

بررسی آثار استئوژنز داروی هومیوپاتی سیمفیتوم بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی

شهلا واعظی^۱، حمیده معلم زاده حقیقی^۲، سکینه سعیدی سار^۳، سارا عامل فرزاد^۴، سپیده عرب زاده^۵، فاطمه کلالی نیا^{۵*}

- ۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان، دامغان، ایران
- ۲- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۳- گروه کشاورزی، دانشکده شریعتی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای استان تهران، تهران، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات زیست فناوری دارویی، موسسه فناوری داروسازان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
- ۵- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، موسسه فناوری داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۵

*نویسنده مسئول: فاطمه کلالی نیا،
دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی
دارویی، مشهد، ایران
تلفن:
پست الکترونیک:

Kalaliniat@mums.ac.ir

چکیده

مقدمه

بازسازی استخوان یک پروسه فیزیولوژیک بسیار منظم است که طی درمان طبیعی در شرایط نرمال رخ می‌دهد. اما گاه در شرایط سخت بالینی ناکارآمد عمل می‌کند. یکی از راهکارهای درمانی استفاده از روش‌های سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی و عوامل القا کننده تمایز به استخوان است. در این مطالعه اثر داروی هومیوپاتی سیمفیتوم بر القای تمایز سلول بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، از استخوان ران پای رت استخراج شدند. بررسی میزان سمیت داروی سیمفیتوم در طول زمان بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از تست MTT انجام شد. میزان تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از ۷ و ۲۱ روز مجاورت با سیمفیتوم با پوتنسی‌های مختلف با استفاده از تست رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ارزیابی گردید و با محیط استاندارد القای تمایز مقایسه شد.

یافته‌ها

نتایج تست MTT نشان داد که سیمفیتوم می‌تواند بصورت وابسته به زمان میزان رشد و تکثیر سلولی را کاهش دهد بگونه‌ای که این کاهش در پوتنسی ۲۰۰C بسیار شاخص بود و لذا در ادامه از پوتنسی‌های پایین‌تر استفاده شد. نتایج آلیزارین رد نشان داد که همه نمونه‌ها افزایش معنی‌داری در میزان تمایز نسبت به نمونه کنترل منفی، ایجاد می‌کنند. بیشترین شدت القای تمایز به استخوان در نمونه‌های مجاور شده با سیمفیتوم با پوتنسی ۶C مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که داروی سیمفیتوم می‌تواند پس از انجام تست‌های تکمیلی، بعنوان جایگزین مناسبی با اثر بیشتر، سمیت کمتر و هزینه بسیار کمتر برای محیط‌های استاندارد القای تمایز به استخوان پیشنهاد گردد.

کلیدواژه‌ها

بازسازی استخوان، سلول بنیادی مزانشیمی، کامفری، هومیوپاتی



مقدمه

بازسازی استخوان یک پروسه فیزیولوژیک بسیار منظم و پیچیده است که در طی درمان طبیعی شکستگی‌های استخوان دیده می‌شود و همچنین در بازسازی مداوم، هماهنگ و موزون بافت استخوانی در طول زندگی بزرگسالان نقش دارد. با این حال این پروسه در برخی شرایط سخت بالینی ناکارآمد بروز می‌کند که از آن جمله می‌توان به نقایص بزرگ استخوانی ایجاد شده توسط تروما، عفونت‌ها، برداشتن تومور و ناهنجاری‌های اسکلتی و همچنین مشکلاتی همانند نکروز استخوانی، عارضه نان یونیون آتروپیک و نرمی استخوان اشاره نمود.

در حال حاضر، مجموعه‌ای از استراتژی‌های مختلف همانند پیوند استخوان اتوگرافت یا آلوگرافت، استفاده از فاکتورهای رشد، اسکفولدهای القاء کننده تولید استخوان و سلول‌های پیش‌ساز استخوان (سلول درمانی) برای تقویت روند مختل شده یا ناکافی بازسازی استخوان به کار گرفته شده‌اند (۱ و ۲).

همانگونه که اشاره شد یکی از استراتژی‌های مورد استفاده برای بهبود پروسه بازسازی استخوان، سلول درمانی است. بافت استخوان از ماتریکس استخوان و سلول‌های استخوان تشکیل شده است. دو نوع اصلی از سلول‌های استخوانی شناخته شده است به نام استئوبلاست‌ها (سلول‌های استخوان ساز) و استئوکلاست (سلول‌های استخوان خوار). سلول‌های استئوبلاست از منشاء سلول‌های بنیادی مزانشیمال^۱ و سلول‌های استئوکلاست از منشاء سلول‌های بنیادی خونساز ساخته می‌شوند (۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، یکی از انواع سلول‌های بنیادی بالغ هستند که در

دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. مطالعات زیادی روی سلول‌های MSCs به دست 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 (۴).

درک مکانیسم‌های کنترل کننده تمایز سلول‌های MSCs به سمت سلول‌های استئوبلاست، یکی از حوزه‌های اساسی تحقیقات زیست شناسی استخوان است. افزودن فاکتورهای شیمیایی و مورفوزنر خاص به محیط کشت سلول‌های MSCs، سبب القای تمایز آنها به یک نوع سلول خاص می‌شود. به عنوان مثال برای تمایز سلول‌های MSCs به سمت استئوبلاست‌ها در شرایط *in vitro* از مخلوطی از دگزامتازون، کلسی تریول، آسکوربیک اسید و گلیسروفسفات استفاده می‌شود. در شرایط *in vivo* و استفاده بالینی، قرار دادن سلول‌های MSCs در یک ریز محیط استخوانی حاوی مخلوطی از فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی سبب القای تمایز آنها به سمت سلول‌های استخوانی می‌شود (۳). فاکتورهای رشد (GFs) مختلفی همانند BMPs، FGFs، VEGFs و IGFs تاثیرات قابل توجهی بر روند رفتار استئوبلاست‌ها دارند. این فاکتورها، عوامل محرک استخوان سازی هستند که جهت تقویت و فعالسازی عملکردهای ترمیم خود به خودی به کار می‌روند (۵ و ۶). استفاده از این فاکتورها و مواد شیمیایی همراه با مشکلاتی مانند سمیت ناشی از استفاده از دوز بالای برخی از این مواد همانند دگزامتازون و نیز قیمت بسیار زیاد فاکتورهای رشد پروتئینی نو ترکیب و سایتوکین‌ها مواجه است.

^۱ Mesenchymal stem cell (MSC)



مواد

کلروفرم (Merk, Cat.no.10445,Germany)
 PBS (DNAbiotech, DB0010, Iran), الکل (Merk, germany)
 ۵۰ میلی لیتری (JetBIOFILL, China)
 DMEM با گلوکز کم (Bioidea, BI025, Iran), لوله فالكون
 (JetBIOFILL, Iran), FBS (Gibco, 10270-106, USA)
 پنسیلین-استرپتومایسین (SIGMA, Aldrich, USA)
 داروی هومیوپاتی سیمفیتوم افیشیاله (Boiron, MTT, BO1919, USA)
 (SIGMA, M5655-1G, USA)
 DMSO (Merk, 196055), پودر آلزایرین رد (Sigma, A5533, USA)
 دگزامتازون (Caspian, Iran), آسکوربیک اسید (Sepidaj, Iran)
 گلیسرول و فسفات (Sigma, G9422, USA)

جداسازی سلول‌های MSCs

جهت استخراج سلول‌های مغز استخوان از رت نر لاغر ۶-۸ هفته‌ای نژاد ویستار استفاده شد (رت از مرکز نگهداری حیوانات پژوهشکده بوعلی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران تهیه شد)، نحوه کارکردن و دستگیری رت بر اساس قوانین راهنمایی انیستیتو ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی و معاهده هلسینکی انجام شد.

ابتدا رت با استفاده از دسیکاتور و کلروفرم با مسمومیت دوز بالای کلروفرم بیهوش و سپس کشته شد. بر روی صفحه تشریح به کمک تیغ مخصوص ناحیه کشاله ران تا محل مفصل شدن استخوان ران به لگن برش داده شد، سپس به آرامی استخوان ران از محل مفصل جدا گردید. سپس استخوان درشت نی از محل مفصل شدگی با استخوان کف پا جدا شد. استخوان ران نیز از محل اتصال به درشت نی جدا گردید. پس از جداسازی عضلات از استخوان، استخوان در

داروی سیمفیتوم از گیاه *Symphytum.officinale* L. از خانواده *Boraginaceae* بدست می‌آید که این گیاه با نام رایج Comfrey نیز شناخته می‌شود (۷). اصطلاح Symphein به معنای به هم رساندن در شکستگی‌های استخوانی است. از حدود ۲۰۰۰ سال پیش، سیمفیتوم در درمان شکستگی‌ها و جراحات بافت نرم هم به صورت خوراکی و هم به صورت موضعی استفاده می‌شده است. مطالعات متعددی در بررسی اثرات درمانی فرم موضعی کامفری انجام شده است که عمده خواص درمانی مشاهده شده آن شامل اثرات ضد درد، ضد التهاب، تحریک گرانولاسیون، تحریک بازسازی بافت‌ها و نیز تحریک تشکیل کالوس مناسب استخوانی است (۸-۱۱). ترکیب فعال Comfrey آلانتوئین است که می‌تواند محرک تکثیر و تمایز سلولی در بافت‌هایی مثل بافت همبندی، استخوان‌ها و غضروف‌ها باشد و روند بهبود زخم‌ها را تسریع بخشد (۱۲).

شیوه درمانی هومیوپاتی یکی از رایج‌ترین شیوه‌های درمانی طب مکمل محسوب می‌شود (۱۳). در این شیوه درمانی داروها با منابع مختلف گیاهی، جانوری، معدنی با تکنیک‌های خاص رقیق‌سازی و ضربه، با رقیق‌سازی مکرر تا حد عدد آووگادرو رقیق می‌شوند تا آنجا که خواص بیولوژیک خود را به حلال منتقل کنند (۱۴). در هومیوپاتی استفاده از سیمفیتوم باعث تسریع جوش خوردن شکستگی‌ها می‌شود اما تاکنون عملکرد این دارو در بعد سلولی و نحوه تاثیر در این بعد، آنچنان که باید مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به آنچه ذکر شد، در این مطالعه تلاش شده است تاثیر استفاده از داروی هومیوپاتی سیمفیتوم در القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های استخوانی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها



آماده‌سازی داروی هومیوپاتی

داروی هومیوپاتی سیمفیتوم مورد مصرف در این مطالعه به صورت هدیه از خانم دکتر معلم زاده دریافت شد (محل تهیه کشور آلمان بوده است). دارو برای هر قسمت از مطالعه به صورت تازه تهیه شد. سه عدد گلوبول دارو در ۱۵ سی سی محیط کشت خالص (بدون FBS و پنیسیلین استرپتومایسین) حل شد و در ادامه با پنج ضربه و ۱۵ حرکت (up and down) آماده مصرف بود و به عنوان محیط حاوی دارو با سلول‌ها در مراحل مختلف مجاور شد.

ارزیابی سمیت داروی هومیوپاتی سیمفیتوم بر روی

سلول‌های MSCs با استفاده از روش MTT

برای بررسی میزان سمیت داروی سیمفیتوم روی سلول‌های MSC، تعداد ۱۰۴ سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و با حضور CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، محیط روی سلول‌ها برداشته شد و با محیط کشت کامل تازه حاوی پوتنسی‌های مختلف سیمفیتوم ۱۲ C، ۶C، ۳۰C و ۲۰۰C در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در دمای ۳۷°C با حضور CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. سلول مجاور شده با محیط کشت بدون دارو به عنوان شاهد برای این آزمایش استفاده شد. سپس مقدار رشد و تکثیر سلول‌ها به کمک روش MTT بررسی شد. بدین منظور محیط کشت قبلی را برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه حاوی ماده MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر در هر خانه پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C و با حضور CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. بعد از آن محیط حاوی MTT از روی سلول‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر

پتری استریل شده حاوی الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شده و پس از آن در پتری دیش حاوی PBS استریل قرار داده شد. این عمل با همین ترتیب برای پای دیگر رت انجام شد. سپس هر یک از استخوان‌های جدا شده درون یک لوله فالكون ۵۰ میلی لیتری حاوی PBS استریل قرار داده شد و به زیر هود لامینار منتقل شد. در زیر هود لامینار تکه‌های استخوان به پتری دیش استریل منتقل شد و عمل شستشو با PBS یک بار دیگر تکرار شد. استخوان ران رت شکسته و به تکه‌های ریز تقسیم شد و هر تکه به فالكون ۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM با گلوکز کم منتقل شد. پس از انتقال تمامی تکه‌های استخوان، لوله فالكون به شدت تکان داده شد و محیط کشت حاوی سلول‌های بنیادی و دیگر سلول‌ها (کنستانتره استخوانی) به فلاسک‌هایی T25 منتقل شدند. به هر یک از فلاسک‌ها حدود ۳ میلی لیتر محیط کشت کامل DMEM کم گلوکز (۱ گرم در لیتر) محتوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنیسیلین-استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷°C و CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند.

کشت سلول‌های MSCs

خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در این مرحله به جداسازی آنها از سایر سلول‌ها کمک می‌کرد بدین صورت که سلول‌های چسبیده به کف فلاسک همراه با شستشو ثابت و باقی سلول‌ها خارج می‌شدند. تعویض محیط اول بعد از گذشت ۶ روز و پس از آن هر ۳ روز بر حسب نیاز و با توجه به رنگ محیط کشت انجام شد. واکشت سلول‌ها بعد از تراکم سلول‌ها تا حدود ۷۰ درصد سطح فلاسک انجام گردید. در این مطالعه در کلیه مراحل از سلول‌های بین پاساژ ۳ الی ۵ استفاده شد.



تکرار شد. در روزهای ۷ و ۲۱ رنگ آمیزی کلسیم با استفاده از رنگ آلیزارین رد انجام شد.

مقدار ۲ گرم از پودر الیزارین رد در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و پس از گذراندن محلول از کاغذ صافی و تنظیم pH بین ۴/۱-۴/۳ در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد (۲۵۶). در روزهای ۷ و ۲۱، محیط کشت خانه‌های پلیت کشیده شد و هر خانه با PBS شستشو داده شد. سپس به هر خانه پارافرمالدهید ۴ درصد اضافه شد و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس پارافرمالدهید تخلیه و سلول‌ها ۲-۳ بار با PBS شسته شدند. در نهایت به هر خانه ۰/۵ ml رنگ آلیزارین رد اضافه شد و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. پس از طی این مدت زمان رنگ کشیده شد و هر خانه ۴ الی ۵ مرتبه با PBS شسته شد و سپس جهت آنالیز کیفی توسط میکروسکوپ نوری معکوس از نمونه‌ها عکس گرفته شد.

آنالیز آماری

کلیه آزمایشات حداقل سه بار و هر بار با حداقل سه تکرار انجام شد. در تست MTT نیز نتایج بر مبنای میانگین $\pm$ SEM گزارش شده است. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.13 انجام شد. جهت مقایسه میانگین گروه‌های مختلف از روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد و سطح معنی‌داری تفاوت میانگین بین دو گروه با آزمون post-hoc Tukey بررسی شد. سطح معنی‌داری $P=0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی سمیت داروی هومیوپاتی سیمفیتوم با

روش MTT

به منظور تعیین پوتنسی‌های غیر سمی و میزان سمیت داروی هومیوپاتی سیمفیتوم روی سلول‌های بنیادی از روش

از حلال DMSO جهت انحلال کریستال‌های فورمازان درون هر خانه پلیت ریخته شد و پس از ۱۵ دقیقه قرار دادن پلیت‌ها روی شیکر میزان جذب فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده با دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۵ در مقابل ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. درصد میزان رشد و تکثیر سلولی بر اساس فرمول (جذب هر نمونه ÷ جذب نمونه کنترل) $\times 100$ محاسبه شد. با توجه به نتایج این مرحله غلظت‌های غیر سمی و مناسب برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

ارزیابی توان تمایز سلول‌های MSCs به سلول‌های

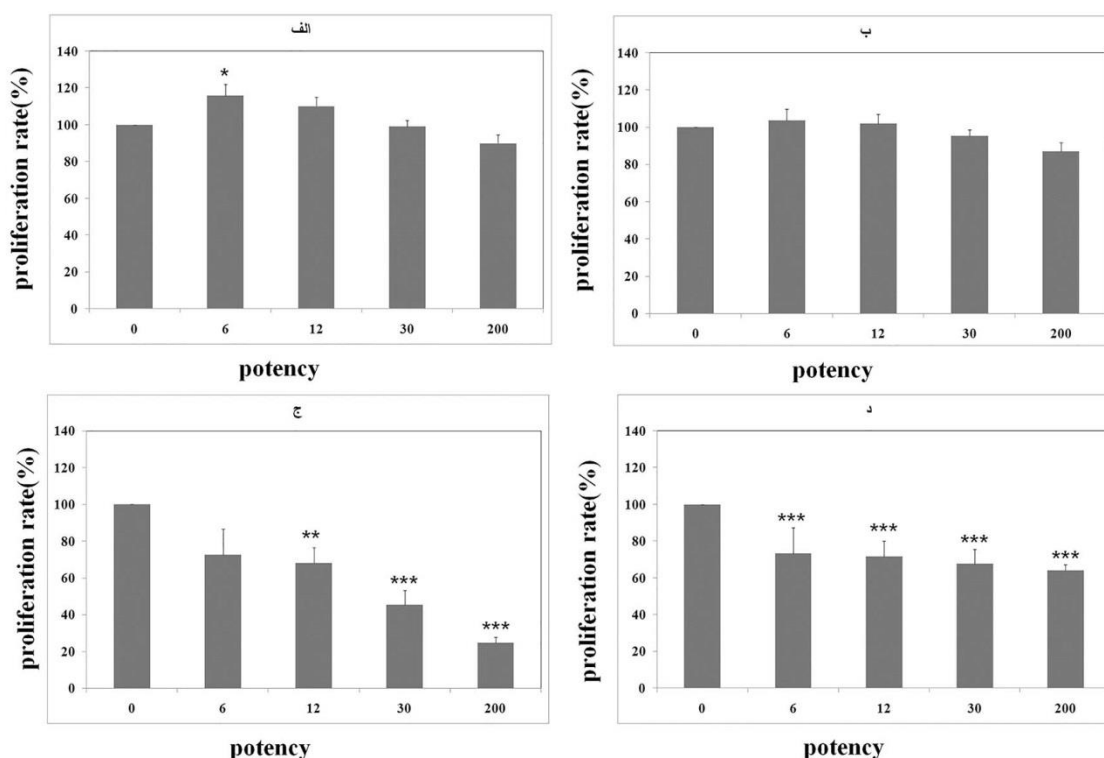
استخوانی با استفاده از روش رنگ سنجی آلیزارین رد

سلول‌های MSC رتی پس از شمارش به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر خانه از پلیت ۲۴ خانه کاشته شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت در ۳ گروه مجزا شامل گروه آزمایش که گروه سلول-های مجاور شده با داروهای هومیوپاتی با پوتنسی‌های ۶ و ۱۲ و ۳۰C بود، گروه کنترل مثبت، از محیط استئوژنز استاندارد شامل ۱۰۰ نانومول دگزا متازون و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰ میلی مول بتا گلیسرو فسفات حل شده در محیط کشت تشکیل شده بود (۱۵ و ۱۶) و گروه سینرژسم که به منظور بررسی تاثیر دارو در کنار محیط استاندارد استئوژنز (اثر سینرژسمی) بر سلول‌ها در مجاورت با محیط حاوی محیط استاندارد استئوژنز و پوتنسی‌های مختلف با غلظت‌های مشابه با گروه‌های آزمایش و کنترل مثبت قرار داده شدند. سلول‌های گروه کنترل منفی به دلیل جلوگیری از تمایز ناخواسته در طی ۲۱ روز، ۳ روز قبل از انجام تست‌های بررسی میزان تمایز، کاشته می‌شدند (۱۷ و ۱۸). در هر گروه برای غلظت حداقل ۳ خانه (تکرار) در نظر گرفته شد و کل آزمایش حداقل سه با



بقای سلولی در مقایسه بین داروی هومیوپاتی و نمونه کنترل مشاهده شد، اما این کاهش بصورت وابسته به پوتنسی نبود و تفاوت معنی‌داری بین پوتنسی‌های مختلف در میزان بقای سلول مشاهده نشد (نمودار ۱-د). با توجه به سمیت بالای مشاهده شده از پوتنسی ۲۰۰C داروی سیمفیتوم روی سلول مورد آزمایش، در مراحل بعدی آزمایشات از این پوتنسی استفاده نشد در حالیکه دیگر پوتنسی‌ها در تست بعدی شرکت داده شد.

MTT استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که در زمان ۴۸ و ۲۴ ساعت، اگر چه یک کاهش وابسته به پوتنسی در میزان رشد و بقای سلولی مشاهده می‌شد، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۱-الف و ب). بیشترین کاهش در میزان رشد و بقا سلول در زمان ۷۲ ساعت و بصورت وابسته به پوتنسی مشاهده شد. این کاهش در پوتنسی بالاتر از ۱۲C معنی‌دار و حداکثر کاهش در پوتنسی ۲۰۰C و به میزان ۷۲ درصد مشاهده شد (نمودار ۱-ج). در زمان ۹۶ ساعت، اگرچه کاهش معنی‌داری در میزان رشد و



نمودار ۱- بررسی سمیت داروی هومیوپاتی سیمفیتوم بر سلول بنیادی مزانشیمی به روش MTT در زمان ۲۴ (الف)، ۴۸ (ب)، ۷۲ (ج) و ۹۶ (د) ساعت. مختلف سیمفیتوم ۱۲C، ۶C، ۳۰C و ۲۰۰C در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در دمای ۳۷°C با حضور CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. با استفاده از روش MTT میزان سمیت بررسی شد. نتایج حاصل ۳ بار آزمایش و هر بار ۳ تکرار به صورت میانگین $\pm$ SEM گزارش شده است.

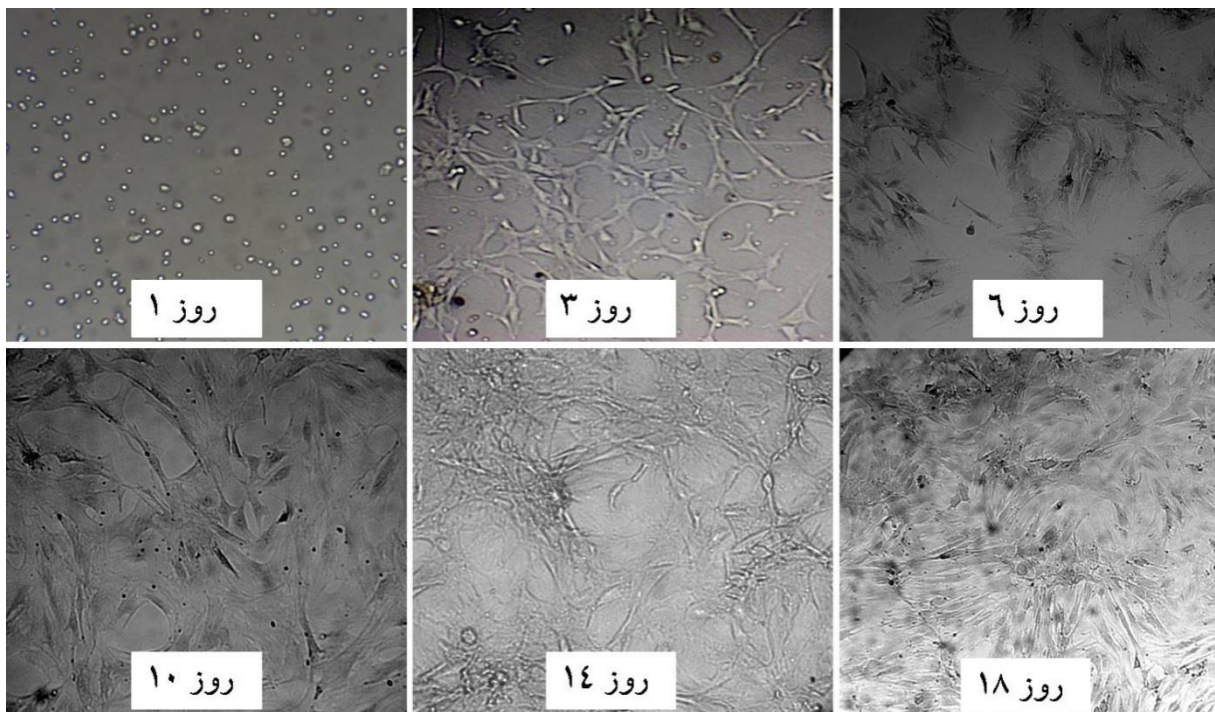
$$P \leq 0.001 \quad *** , 0.001 < P \leq 0.01 \quad **, 0.01 < P \leq 0.05 \quad *$$



نتایج بررسی اثر داروی هومیوپاتی سیمفیتوم در القای تمایز به استخوان به سلول‌های مزانشیمی بنیادی مغز استخوان رت

به منظور بررسی اثر داروی هومیوپاتی سیمفیتوم بر القای تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت در مجاورت با محیط کشت کامل بدون دارو (کنترل منفی)، محیط کشت حاوی استاندارد القایی استخوان (گروه کنترل مثبت)، قدرت‌های مختلف داروی هومیوپاتی سیمفیتوم

(گروه آزمایش) و مجاورت هم زمان پوتنسی‌های مختلف داروی هومیوپاتی و محیط استاندارد القا کننده تمایز (گروه سینرژسم) قرار گرفتند. محیط سلول‌ها هر ۷۲ ساعت تعویض و هر بار به صورت تازه تهیه می‌شد. تست در دوره‌های ۷ و ۲۱ روز انجام شد در طی روزهای متوالی چاهک‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس بررسی و مشاهده می‌شد؛ سلول‌ها از حالت دوکی خارج و به شکل منشعب و وسیع مشاهده می‌شدند (تصویر ۱).



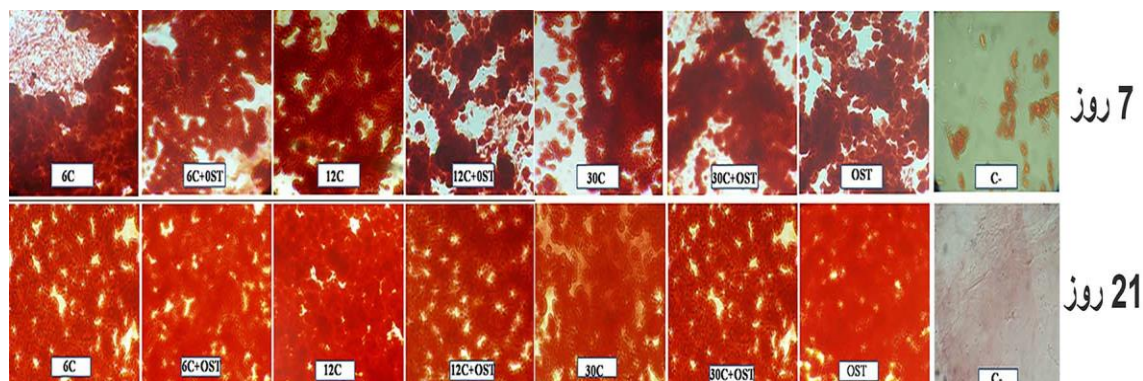
تصویر ۱- تمایز سلول‌های بنیادی به نوع استئوبلاستدر مجاور داروی هومیوپاتی سیمفیتوم. در طی دوره ۲۱ روزه تست تمایز بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی شد و در روزهای ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۴ و ۱۸ توسط میکروسکوپ نوری معکوس بابزرگنمایی $\times 100$ از آنها عکس گرفته شد.

منفی کاملاً بی رنگ بود که نشان دهنده صحت روش کار انجام شده می‌باشد. نتایج بررسی تمایز در روز هفتم نشان داد که نمونه کنترل مثبت رنگی مشابه با نمونه مجاور شده با سیمفیتوم با پوتنسی C ۱۲ داشت.

در روزهای ۷ و ۲۱ میزان تمایز به استخوان سلول‌های MSC با روش‌های رنگ‌آمیزی آلیزارین رد به روش کیفی مورد مطالعه قرار گرفت و توسط میکروسکوپ نوری معکوس بررسی و عکس گرفته شد. در همه تکرارهای آزمایش، کنترل

نتایج نشان داد که بیشترین شدت رنگ مربوط به نمونه‌های مجاور شده با سیمفیتوم با پوتنسی C ۶ بود و به ترتیب با افزایش پوتنسی تراکم رنگ کمتر مشاهده می‌شد. شدت اثر سیمفیتوم در مجاورت همزمان با محیط استاندارد کاهش یافته بود که این کاهش با شدت رنگ نمونه‌های سینرژسمی در مقایسه با نمونه‌های حاوی داروی سیمفیتوم با پوتنسی مشابه بود. رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۲۱ دوره القایی تمایز نتایج همسو با روز هفتم نشان داد، بدین صورت که

بیشترین شدت رنگ مربوط به نمونه مجاور شده با سیمفیتوم با پوتنسی C ۶ بود و پس از آن به ترتیب با افزایش پوتنسی، کاهش در شدت رنگ مشاهده شد. همچنین نمونه‌های سینرژسمی شدت رنگ کمتری نسبت به نمونه‌های مجاور شده با سیمفیتوم با پوتنسی یکسان نشان دادند. در این روز نیز نمونه‌های کنترل منفی و مثبت تفاوت مناسب و قابل مشاهده‌ای در شدت رنگ با هم نشان دادند (تصویر ۲).



تصویر ۲- تصویر بررسی میزان تمایز سلول‌های بنیادی تیمار شده با داروی هومیوپاتی سیمفیتوم. در روز ۷ و ۲۱ دوره القایی، تمایز با استفاده از روش رنگ آمیزی آلیزارین رد بررسی شد و توسط میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی $10\times$ ثبت گردید.

بحث

یکی از استراتژی‌های مورد استفاده برای بهبود پروسه بازسازی استخوان در شرایط سخت بالینی، استفاده از روش‌های مهندسی بافت است. مهندسی بافت بر پایه استفاده از سه عامل اصلی سلول بنیادی، فاکتور القایی و داربست استوار است (۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، یکی از انواع سلول‌های بنیادی بالغ هستند که در دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۹). درک مکانیسم‌های کنترل کننده

تمایز سلول‌های MSCs به سمت سلول‌های استئوبلاست، یکی از حوزه‌های اساسی تحقیقات زیست شناسی استخوان است (۲۰). افزودن فاکتورهای شیمیایی و مورفوژنز خاص به محیط کشت سلول‌های MSCs، سبب القای تمایز آنها به یک نوع سلول خاص می‌شود (۲). اما استفاده از این فاکتورها و مواد شیمیایی همراه با مشکلاتی مانند سمیت و نیز قیمت بسیار زیاد مواجه بوده است. به همین علت دانشمندان بدنبال یافتن القا کننده‌هایی موثرتر با سمیت و قیمت پایین تر



روز ۷ و ۲۱ دارای بیشترین شدت رنگ بودند و پس از آن به ترتیب با افزایش پوتنسی، کاهش در شدت رنگ مشاهده می‌شد. احتمال داده شد که با توجه به نتایج تست MTT و سمیت پوتنسی‌های بالاتر در مقایسه با C ۶، این سمیت توانسته است میزان رشد و بقای سلول‌ها و در نتیجه میزان تمایز سلولی را تحت تاثیر قرار داده باشد (۲۴). در سال ۲۰۱۰ اسپین نیتو^۱ و همکارانش از داروی هومیوپاتی سیمفیتوم در جهت ترمیم استخوان فک رت پس از جایگذاری ایمپلنت با پیگیری ترمیم استخوان از طریق عکاسی با اشعه X، نتایج مثبتی را ثبت کرده و سمت و سوی جدید پیش راه محققین قرار دادند (۲۵). در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای گزارش میزان ترمیم استخوان از طریق عکاسی با اشعه X با دوز هومیوپاتی ۵C خوراکی سیمفیتوم بعد از جراحی ایمپلنت نتایج کاهش درد و التهاب و افزایش ترمیم استخوانی توسط مازوچی^۲ و همکارانش گزارش شد (۲۶). مشاهده جالب و قابل توجه آن بود که در نمونه‌های گروه سینرژسم شدت رنگ کمتری در مقایسه با نمونه‌های گروه آزمایشی که دارای همان پوتنسی از داروی سیمفیتوم بودند دیده شد. همچنین در مطالعه حاضر محیط کشت حاوی داروی استاندارد استئوژنز و داروی سیمفیتوم هومیوپاتی از لحاظ مدت زمان لازم برای اثر تقریباً عملکرد یکسانی داشتند. داروی هومیوپاتی سیمفیتوم می‌تواند پس از انجام تست‌های تکمیلی و اثبات کننده بعنوان پیشنهادی مناسبی با اثر بیشتر، سمیت کمتر و هزینه بسیار کمتر برای محیط‌های استاندارد تمایز به استخوان مطرح باشد.

هستند. علم هومیوپاتی تلاش دارد تا خواص یک دارو را با اندازه و کیفیت تاثیر بسیار مورد توجه به موجود زنده انتقال دهد اما در عین حال میزان مضرات دارو را با رقیق سازی قابل توجه آن، کاهش دهد. در این مطالعه تلاش شد تا تاثیر استفاده از داروی هومیوپاتی سیمفیتوم در القای تمایز سلول-های MSCs مغز استخوان رتبه سمت سلول‌های استخوانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

سیمفیتوم از گیاه *Symphytumofficinale* که به صورت سنتی در جهت درمان شکستگی استفاده می‌شده است، استخراج می‌شود (۲۱). این گیاه سال‌ها به عنوان داروی سنتی به صورت جوشانده و موضعی برای درمان التهابات و جوش دادن شکستگی مورد استفاده قرار می‌گرفت (۲۲). در مطالعه حاضر، در ابتدا میزان سمیت ناشی از پوتنسی‌های مختلف سیمفیتوم بر روی سلول بنیادی مزانشیمی بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کاهش رشد و تکثیر سلولی در زمان ۷۲ ساعت به صورت وابسته به پوتنسی رخ داد، بصورتیکه این کاهش در پوتنسی‌های بالاتر از C ۱۲ از لحاظ آماری معنی‌دار بود. پس از گذشت ۹۶ ساعت، کاهش سلول زنده از لحاظ آماری معنی‌دار نبود؛ این احتمال مطرح است که در این مقطع با کاهش سلول‌های زنده، فضا برای رشد مجدد سلول‌ها فراهم گشته و به همین خاطر میزان سمیت در ۹۶ ساعت قابل تحلیل نیست.

در بررسی داروی هومیوپاتی سیمفیتوم بر القای تمایز استخوان، از تست کیفی آلیزارین رد استفاده شد. رنگ آمیزی آلیزارین رد مشخص کننده تجمع کلسیم درون سلول‌ها و تمایز به سلول استخوانی می‌باشد (۲۳). در نتایج آزمایشات آلیزارین مشاهده شد که همه نمونه‌ها توانستند افزایش معنی‌داری در میزان تمایز نسبت به نمونه کنترل منفی، ایجاد کنند. نمونه‌های مجاور شده با سیمفیتوم با پوتنسی ۶C در

Spin-Neto^۱
Mazzocchi^۲



نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با هدف یافتن ترکیبی موثر در القای تمایز به استخوان با اثرات و عوارض جانبی کمتر و نیز قیمت پایین‌تر، تاثیر داروی هومیوپاتی سیمفیتوم در القای سلول‌های MSCs رتی به سمت سلول‌های استخوانی با انجام تست‌های پایه بررسی شد.

نتایج نشان داد که سیمفیتوم در همه پوتنسی‌های مورد بررسی توانسته است بطور قابل ملاحظه‌ای تاثیری مشابه با محیط استاندارد استئوژنز در تمایز به استخوان ایجاد کند. این تاثیر در پوتنسی پایین بیشتر خودنمایی کرد تا آنجا که شدت رنگ از کنترل مثبت هم بیشتر دیده شد. از سوی دیگر همانگونه که در بخش روش کار ذکر شده است، ۳ روز پس از کاشت سلول‌ها محیط القاکننده تمایز به آنها اضافه می‌شد. از آنجا که همزمان با شروع تمایز در سلول‌ها تکثیر سلولی

متوقف می‌شود و از سوی دیگر در روز ۲۱ همه خانه‌های پلیت به کانفلوئنسی صد درصد رسیده بودند، بنظر می‌رسد هیچ کدام از پوتنسی‌های سیمفیتوم اثر سمیت قابل ملاحظه‌ای روی سلول‌ها نداشته‌اند و اثرات ملاحظه شده در شدت القای تمایز متاثر از اثرات سمیت سلولی این دارو نبوده است. در نتیجه پیش‌بینی می‌شود با انجام تست‌های تکمیلی سیمفیتوم بتواند به عنوان جایگزینی مناسب با اثر بیشتر و هزینه کمتر برای محیط‌های استاندارد تمایز به استخوان مطرح شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم شهلا واعظی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان بوده است. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که هزینه مالی این تحقیق را متقبل شده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. BMC Med 2011;9:66.
2. Krause F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis:(membrane) protein complexes and supercomplexes. Electrophoresis 2006;27(13):2759-81.
3. Arvidson K, Abdallah B, Applegate L, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, *et al*. Bone regeneration and stem cells. J Cell Mol Med 2011;15(4):718-46.
4. Mohal JS, Tailor HD, Khan WS. Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and their Applicability for Musculoskeletal Applications. Curr Stem Cell Res Ther 2012;7(2):103-9.
5. Nauth A, Ristevski B, Li R, Schemitsch EH. Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect? Injury 2011;42(6):574-9.
6. Yun Y-R, Jang JH, Jeon E, Kang W, Lee S, Won JE, *et al*. Administration of growth factors for bone regeneration. Regen Med 2012;7(3):369-85.
7. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, Newall CA. Herbal medicines. London; Pharmaceutical Press; 2007.
8. Smith DB, Jacobson BH. Effect of a blend of comfrey root extract (*Symphytum officinale* L.) and tannic acid creams in the treatment of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo-controlled, double-blind, multiclinical trials. J Chiropr Med 2011;10(3):147-56.
9. Staiger C. Comfrey: a clinical overview. Phytother Res 2012;26(10):1441-8.

10. Grube B, Grünwald J, Krug L, Staiger C. Efficacy of a comfrey root (*Symphyti offic. radix*) extract ointment in the treatment of patients with painful osteoarthritis of the knee: results of a double-blind, randomised, bicenter, placebo-controlled trial. *Phytomedicine* 2007;14(1):2-10.
11. Predel H-G, Giannetti B, Koll R, Bulitta M, Staiger C. Efficacy of a Comfrey root extract ointment in comparison to a Diclo-fenac gel in the treatment of ankle distortions: Results of an observer-blind, randomized, multicenter study. *Phytomedicine* 2005;12(10):707-14.
12. Barbakadze V, Mulkijanyan K, Gogilashvili L, Amiranashvili L, Merlani M, Novikova Zh, *et al.* Allantoin- and pyrrolizidine alkaloids-free wound healing compositions from *Symphytum asperum*. *Bull Georg Natl Acad Sci* 2009;3(1):159-64.
13. Owen D. Principles and practice of homeopathy: the therapeutic and healing process. Elsevier Health Sciences; 2007.
14. Ernst E. A systematic review of systematic reviews of homeopathy. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54(6):577-82.
15. Park JB. The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression. *J Surg Res* 2012;173(1):99-104.
16. Wang C, Cao X, Zhang Y. A novel bioactive osteogenesis scaffold delivers ascorbic acid, β -glycerophosphate, and dexamethasone in vivo to promote bone regeneration. *Oncotarget* 2017;8(19):31612-25.
17. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrowstromal cells. *J Cell Biochem* 1999;75(3):424-36.
18. Womack S, Milner D, Weisgerber D, Harley B, Wheeler M. 178 Differential Behavior of Porcine Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose During Osteogenic Differentiation on aGlycosaminoglycan Hydrogel Scaffold for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Reproduction, Fertility and Development* 2018;30(1):229.
19. Horwitz E, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7(5):393-5.
20. Kandal S, Ozmen S, Uygur S, Yagci M, Kayhan H, Elmas C, *et al.* Effects of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Demineralized Bone Matrix on Cranial Bone Healing. *Ann Plast Surg* 2016;77(2):249-54.
21. Papp N, Bencsik T, Nemeth K, Gyergyak K, Sulc A, Farkas A. Histological study of some *Echium vulgare*, *Pulmonaria officinalis* and *Symphytum officinale* populations. *Nat Prod Commun* 2011;6(10):1475-8.
22. Hirono I, Mori H, Haga M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. *J Natl Cancer Inst* 1978;61(3):865-9.
23. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329(1):77-84.
24. Mao AS, Shin J-W, MooneyDJ. Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials* 2016;98:184-91.
25. Spin-Neto R, Belluci MM, Sakakura CE, Scaf G, Pepato MT, Marcantonio E Jr. Homeopathic *Symphytum officinale* increases removal torque and radiographic bone density around titanium implants in rats. *Homeopathy* 2010;99(4):249-54.
26. Mazzocchi A, Montanaro F. Observational study of the use of *Symphytum 5CH* in the management of pain and swelling after dental implant surgery. *Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy* 2012;101(4):211-6.