاده از این عصاره‌ها برای اهداف بازسازی استخوان ضروری است.

واژه های کلیدی: روناس، تمایز استخوانی، سلول های بنیادی مزانشیمی، عصاره های طبیعی، مهندسی بافت استخوان

مقدمه

توانایی استخوان برای ترمیم و بازسازی یک پروسه فیزیولوژیک بسیار منظم و پیچیده است و شامل یک تعادل پویا پیچیده میان تجزیه استخوان قدیمی و بازسازی استخوان جدید است(۱). با این حال ترمیم و

مولف مسئول: فاطمه کلانی نیا– مشهد: دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی E-mail: Kalaliniaf@mums.ac.ir

۱. استادیار، مرکز تحقیقات علوم داروئی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. مرکز تحقیقات نانوفناوری، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۶/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۷/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۸/۲۸

بازسازی خود به خود استخوان دربرخی شرایط بالینی مانند تروما، عفونت، برداشتن تومور و ناهنجاری‌های اسکلتی و هم‌چنین مشکلاتی همانند نکروز استخوانی و نرمی استخوان محدود می‌شود(۳،۲). رویکردهای بالینی استاندارد فعلی برای تقویت بازسازی استخوان شامل روش‌های مختلف پیوند استخوان (پیوند استخوان اتولوگ، آلوگرافت) و جایگزین‌های پیوند استخوان با فاکتورهای رشد است(۴). درمان مبتنی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با بیش از ۱۰۰۰ کارآزمایی بالینی ثبت شده در سراسر جهان به‌عنوان یکی از کانون‌های اکتشاف برای شاخه جدیدی از علم پزشکی به نام پزشکی احیا کننده به شمار می‌آیند(۶،۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به خود نوسازی هستند و توانایی تمایز به انواع سلول‌های متعدد از جمله غضروف، استئوسیت، میوسیت و سلول‌های چربی را دارند. آن‌ها هم‌چنین ویژگی‌های تعدیل‌کننده ایمنی را از طریق ترشح فاکتورهای فعال زیستی مانند فاکتورهای رشد، کموکاین‌ها و سیتوکین‌ها برای تعدیل پاسخ ایمنی و افزایش بازسازی بافت نشان می‌دهند. مطالعات زیادی روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌دست آمده از منشاء مغز استخوان صورت پذیرفته و نشان داده شده است که این سلول‌ها قادر به تولید انواع بافت همبند به ویژه غضروف و استخوان هستند(۹-۷). اهمیت کار بر روی تمایز استخوان از سلول‌های بنیادی در چند جنبه قابل ذکر است. درمان بیماری‌های استخوانی: استفاده از سلول‌های بنیادی برای تمایز و تولید سلول‌های استخوانی می‌تواند در درمان بیماری‌های مربوط به استخوان مانند شکستگی‌ها، افتراق استخوان و بیماری‌های مزمن مفید باشد. این سلول‌ها قادر به ترمیم و بازسازی استخوان‌های آسیب دیده هستند و باعث تسریع فرآیند بهبودی می‌شوند. هم‌چنین پیشگیری از بیماری‌های استخوانی: کار بر روی تمایز استخوان از سلول‌های بنیادی می‌تواند درپیشگیری از بروز بیماری‌های استخوانی نقش مهمی ایفا کند. با استفاده از این سلول‌ها، می‌توان بهبود قابل توجهی در قدرت و سلامت استخوان‌ها داشت و از بروز شکستگی‌ها و ضعف استخوان جلوگیری کرد(۱۰).

نکته مهم این است که شرایط کشت عملیاتی را در نظر بگیریم که نه تنها بر گسترش سلولی بلکه بر تعهد دودمان MSC به سمت بازسازی استخوان تأثیر می‌گذارد.

گیاه روناس با نام علمی (*Rubia tinctorum L*) یک گونه از تیره روناسیان است. قسمت دارویی *Rubia tinctorum* ریشه خشک شده آن است. خواص دارویی متعددی برای روناس ذکر شده است شامل: بازکننده گرفتگی‌ها، ادرارآور و قاعده آور و شیرآور، رفع‌کننده درد سیاتیک، تسریع کننده جوش خوردن استخوان، ضد راشیتیسم، برطرف کردن بی حسی و سستی دست و پا، کمک به درمان و معالجه بیماری فلج، رفع بیماری‌های پوستی و از بین برنده تورم و درمان سنگ کلیه و سنگ مثانه می‌باشد. ترکیبات مهمی که در ریشه این گیاه به‌عنوان منبع دارویی یافت می‌شود دی و تری هیدروکسی آنتراکینون‌هایی مانند پورپورین، آلیزارین و مشتقات آن‌ها ruberythric acid، pseudopurpurin و primeveroside lucidin می‌باشند(۱۱). آنتروکینون‌ها ترکیبات آروماتیک هستند که فعالیت‌های فیزیولوژیکی متعددی مثل اثرات ضد استئوپروزیس، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدمیکروبی، ضدافسردگی و غیره دارند. یکی دیگر از ترکیبات مهم موجود در ریشه روناس مولوجین است(۱۲). در این مطالعه قصد داریم تاثیر عصاره‌های آبی و الکلی ریشه روناس را در القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت به سلول‌های استخوانی را بررسی کنیم. بدین منظور این سلول‌ها در مجاورت با عصاره‌های آبی و الکلی ریشه روناس قرار داده شد و میزان تمایز آن‌ها به استئوبلاست، با سلول‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در مجاورت شرایط استاندارد القای استخوان سازی (محیط حاوی دگزامتازون، آسکوربیک اسید و گلیسروفسفات) قرار داده شده بودند، مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر پس از کسب کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مازندران با رعایت اصول اخلاق در پژوهش‌های حیوانی با کد اخلاق: IR.MUMS.PHARMACY.REC.1399.111 و (IR.MAZUMS..REC.1400.8577 آغاز گردید در ابتدا بتاگلیسروفسفات (Cat. No. G9422)، پودر آلیزارین رد (Cat. No A5533)، NP40 (Cat. No.74385) و پودر MTT از کمپانی سیگما آلدریچ تهیه شدند. پارا فرما لدهید و کلروفرم (Cat. No. K32893031) از کمپانی مرک تهیه شدند. آمپول دگزامتازون از شرکت کاسپین، پودر آسکوربیک اسید از شرکت داروسازی سپیداج خریداری شدند. محیط کشت، پنی سیلین و سرم گاوی از شرکت بیوایده، کیت‌های Alkaline Phosphatase (DGKC) و BCA Protein quantification kit به ترتیب از شرکت‌های پارس آزمون و پارس توس انجام شد.

تهیه عصاره ریشه روناس

مقدار ۱۰۰ گرم از ریشه گیاه روناس از مناطق اطراف مشهد (زشک) واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شد. گیاه مورد نظر در هرباریوم دانشکده داروسازی مشهد شناسایی و صحت آن تایید شد. برای تهیه عصاره الکلی و آبی از روش خیساندن استفاده گردید. بدین صورت که مقدار لازم از پودر ریشه درون بشرهای بزرگ قرار داده شد و روی آن الکل ۸۰ درصد و یا آب ریخته به گونه‌ای که حلال بالاتر از سطح پودر قرار گیرد. سپس سطح بشرها با فویل آلومینیومی کاملاً پوشانده شدو به‌مدت ۴۸ ساعت و هر چند ساعت با همزن شیشه‌ای مخلوط و هم زده شد سپس در چندین نوبت مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد تا بیش‌ترین عصاره به‌دست آید. برای خارج کردن اتانول از عصاره برگ گیاه از دستگاه حذف حلال استفاده شد. در نهایت عصاره‌ها در دستگاه Freeze Dryer گذاشته شد(۱۳).

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت

رت‌های نر نژاد ویستار یک ماهه با وزن تقریبی ۱۰۰ تا ۱۳۰ گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری و در اتاق حیوانات پژوهشکده بوعلی مشهد، در شرایط طبیعی و با دوره نوری متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. برای انجام آزمایش، رت‌ها با استفاده از کلروفرم کشته شدند، استخوان‌های ران و درشت نی آن‌ها جدا گردید و پس از ضد عفونی با الکل ۷۰ درصد درون پتری دیش حاوی PBS سرد قرار داده شد. پس از پاکسازی بافت‌های اطراف با استفاده از انبر مخصوص دو انتهای استخوان شکسته شده و مغزاستخوان با روش Flushing از درون استخوان به درون یک بطری تخلیه گردید. پس از سانتریفیوژ محتوای بطری، پلیت سلولی حاصل در DMEM با گلوکز کم کامل شده با ال-گلوتامین، سرم گاوی (v/v)۱۵ درصد و پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شد و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 پنج درصد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت فقط سلول‌های MSCs قابلیت چسبندگی داشته و به ته فلاسک چسبیدند و سایر سلول‌های شناور به دنبال شستشو با PBS دور ریخته شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام و سلول‌ها پس از پاساژ سوم برای آزمایش استفاده شدند(۱۴).

تعیین سیتوتوکسیسیته عصاره ریشه روناس با استفاده از روش MTT

به منظور بررسی دوز مناسب عصاره ریشه روناس بر روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان، این سلول‌ها با دوزهای متفاوت (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند و پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط حاوی عصاره ریشه روناس تخلیه شده و ۲ بار با PBS شستشو داده شد. در هر چاهک ۱۰۰µl

محیط کشت تازه حاوی معرف MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml اضافه شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون، محتوای پلیت تخلیه شده و ۱۰۰µl از DMSO اضافه شد. در نهایت جذب در طول موج ۵۷۰ nm در مقابل طول موج مرجع ۶۳۰ nm توسط Elisa plate reader خوانده شد(۱۵). برای محاسبه درصد زنده مانی از فرمول زیر استفاده شد:

(جذب هر نمونه÷جذب نمونه کنترل)× ۱۰۰ = درصد میزان پایایی(زنده مانی) سلولی(Viability Rate)

القا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت

برای القای تمایز استخوانی، ۵۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی رت در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کاشته شد. هنگامی که تراکم سلولی به ۸۰ درصد رسید، با دوزهای مختلف عصاره ریشه روناس (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار گردید و تا ۱۴ روز با محیط تیماری تازه تعویض انجام شد. در این مطالعه، گروه کنترل مثبت با محیط استاندارد القای تمایز استخوانی (دگزامتازون (۱۰۰ nM)، آسکوربیک اسید (۵۰ µg/ml) و بتا گلیسروفسفات (۱۰ nM)) تیمار شد(۱۵). در گروه کنترل منفی سلول‌ها با محیط کشت DMEM تیمار شدند. و در گروه بررسی اثر سینرژیسمی به سلول‌ها محیط کشت حاوی اجزای محیط کشت استاندارد القای تمایز استخوان و عصاره ریشه روناس با همان غلظت‌ها اضافه شد.

تعیین تمایز به اوستئوسیت با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

برای رنگ‌آمیزی آلیزارین رد(قرمز) و اندازه‌گیری سطح ذخایر کلسیمی در ماتریکس خارج سلولی، پس از ۱۴ روز از سپری شدن دوره القای تمایز، محیط رویی تخلیه و با pbs شستشو داده شد و پس از ۵ دقیقه با فرمالین ۴ درصد تثبیت انجام شد، سپس ۴۵ دقیقه در معرض رنگ‌آمیزی آلیزارین رد قرار داده شدند. پس از این مرحله رنگ ترکیب نشده با دقت تخلیه شده و سلول ها ۴ مرتبه، هر بار ۵ دقیقه، توسط PBS ۵۰۰ µl شستشو داده شد. محیط شستشو تخلیه شده و مقداری PBS اضافه شد. سلول‌های تمایز یافته (استئوبلاست‌ها) به رنگ قرمز-نارنجی نمایان شدند. جهت آنالیز کیفی، سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شده و از آن‌ها عکس گرفته شد(۱۶).

تعیین تمایز به اوستئوسیت با استفاده از سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز: به منظور سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز، سلول های بنیادی مغز استخوان به‌مدت ۱۴ روز تحت تاثیر محیط کشت DMEM با دوزهای متفاوت عصاره ریشه روناس تیمار شدند پس از طی زمان مورد نظر، محیط رویی خارج و سپس دو مرتبه با PBS شستشو شد و توسط بافر لیزکننده NP40 لیز شدند. هر نمونه ۳ دوره هر بار ۲۰ ثانیه با فاصله ۲ دقیقه، با استفاده از پروب سونیکیتور با قدرت ۲۰ درصد سونیکیت شد. سپس ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰gدر دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد سپس با استفاده از کیت سنجش آلکالین فسفاتاز فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۰۵ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت(۱۷).

آنالیز آماری

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism® 9 انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± SEM ارائه شده‌اند. در مقایسه داده‌ها، غلظت‌های مختلف با گروه‌های کنترل و نرمال از آزمون ANOVA و سپس آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. معیار معنی‌دار بودن نتایج P<۰/۰۵ منظور شده است.

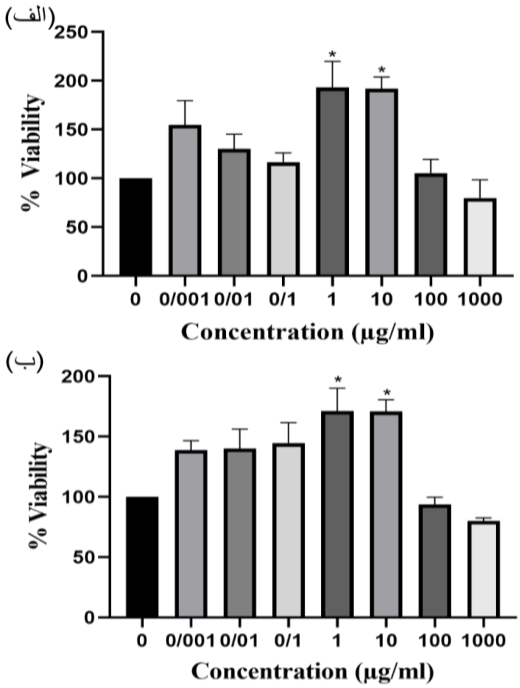
یافته ها

تعیین دوز مناسب عصاره ریشه روناس (آبی و الکلی) بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت نر نژاد ویستار یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که هر دو نوع عصاره ریشه روناس (آبی و

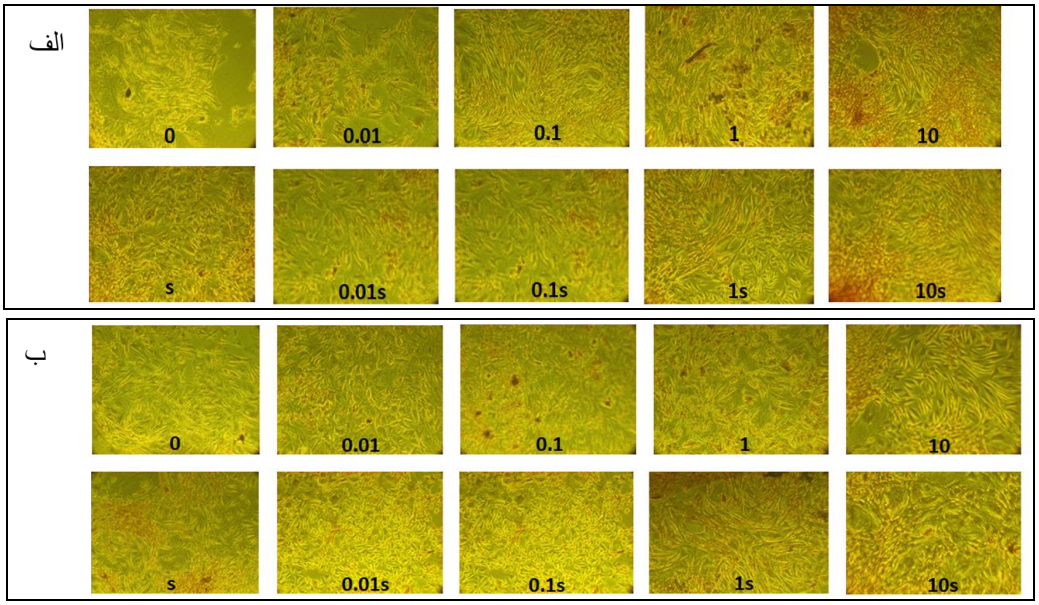
الکلی) در دوزهـای بـالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث تجزیه سلولی می شـوند. از این‌رو غلظت مناسـب برای بررسی تمایز عصاره آبی ریشه روناس کم‌تـر از ۱۰۰۰ میکروگرم بـر میلـی‌لیتـر تعیـین شـد (نمودار شماره ۱).

اثـر عصـاره ریشـه رونـاس(آبی و الکلـی) بـر تمـایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت نر نژاد

تست رنگ آمیزی آلیزارین رد: به منظور سـنجش معدنی شـدن مـاتریکس سـلولی در تائیـد تمـایز، تسـت رنـگ‌آمیـزی آلیـزارین رد در دو زمـان قبـل از تمـایز و اخرین روز تمـایز انجـام شـد. در رونـد تمـایز سـلول‌هـا کلسیفه شده و کلسیم در سلول‌ها رسوب مـی‌کنـد. پـس از رنگ آمیزی آلیزارین رد، هرچه رنگ قرمز در سلول محیط بیش‌تر باشد نشان‌دهنده رسـوب کلسـیم بـیش‌تـر است(۱۹). در بررسی کیفی آزمـایش آلیـزارین رد مشـاهده شد که در روز ۱۴ بـیش‌تـرین شـدت رنـگ مربـوط بـه غلظت‌های ۱ و۱۰µg/ml عصاره ریشه روناس نسـبت بـه سایر غلظت‌های آن وجود دارد (تصویر شماره ۱).



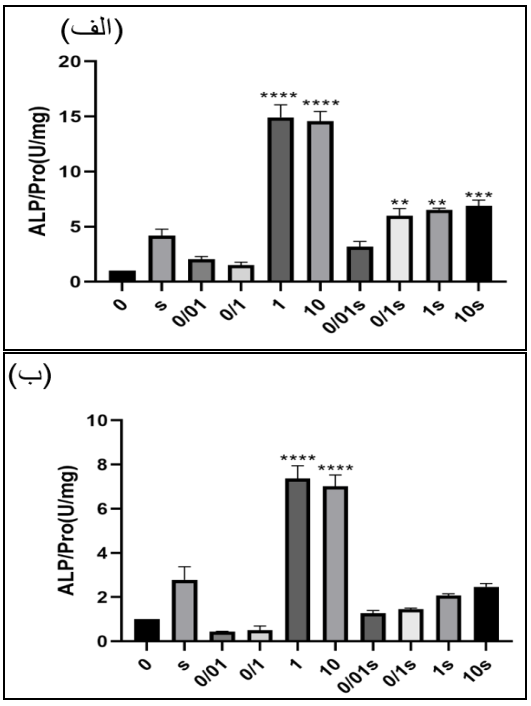
نمودار شماره۱: بررسی سمیت عصاره آبی(الف) و الکلی(ب)ریشـه روناس بر سلول های بنیادی مزانشیمی.سلول‌ها همراه بـا غلظت‌هـای مختلف عصاره ریشه روناس به مدت ۴۸ سـاعت در دمـای 37 C^o و 5 CO2 درصد انکوبه شدند. سپس با اسـتفاده از تسـت MTT میـزان سمیت بررسی شد. نتایج حاصل ۳ بار آزمایش و هر بار ۳ تکـرار بـه صورت میانگین ± SEM گزارش شده است. معنی دار بـودن نسـبت به نمونه کنترل منفی بدین صورت نشان داده شد: $P \leq ۰/۰۵$ *



تصویر شماره ۱: بررسی میزان تمایز سلول های بنیادی تیمار شده با عصاره (الف) آبی، (ب) الکلی ریشه روناس بـه روش کیفـی آلیـزارین رد.ایـن تصـویر توسط میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی X ۱۰۰ گرفته شد. S مطرح کننده محیط استاندارد القای تمایز و در کنار غلظت‌هـای مختلـف بـه معنـای ترکیب نمونه‌های عصاره با غلظت‌های متفاوت به همراه محیط استاندارد القای تمایز می‌باشد.

میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

نتایج حاصل از تست آلکالین فسفاتاز نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان رت تیمار شده با عصاره روناس پس از طی ۱۴ روز از تمایز، به‌طور چشمگیری نسبت به گروه شاهد افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و معدنی شدن دارند. درنمودار شماره۲ S مطرح‌کننده محیط استاندارد القای تمایز و در کنار غلظت‌های مختلف به معنای ترکیب نمونه‌های عصاره با غلظت‌های متفاوت به همراه محیط استاندارد القای تمایز می‌باشد. نتایج حاصل ۳ تکرار به صورت میانگین ± SEM گزارش شده و معنی‌دار بودن نسبت به نمونه کنترل منفی نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲: بررسی میزان تمایز سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی (الف) آبی، (ب) الکلی ریشه روناس در روز ۱۴ به روش کمی آلکالن فسفاتاز. (****: ۰/۰۰۰۱ ≥P)

بحث

در پژوهش حاضر، پتانسیل تمایزی عصاره ریشه روناس در دوحالت به تنهایی و با استفاده از محیط تمایزی به دودمان‌های اوستئوژنیک ارزیابی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از آن‌جایی‌که بیان بالای آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یکی از شاخص‌های تمایز اولیه دودمان اوستئوژنیک در نظر گرفته می‌شود، دوز مناسب عصاره آبی و الکلی ریشه روناس به دلیل افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و حضور گرانول‌های معدنی نسبت به گروه کنترل موجب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به دودمان اوستئوژنیک می‌شود که با نتایج مطالعه شیواکومار و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر وجود ترکیبات موثر در ریشه روناس در تمایز به دودمان اوستئوژنیک مطابقت دارد(۱۹). به‌دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی در گیاهان، در سال‌های اخیر بحث استفاده از این ترکیبات فعال در حوزه پزشکی و درمانی به دلیل دارا بودن عوارض جانبی کم‌تر بسیار مورد توجه قرارگرفته است(۲۱،۲۰). در این مطالعه برای بررسی میزان سمیت عصاره‌های آبی و الکلی ریشه روناس روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از تست MTT استفاده گردید. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که عصاره آبی و الکلی فقط در غلظت ۱۰۰۰ µg/ml بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا MSC اثرات سمی داشت. بنابراین برای آزمایشات بعدی، از غلظت های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ µg/ml عصاره ریشه روناس استفاده شد. در مرحله بعد، به منظور بررسی اثرعصاره ریشه روناس بر القای تمایز به استخوان، سلول های بنیادی مغز استخوان در چهار گروه کنترل مثبت (حاوی محیط استاندارد القای تمایز به استخوان)، گروه آزمایش حاوی غلظت‌های مختلف عصاره ریشه روناس، گروه سینرژیسمی حاوی غلظت‌های مختلف عصاره ریشه روناس و محیط استاندارد القا کننده تمایز و کنترل منفی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تأیید تمایز سلول ها به سلول های استئوبلاست، از رنگ آمیزی آلیزارین رد استفاده شد. نتایج حاصل از رنگ آمیزی آلیزارین رد در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی ریشه روناس در دو غلظت ۱و ۱۰ µg/ml، بیشتراز عصاره الکلی آن، قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سمت استئوسیت می‌باشد. به‌طوری‌که رسوب مواد

معدنی در مدت ۱۴روز، به وسیله رنگ آلیزارین رد آشکار شد و ماتریکس خارج سلولی، قرمز رنگ گردید. آزمون سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز، افزایش فعالیت این آنزیم را در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل نشان داد. آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها و هم‌چنین تشکیل استخوان دارد، بنابراین سطح فعالیت آن و نیز میزان رسوب کلسیم یکی از با اهمیت ترین شاخص‌های تمایز استئوژنیک به شمار می آید(۲۲). میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در سلول‌ها، در روز ۱۴ به بیشترین میزان خود رسید؛ به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت آلکالین فسفاتازی، در غلظت µg/ml ۱ مشاهده گردید که بیان کننده تمایز بیشتر سلول‌ها در این غلظت می‌باشد. به بیان دیگر بیش‌ترین افزایش در میزان فعالیت ALP در روز ۱۴ توسط نمونه مجاور شده با عصاره آبی ریشه روناس µg/ml ۱ و µg/ml ۱۰به ترتیب به میزان ۱۴/۹ و ۱۴/۵۷ برابر نمونه کنترل منفی بود (نمودار شماره ۲). هم‌چنین نمونه مجاور شده با عصاره الکلی ریشه روناس کم‌تر از عصاره آبی و به میزان ۷/۳۷ و ۷ برابر نمونه کنترل منفی به ترتیب برای غلظت های ۱ و µg/ml ۱۰ توانست فعالیت ALP را افزایش دهد. همچنین نکته جالب مشاهده شده در این مطالعه این است که مجاورت همزمان عصاره ریشه روناس با محیط استاندارد القای تمایز به استخوان باعث کاهش قابل توجه در القای تمایز در مقایسه با نمونه‌های مجاور شده با عصاره ریشه روناس به تنهایی می‌شود. این نکته در کنار القای قابل ملاحظه تمایز به استخوان توسط عصاره آبی و الکلی ریشه روناس، این ترکیب را به‌عنوان جایگزین مناسبی با اثر بیش‌تر و هزینه کم‌تر برای محیط‌های استاندارد تمایز به استخوان مطرح می‌کند در مطالعه محمودی و همکارانش که در سال ۱۳۹۲ با موضوع بررسی تاثیر عصاره الکلی ریشه گیاه باریجه بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سلول‌های استخوانی انجام شد نشان داده شد که میزان تمایز سلول‌های MSC براساس تست بررسی فعالیت ALP، در مجاورت با عصاره باریجه با غلظت µg/ml ۱ نسبت به کنترل منفی به میزان حدود ۲ برابر بوده است(۲۳). هم‌چنین در مطالعه رمضانی و همکارانش که در سال ۱۳۹۳ که به بررسی تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان تمایز سلول‌های MSC پرداخته است میزان تمایز سلول‌های MSC براساس تست بررسی فعالیت ALP، در مجاورت با عصاره زعفران با غلظت ۷۰۰µg/ml نسبت به کنترل منفی به میزان ۲/۵ برابر گزارش شد(۲۴). در مقایسه کلی بین نتایج اثرات عصاره ریشه روناس در میزان القای تمایز به استخوان، مشاهده می‌شود که عصاره آبی ریشه روناس نسبت به عصاره الکلی اثرات بهتری در القای تمایز به استخوان داشته است.

در این پژوهش با هدف یافتن ترکیباتی موثر در القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به استخوان با اثرات و عوارض جانبی کم‌تر و نیز قیمت پایین‌تر در مقایسه با محیط‌های استاندارد و عوامل موجود القای استئوژنز، تاثیر عصاره ریشه روناس در القای تمایز سلول‌های MSC به سمت سلول‌های استخوانی بررسی شد. نتایج نشان دادند که عصاره ریشه روناس می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای القاکننده تمایز به استخوان در مقایسه با محیط استاندارد استئوژنز باشد. در نتیجه پیش‌بینی می‌شود که این ترکیب به‌عنوان جایگزین مناسبی با اثر بیش‌تر و هزینه کم‌تر برای محیط‌های استاندارد تمایز به استخوان مطرح شوند. ریشه روناس به عنوان یک ماده طبیعی، می‌تواند گزینه مناسبی برای تحقیقات بیش‌تر برای استفاده در درمان برخی بیماری‌ها نظیر پوکی استخوان باشد و هم‌چنین در مطالعات مهندسی بافت نیز می‌تواند مورد توجه قرار گرفته و مفید باشد.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مازندران برای تامین هزینه این

مطالعه سپاسگزاری می‌شود. مقاله حاضر قسمتی از رساله دکترای حرفه ای خانم زینب اصغری آیسک در رشته داروسازی با شماره‌های گرنت (۹۹۱۶۲۰-۸۵۷۷) می‌باشد.

References

1. Tan SHS, Wong JRY, Sim SJY, Tjio CKE, Wong KL, Chew JRJ, et al. Mesenchymal stem cell exosomes in bone regenerative strategies—a systematic review of preclinical studies. Mater Today Bio 2020; 7: 100067.
2. Zhu T, Cui Y, Zhang M, Zhao D, Liu G, Ding J. Engineered three-dimensional scaffolds for enhanced bone regeneration in osteonecrosis. Bioact Mater 2020; 5(3): 584-601.
3. Rama M, Vijayalakshmi U. Drug delivery system in bone biology: an evolving platform for bone regeneration and bone infection management. Polym Bull 2023; 80(7): 7341-7388.
4. Amini Z, Lari R. A systematic review of decellularized allograft and xenograft–derived scaffolds in bone tissue regeneration. Tissue and Cell 2021; 69: 101494.
5. Bunpetch V, Zhang Z-Y, Zhang X, Han S, Zongyou P, Wu H, et al. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration. Biomaterials 2019; 196: 67-79.
6. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. Cell Stem Cell 2018; 22(6): 824-833.
7. Wang X, Thomsen P. Mesenchymal stem cell–derived small extracellular vesicles and bone regeneration. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2021; 128(1): 18-36.
8. Wang J, Liu S, Shi J, Liu H, Li J, Zhao S, et al. The role of lncRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther 2020; 15(3): 243-249.
9. Mahmoud NS, Ahmed HH, Mohamed MR, Amr KS, Aglan HA, Ali MA, et al. Role of nanoparticles in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Cytotechnology 2020; 72(1): 1-22.
10. Marie PJ, Fromigué O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Regen Med 2006; 1(4): 539-548.
11. Nejad HE, Nejad AE. Rubia tinctorum L.(Rubiaceae) or Madder as one of the living color to dyeing wool. Int J Adv Biol Biomed Res 2013; 1(11): 1315-1319.
12. Jia Z, Yan G, Wang Y, He P. Mollugin attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis in rats via Akt/P13K pathway. Trop J Pharm Res 2018; 17(9): 1765-1770.
13. Shakeri A, Hazeri N, Vlizadeh J, Ghasemi A, Tavallaei FZ. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of Anabasis aphylla L. extracts. Kragujevac J Sci 2012; 34(34): 71-78.
14. Kalalinia F, Ghasim H, Farzad SA, Pishavar E, Ramezani M, Hashemi M. Comparison of the effect of crocin and crocetin, two major compounds extracted from saffron, on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Life Sci 2018; 208: 262-267.
15. Hashemitabar S, Yazdian-Robati R, Hashemi M, Ramezani M, Abnous K, Kalalinia F. ABCG2 aptamer selectively delivers doxorubicin to drug-resistant breast cancer cells. J Biosci 2019; 44(2): 39.
16. Tayarani-Najaran Z, Kamali H, Hadizadeh F,

Ahmadi F, Shahidi S, Khodaverdi E. Osteoblast differentiation of human dental pulp stem cells with dexamethasone in-situ forming implant. J Mashhad Dent Sch 2021; 45(1): 70-82.

17. Ahmadi F, Shaidi S, Hadipour E, Khodaverdi E, Hadizadeh F, Kamali H, et al. Effects of Dexamethasone-In Situ Forming Implant (ISFI) on the Differentiation Process of Human Dental Pulp Stem Cells to Osteoblasts. Regen Eng Transl Med 2022; 8(4): 563-570.
18. Harimi S, Zare F, Fesahat F, Mondanizadeh M. Optimizing a Calorimetric Method for Quantitative Assessment of Alkaline Phosphatase to Confirm the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cell. SJKU 2023; 27(6): 25-36.
19. Shivakumar K, Mukund H, Rabin P. Evaluation of antiosteoporotic activity of Root extract of Rubia Cordifolia in Ovariectomized Rats. Int J Drug Dev Res 2012; 4(3): 163-172.
20. Yazdian-Robati R, Tarhriz V, Ranjbaran H, Karimi N, Abasi M. Efficient Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells by Mastic Gum. Biopreserv Biobank 2023; 21(1): 38-45.
21. Gatabi ZR, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Rahimnia SM, Yazdian-Robati R, Hashemi SMH. Green preparation, characterization, evaluation of anti-melanogenesis effect and in vitro/in vivo safety profile of kojic acid hydrogel as skin lightener formulation. J Biomater Sci Polym Ed 2022; 33(17): 2270-2291.
22. Abalymov A, Van Poelvoorde L, Atkin V, Skirtach AG, Konrad M, Parakhonskiy B. Alkaline phosphatase delivery system based on calcium carbonate carriers for acceleration of ossification. ACS Appl Bio Mater 2020; 3(5): 2986-2996.
23. Mahmoudi Z, Soleimani M, Saidi A, Iranshahi M, Azizsoltanli A. Effect of Ferula gummosa ethanolic extract on osteogenesis in human mesenchymal stem cells. J Med Plants 2013; 12(46): 50-59.
24. Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. The Effect of Saffron Aqueous Extract(Crocus sativus L) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. J Birjand Univ Med Sci 2014; 21(2): 169-178 (Persian).