



Silymarin Effects on Ovine Fetal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteogenic Lineage

Morovati I^a, Mohammadi T^{b*}, Pooyanmehr M^b, Soltani L^c

^a A DVM graduate, Basic Sciences and Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

^{b*} Assistant Professor, Basic Sciences and Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

^c Assistant Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Morovati I, Mohammadi T, Pooyanmehr M, Soltani L. Silymarin Effects on Ovine Fetal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteogenic Lineage. *Journal of Cell and Tissue*. 2022;13(2):135-150.

<https://10.52547/JCT/13.2.135>

KEYWORDS

Mesenchymal stem cells, differentiation, osteogenic, silymarin, ALP.

ABSTRACT

Aim: Cell therapy using mesenchymal stem cells (MSCs) can be a promising tool in regenerative medicine. One of the richest sources of mesenchymal stem cells is fetal bone marrow. Silymarin has strong antioxidant and anti-inflammatory activities with a positive effect on the proliferation of some cells as well as anti-osteoporosis properties. This study aimed to show the effect of silymarin on the differentiation of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of sheep embryos into the osteogenic line.

Materials and Methods: Mesenchymal stem cells were isolated from the bone marrow of sheep embryos. MTT test was performed to investigate the cytotoxicity of silymarin on cells at different concentrations for 24 and 72 hours. Then, cells in one of 8 groups 1: negative control; 2: treated with 10 μmol/liter silymarin in the usual environment, 3: treated with 20 μmol/liter silymarin in the usual environment, 4: treated with 100 μmol/liter estradiol in the usual environment, 5: positive control, 6: treatment treated with 10 μmol/liter silymarin in the differentiation medium, 7: treated with 20 μmol/liter silymarin in the differentiation medium, 8: treated with 100 μmol/liter in the differentiation medium, were cultured for 21 days. To determine the osteogenic differentiation of cells, the deposition of hydroxyapatite ions was examined using alizarin staining, and also, the amount of ALP enzyme secretion was also measured in the studied groups. **Results:** Comparing the average optical absorption of cells at different concentrations

* Corresponding author. Tel.: +98- 8334277605-6 ; Fax: +98- 8334277605-6

E-mail address: tymhd@razi.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.2.135>.

Received: December 6, 2021; Received in revised form: February 10, 2022; Accepted: February 14, 2022

Original Article

© Author



between 24 and 72 hours after treatment showed that the average optical absorption of cells at zero concentration of silymarin after 72 hours of treatment decreased in comparison with those treated for 24 hours ($P < 0.05$), but no significant difference was observed in other concentrations ($P > 0.05$). Examining the level of ALP enzyme secretion, 21 days after treatment with silymarin in the studied groups showed that the highest level of enzyme secretion was in group 8 ($P \leq 0.05$). The lowest amount of enzyme secretion was observed in group 1 (negative control) and then in group 2 and group 3 respectively ($P < 0.05$). No significant difference was observed between groups 4, 5, and 6 ($P > 0.05$). Based on the alizarin red staining results, calcium ions deposition was observed in all the groups related to the differentiation medium, which increased in groups 8, 7, 6, and 5, respectively. In the groups cultured in the usual environment, there was no calcification in group 1 and the amount of calcification increased in groups 2, 3, and 4, respectively. In total, the amount of calcification in the differentiation environment groups was higher in comparison with the usual environment.

Results: During this study, Silymarin had no toxic effect on the mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of sheep embryos in the studied concentrations after 24 and 72 hours of treatment. It increased the differentiation of the cells into the osteogenic lineage in a concentration-dependent manner.

Conclusion: It seems that with further studies and identification of the molecular pathways of silymarin's effect, it can be used in cell therapy in order to repair bone lesions.



اثرات سیلیمارین روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جنین گوسفند به دودمان استخوان‌ساز

اسحاق مروتی^۱، طیبه محمدی^۲، مهرداد پویان‌مهر^۲، لیلا سلطانی^۲

^۱دانش‌آموخته‌ی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، کرمانشاه، ایران

^۲استادیار، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، کرمانشاه، ایران

^۳استادیار، دانشگاه رازی، دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، کرمانشاه، ایران

چکیده

واژگان کلیدی

هدف: سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) می‌تواند ابزاری امیدوارکننده به عنوان طب بازساختی باشد. یکی از غنی‌ترین منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جنین است. سیلیمارین دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قوی با تأثیر مثبت بر تکثیر برخی از سلول‌ها و همچنین خاصیت ضد پوکی استخوان است. این مطالعه با هدف نشان دادن اثر سیلیمارین بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جنین گوسفند به رده استئوژنیک انجام شد. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جنین گوسفند جدا شدند. آزمون MTT جهت بررسی سمیت سلولی سیلیمارین روی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. سپس، سلول‌ها در یکی از ۸ گروه ۱: شاهد منفی؛ ۲: تیمار شده با ۱۰ میکرومول بر لیتر سیلیمارین در محیط معمول، ۳: تیمار شده با ۲۰ میکرومول بر لیتر سیلیمارین در محیط معمول، ۴: تیمار شده با ۱۰۰ میکرومول بر لیتر استرادیول در محیط معمول، ۵: شاهد مثبت، ۶: تیمار شده با ۱۰ میکرومول بر لیتر سیلیمارین در محیط تمایزی، ۷: تیمار شده با ۲۰ میکرومول بر لیتر سیلیمارین در محیط تمایزی، ۸: تیمار شده با ۱۰۰ میکرومول بر لیتر در محیط تمایزی، به مدت ۲۱ روز کشت شدند. جهت تعیین تمایز استئوژنیک سلول‌ها، با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین رد رسوب یون هیدروکسی آپاتیت بررسی شد و همچنین میزان ترشح آنزیم ALP در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. **نتایج:** مقایسه میانگین جذب نوری سلول‌ها در غلظت‌های مختلف بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نشان داد که میانگین جذب نوری سلول‌ها در غلظت صفر سیلیمارین، ۷۲ ساعت پس از تیمار نسبت به زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار کاهش نشان داد ($P < 0.05$) اما در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0.05$). بررسی میزان ترشح آنزیم ALP، ۲۱ روز پس از تیمار در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که در مجموع بیشترین میزان ترشح آنزیم در گروه ۸ بود ($P \leq 0.05$). کمترین میزان ترشح آنزیم در گروه ۱ (کنترل منفی) و پس از آن به ترتیب در گروه ۲ و گروه ۳ مشاهده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز، استئوژنیک، سیلیمارین، آلکالین فسفاتاز

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

شد ($P < 0.05$). بین گروه‌های ۴، ۵ و ۶ تفاوت معنی دار مشاهده نشد ($P > 0.05$). بر اساس نتایج حاصل از رنگ آمیزی آلیزارین رد، رسوب املاح کلسیم در تمام گروه‌های مربوط به محیط کشت تمایزی مشاهده شد که به ترتیب در گروه‌های ۸، ۷، ۶ و ۵ افزایش یافت. در گروه‌های کشت شده در محیط معمول، در گروه ۱ رسوبی مشاهده نشد و میزان رسوب به ترتیب در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ افزایش نشان داد. در مجموع میزان رسوب در گروه‌های محیط تمایزی بیشتر از محیط معمول بود. **نتیجه گیری:** سیلیمارین در غلظت‌های مورد بررسی روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جنین گوسفند، اثر سمیت ندارد و همچنین در غلظت‌های مورد بررسی باعث افزایش تمایز سلول‌ها به رده ی استخوانساز می شود که این افزایش وابسته به غلظت است. از این رو، به نظر می رسد با مطالعات بیشتر و شناسایی مسیرهای مولکولی اثر گذاری سیلیمارین، می‌توان از آن در سلول درمانی جهت ترمیم ضایعات استخوانی استفاده کرد.

۱- مقدمه

استخوان در سراسر زندگی فرد به‌طور پیوسته با فعالیت استئوکلاست‌ها و استئوبلاست‌ها بازسازی می‌شود درحالی‌که به‌وسیله‌ی فعالیت سلول‌های فرماندهی مکانوسنسوری، سلول‌های استئوسایت، کنترل می‌شود (۱، ۲). از نظر فرآیند تکوینی، استخوانی شدن با جمع شدن سلول‌های مزانشیمی آغاز می‌شود، به‌عبارت‌دیگر، استئوسیت به‌عنوان یک سلول استخوانی کاملاً تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان شناخته می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های پیش‌ساز چندتوانی هستند که قادر به تمایز به سلول‌های مختلفی از قبیل استئوبلاست، کوندروسیت، آدیپوسیت و میوسیت هستند (۳-۵). بعد از این‌که استئوبلاست‌ها اجزای ماتریکس استخوانی مثل کلاژن نوع ۱ و آلکالین فسفاتاز، در طول فرآیند بازسازی استخوان را می‌سازند (۶، ۷)، با یکی از سرنوشت‌های زیر مواجه می‌شوند (۱) تبدیل شدن به سلول‌های پوشاننده‌ی استخوان، (۲) تبدیل شدن به استئوسایت‌های تعبیه‌شده در استخوان و (۳) طی کردن فرآیند آپوپتوزیس (۸).

در مطالعات تمایز به استخوان و مینراله شدن آن، محققان مختلف پروتکل‌های استاندارد طلائی را در راستای القای آزمایشگاهی تمایز استئوژنیک، با به‌کارگیری مکمل‌های شیمیایی استخوان‌ساز از قبیل آسکوربیک‌اسید و بتا-گلیسرول فسفات را به‌دست آورده‌اند (۹، ۱۰). از طرف دیگر، تمایز آزمایشگاهی استئوسایت نیز در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است. بعد از این‌که سلول‌های پیش‌ساز استئوبلاست پس از دوره‌ی طولانی کشت در محیط کشت استاندارد طلائی در ظرف کشت تشکیل شدند، ساختارهای گنبدی سه‌بعدی از نودول‌های استخوانی را ایجاد می‌کنند (۱۱، ۱۲). اگرچه سلول‌های شبه استئوسایت در نهایت چند هفته در داخل ندول‌ها پدیدار می‌شوند، روش کارآمد برای دستیابی تمایز مستقیم استئوسایت‌ها به سلول‌های پیش‌ساز یا سلول‌های بنیادی ثابت نشده است، زیرا که سلول‌های شبه استئوسایت به‌طور تصادفی بعد از کشت طولانی مدت در ندول‌ها پدیدار می‌شوند.

سیلیمارین کمپلکسی طبیعی مشتق از گیاه خارمریم *Silybum marianum* است. فعالیت سیلیمارین شامل افزایش گلوکوتایون کبدی و تحریک فعالیت آنزیم RNA پلیمرازی I است. به‌علاوه، به‌واسطه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در محافظت کبد نیز مشارکت دارد (۱۳). در نتیجه فعالیت حفاظت کبدی و آنتی‌اکسیدانتی سیلیمارین، تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم مواد سمی از قبیل تتراکلرید کربن و اتانول مهار می‌شود (۱۳). در برخی موارد فیبروز کبدی، سیلیمارین اثرات ضد فیبروزی را در طول القای سیگنال دارد و هم‌چنین پروتئین کینازها را مهار می‌کند. علاوه‌براین، با چرخه‌های هدایتی داخل سلولی نیز واکنش اثر متقابل دارد (۱۴). هم‌چنین سیلیمارین اثرات بالقوه‌ی استئوبلاستوژنز خود را از طریق چرخه‌های هدایتی BMP/SMAD/Runx2 اعمال می‌کند و سبب ترمیم استخوان در موش می‌شد (۱۵). هم‌چنین، در مطالعه دیگری، تجویز خوراکی عصاره گیاه خارمریم در موش‌های اواریکتومی شده، تراکم مواد معدنی استخوان ران را بهبود داده است و کاهش تراکم استخوان ناشی از نبود هورمون استروژن را کاهش داده است (۱۶). در مطالعه دیگری، تجویز سیلیمارین از راه آب آشامیدنی موش‌ها، اثر ترمیم‌کنندگی داربست حامل سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش داده است (۱۷). با توجه به مطالب ذکر شده

چنین به نظر می‌رسد که سیلیمارین تمایز سلول‌های مزانشیمی به دودمان استخوانی را افزایش دهد. تاجایی که اطلاع داریم تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر سیلیمارین روی تمایز سلول‌های مزانشیمی جداشده از مغز استخوان جنین گوسفند به سلول استخوان‌ساز انجام نشده است. از این رو در این مطالعه، اثر سیلیمارین روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان جنین گوسفند به سلول‌های استئوبلاست بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد: تمامی مواد مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما خریداری شد به جز در مواردی که در متن به آن‌ها اشاره شده است.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جنین گوسفند: مطالعه حاضر با شناسه IR.RAZI.REC.1399.057 در جلسه کمیته اخلاق دانشگاه رازی تصویب شده است. جنین‌های گوسفند از کشتارگاه بیستون کرمانشاه، پس از ذبح دام و مشاهده‌ی آبستنی حیوان به صورت سالم همراه با بافت رحم و جفت به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه پس از جداسازی بافت‌های رحم و جفت و شست‌وشوی جنین، در زیر هود لامینار استخوان‌های ران و درشت‌نی جنین از بافت‌های مختلف کاملاً جداسازی شد. سپس دو سر استخوان قطع شد و محیط DMEM غنی شده با سرم گوساله‌ی جنینی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین با روش آسپیراسیون از یک سر استخوان وارد و از سر دیگر خارج شد. در ادامه، محیط آسپیراسیون حاوی مغز استخوان از موش (۷۰ میکرومتر) عبور داده شد و به فلاسک‌های T-25 منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، هوای اتمسفری مرطوب و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن برای مدت زمان ۴۸ ساعت کشت شد. پس از طی این مدت‌زمان، فلاسک کشت با بافر DPBS چندین مرتبه شست‌وشو داده شد. در ادامه، محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین اضافه و به انکوباتور منتقل شد و هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض محیط صورت گرفت. پس از آن که حدود ۸۰ درصد از کف فلاسک به وسیله‌ی سلول‌های دوکی شکل پر شد محیط رویی سلول‌ها حذف شد و با کمک آنزیم تریپسین سلول‌ها از کف فلاسک جداسازی شدند. بخشی از آن‌ها فریز و بخش دیگر، مجدداً کشت داده شدند که به آن‌ها سلول‌های پاساژ اول اطلاق می‌شود. جهت شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های پاساژ سوم مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی: برای این آزمون، سلول‌ها در پلیت چهار چاهکی کشت شدند. دو چاهک برای گروه‌های کنترل، یک چاهک برای گروه تیمار شده با محیط تمایزی استخوان‌ساز و یک چاهک برای گروه تیمار شده با محیط تمایزی چربی‌ساز در نظر گرفته شد. در هر چاهک به میزان ۱۰۰۰۰ سلول کشت داده شد و به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM با گلوکز بالا غنی شده با ۱۰ درصد سرم و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک اضافه شد. ۴۸ ساعت بعد تعویض محیط انجام شد. پس از آن محیط تمایزی چربی و استخوانی به چاهک‌های مربوط اضافه شد و در مورد چاهک‌های کنترل، تعویض محیط با محیط معمول انجام شد. عمل تعویض محیط با محیط‌های تمایزی هر ۳ روز یک‌بار به مدت سه هفته انجام گرفت. ولی پلیت گروه کنترل تا پایان دوره فقط با محیط معمولی تعویض محیط می‌شد. بعد از سه هفته وقوع تمایز استخوان‌ساز با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و تمایز چربی‌ساز با رنگ‌آمیزی اوایل رد مورد ارزیابی قرار گرفت.

بیان مارکرهای سطحی: سلول‌های پاساژ سوم جداسازی شده از بافت مغز استخوان جنین گوسفند برای بررسی بیان مارکرهای سطحی با کمک آزمون فلوسایتومتری مورداستفاده قرار گرفتند. آنالیز فلوسایتومتری با به‌کارگیری FITC اتصال یافته به $CD34^{(-)}$ و $CD44^{(+)}$ صورت گرفت. به‌طور خلاصه، 10^6 سلول شمارش و در محلول پارافرمالدئید تثبیت شدند و سپس در میکروتیوب‌های حاوی DPBS بر روی یخ به آزمایشگاه سازمان انتقال خون تهران منتقل شدند. در آن‌جا، آنتی‌بادی اولیه کونژوگه به آنتی‌بادی‌های ثانویه اضافه شد. پس از انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای در دمای یخچال و تاریکی، با دستگاه فلوسایتومتری (wolf-yc cetrap) خوانش انجام گرفت و نتایج با استفاده از نرم‌افزار xamOLF مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی بقای سلول‌ها: برای سنجش میزان بقای سلول‌های کشت‌شده از آزمون 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده شد. در سنجش متیل تiazول تترازولیوم (MTT) فعالیت آنزیم دهیدروژنازهای میتوکندریایی در سلول‌های زنده مورد سنجش قرار می‌گیرد. برای انجام این آزمون سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌چندین گروه به‌شرح ذیل تقسیم شدند: ۱- شاهد: در محیط کشت معمول فاقد سیلیمارین (غلظت صفر) کشت داده شدند. ۲- تیمار ۱: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین $0/1$ میکرومول بر لیتر کشت داده شدند، ۳- تیمار ۲: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین $0/2$ میکرومول بر لیتر کشت داده شدند، ۴- تیمار ۳: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 1 میکرومول بر لیتر کشت داده شدند، ۵- تیمار ۴: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 2 میکرومول بر لیتر کشت داده شدند، ۶- تیمار ۵: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 5 میکرومول بر لیتر کشت داده شدند، ۷- تیمار ۶: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 10 میکرومول بر لیتر کشت داده شدند و ۸- تیمار ۷: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 20 میکرومول بر لیتر کشت داده شدند.

حدود 10^6 هزار سلول برای هر گروه تیماری در ۳ تکرار در پلیت ۹۶ خانه کشت شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به ظرف کشت، محیط رویی برداشته شد و با محیط جدید در گروه‌های تیماری ذکرشده در بالا برای ۲۴ و ۷۲ ساعت کشت شدند. بعد از اتمام دوره کشت، به‌ازای هر 100 میکرولیتر محیط کشت 20 میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافر DPBS) به‌هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه و پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، محیط رویی به‌آرامی تخلیه و به چاهک‌ها، محلول دی متیل سولفوکسید حلال (DMSO) اضافه و جذب نوری محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 570 نانومتر قرائت شد.

القای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی: برای بررسی اثر تمایزی عصاره‌ی سیلیمارین روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جنین گوسفند به سلول‌های استئوبلاستی (رده استخوان‌ساز)، تعداد 10^6 سلول پاساژ سوم به پلیت‌های شش چاهکی انتقال داده شد. در سه روز ابتدایی همه‌ی سلول‌ها در محیط کشت معمول بودند. پس از پر شدن کف چاهک‌ها، محیط کشت مناسب با گروه‌های مورد مطالعه به‌هر چاهک اضافه شد.

گروه‌های مورد مطالعه به شرح ذیل بودند: ۱- کنترل منفی: در محیط کشت معمول کشت داده شد، ۲- کنترل مثبت: در محیط کشت تمایزی کشت داده شد، ۳- تیمار ۱: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 10 میکرومول بر لیتر کشت داده شد، ۴- تیمار ۲: در محیط کشت معمول حاوی سیلیمارین 20 میکرومول بر لیتر کشت داده شد، ۵- تیمار ۳: در محیط کشت تمایزی حاوی سیلیمارین 10 میکرومول بر لیتر کشت داده شد، ۶- تیمار ۴: در محیط کشت تمایزی حاوی سیلیمارین 20 میکرومول بر لیتر کشت داده شد، ۷- تیمار ۵: در محیط کشت معمول حاوی استرادیول 100 نانومول بر لیتر کشت داده شد و ۸- تیمار ۶: در محیط کشت تمایزی حاوی استرادیول 100 نانومول بر لیتر کشت داده شد. طول مدت تیمار ۲۱ روز بود. طی این مدت،

پلیت‌های گروه‌های تحت بررسی در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 با ۹۰ درصد رطوبت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هر سه روز یک‌بار تعویض محیط انجام می‌گرفت.

اثبات ماهیت استئوبلاستی سلول‌های تمایز یافته

رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد: به منظور اثبات ماهیت استئوبلاستی سلول‌های تمایز یافته، رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد صورت گرفت که میزان معدنی شدن (رسوب املاح) را نشان می‌دهد.

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در مطالعه حاضر در محیط رویی کشت سلول‌ها با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز خریداری شده از شرکت (پادکو، ایران) و از روش تک محلوله آن طبق دستورالعمل شرکت مذکور انجام شد. خوانش جذب نوری سلول‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در سه زمان ۱، ۳ و ۳۰ دقیقه با دستگاه الیزا ریدر انجام شد. در پایان میانگین جذب نوری سلول‌های هر کدام از گروه‌ها محاسبه شد.

۳- آنالیز آماری

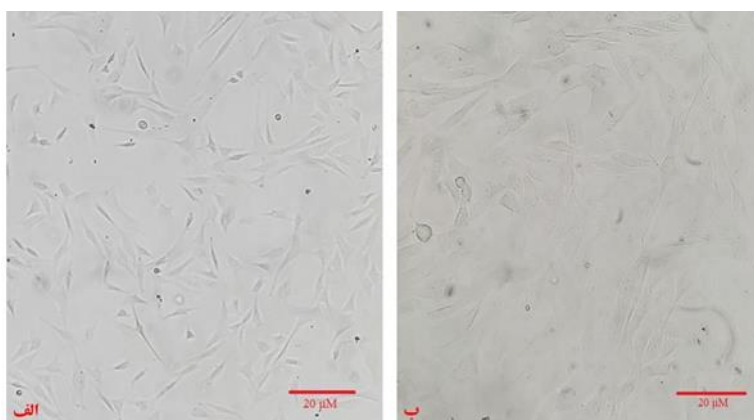
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و براساس آزمون‌های T-student و آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و پس آزمون ال اس دی (LSD) انجام و $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

4- نتایج

شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جنین گوسفند

مورفولوژی

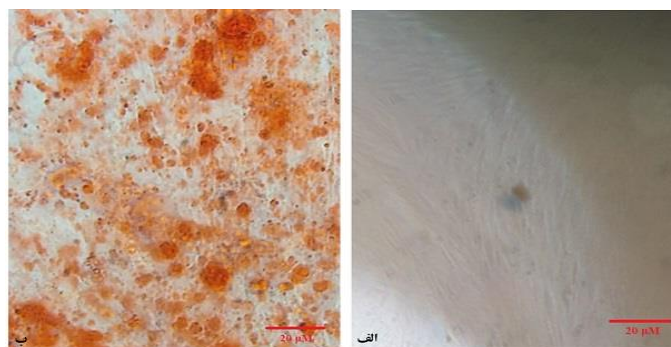
بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جنین گوسفند با کمک میکروسکوپ نوری معکوس در این مطالعه نشان داد که مورفولوژی سلول‌ها شبیه سلول‌های فیبروبلاست و دوکی شکل بود، سیتوپلاسم به شکل زوائدی در اطراف هسته سلول قابل مشاهده بود. سلول‌ها به پلاستیک کف فلاسک کشت چسبیده بودند. در روزهای ابتدایی که تراکم سلول‌ها کم‌تر بود زوائد سلول‌ها باریک‌تر و کشیده‌تر بودند و مرز سلولی به خوبی مشخص بود. با افزایش تراکم سلول‌ها زوائد سیتوپلاسمی کوتاه‌تر شدند و وضوح مرز بین سلول‌ها کاهش یافت (شکل ۱). براین اساس، مورفولوژی سلول‌ها جدا شده در این مطالعه با توجه به ویژگی‌هایی که ذکر شد تاییدکننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی است.



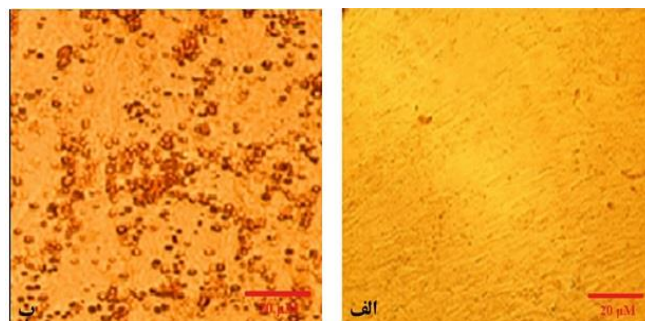
شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جنین گوسفند (بزرگنمایی $\times 400$) در تراکم کم (الف) و تراکم زیاد (ب).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی و استخوان

یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی آن‌ها برای تمایز به رده‌های سلولی مزودرمی چون استخوان، چربی و غضروف است. به منظور تایید بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از مغز استخوان جنین‌های گوسفند در مطالعه حاضر، در محیط تمایزی استخوان و چربی کشت شدند و پس از ۲۱ روز تیمار، تمایز به استخوان و چربی، به ترتیب با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و اوایل رد اُ مورد ارزیابی قرار گرفت. در محیط تمایزی استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جنین گوسفند از حالت دوکی شکل به سمت چندوجهی تغییر شکل دادند و کانون‌های معدنی شدن به صورت نقاط خال‌دار قرمز پس از رنگ‌آمیزی با آلیزارین رد در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بودند. در خصوص تمایز به چربی، ظهور واکوئول‌های حاوی قطرات چربی پس از رنگ‌آمیزی با اوایل رد اُ قابل مشاهده بود (شکل‌های ۲ و ۳).



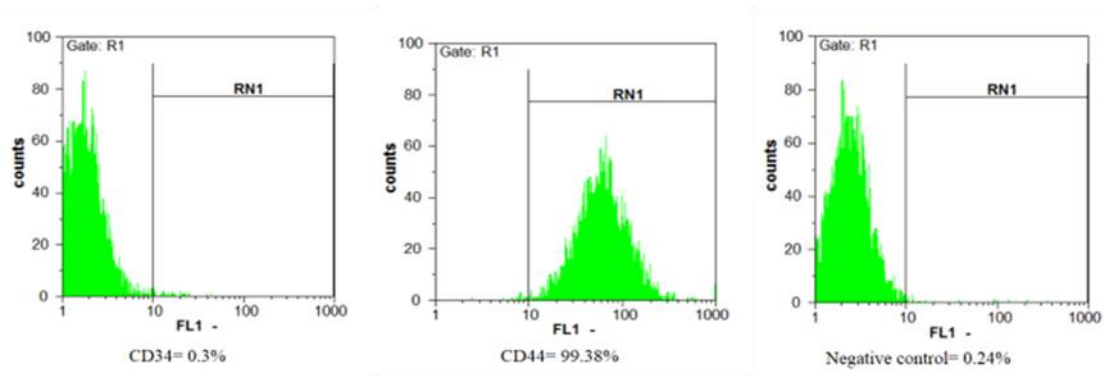
شکل ۲: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان جنین گوسفند به دودمان استخوان‌ساز (بزرگنمایی $\times 400$). الف- گروه کنترل و ب- گروه تمایز؛ رسوبات هیدروکسی‌آپاتیت قرمز رنگ بعد از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد مشاهده می‌شود.



شکل ۳: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان جنین گوسفند به دودمان چربی (بزرگنمایی $\times 400$). الف- گروه کنترل و ب- گروه تمایز؛ قطرات قرمز چربی بعد از رنگ‌آمیزی اوایل رد مشاهده می‌شود.

بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

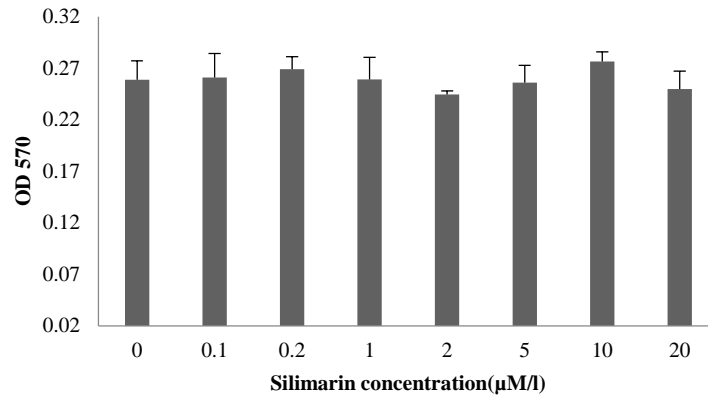
برای تایید بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از بافت مغز استخوان جنین گوسفند، علاوه بر مورفولوژی سلولی و تمایز به دودمان‌های استخوان‌ساز و چربی‌ساز، بیان دو نشانگر سطحی نیز با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی برخی از آنتی‌ژن‌های سطحی را بیان می‌کنند. در این مطالعه، نشانگر مزانشیمی CD44، بیان بالایی را از خود نشان داد (۹۹/۳۸ درصد). این در حالی است که در همین مطالعه، نشانگر CD34 بیان پایینی (۶/۵۲ درصد) را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴: نتایج فلوسایتومتری برای آنتی‌بادی‌های CD44، CD34 و کنترل منفی NC.

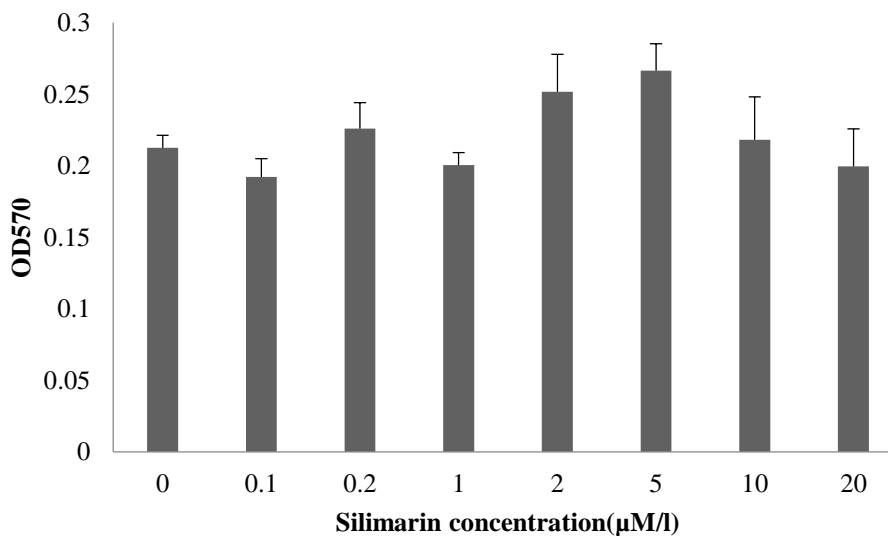
بقای سلولی

نتایج حاصل از آنالیز آماری آزمون MTT در مطالعه حاضر نشان داد که میانگین جذب نوری سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با سیلیمارین به ترتیب برای غلظت ۰، ۰/۰۱±۰/۰۰۱۸، غلظت ۰/۱ میکرومولار بر لیتر، ۰/۲۶۱±۰/۰۰۲۳، غلظت ۰/۲ میکرومولار بر لیتر، ۰/۲۶۹±۰/۰۰۱۲، غلظت ۱ μM/، ۰/۲۵۹±۰/۰۰۲۱، غلظت ۲ μM/، ۰/۲۴۴±۰/۰۰۰۳، غلظت ۵ μM/، ۰/۲۵۶±۰/۰۰۰۳، غلظت ۱۰ μM/، ۰/۲۷۶±۰/۰۰۰۹ و غلظت ۲۰ μM/، ۰/۲۴۹±۰/۰۰۱۷ بود که فاقد تفاوت معنی‌دار بودند (p<۰/۰۵). (نمودار ۱).



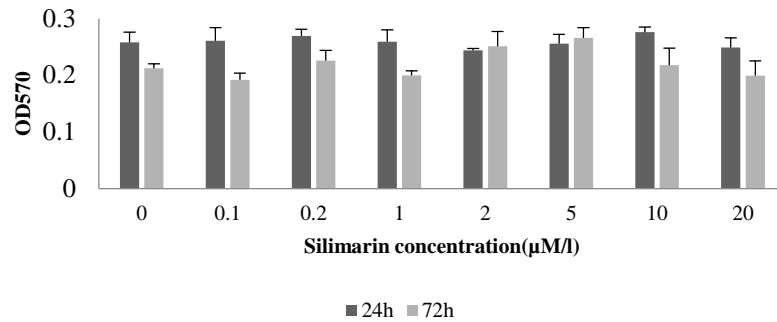
نمودار ۱: مقایسه میانگین جذب نوری سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیمارین

میانگین جذب نوری سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت تیمار با سیلیمارین هم به ترتیب برای غلظت ۰، ۰/۲۱۲±۰/۰۰۸، غلظت ۰/۱، ۰/۱۹۲±۰/۰۱۲، غلظت ۰/۲، ۰/۲۲۶±۰/۰۱۸، غلظت ۱ μM/l، ۰/۲۰۰±۰/۰۰۸، غلظت ۲ μM/l، ۰/۲۶۶±۰/۰۱۸، غلظت ۵ μM/l، ۰/۲۵۱±۰/۰۲۶، غلظت ۱۰ μM/l، ۰/۲۱۸±۰/۰۳۰، و غلظت ۲۰ μM/l، ۰/۱۹۹±۰/۰۲۶ بود که فاقد تفاوت معنی‌دار بودند ($p < 0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه میانگین جذب نوری سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیمارین

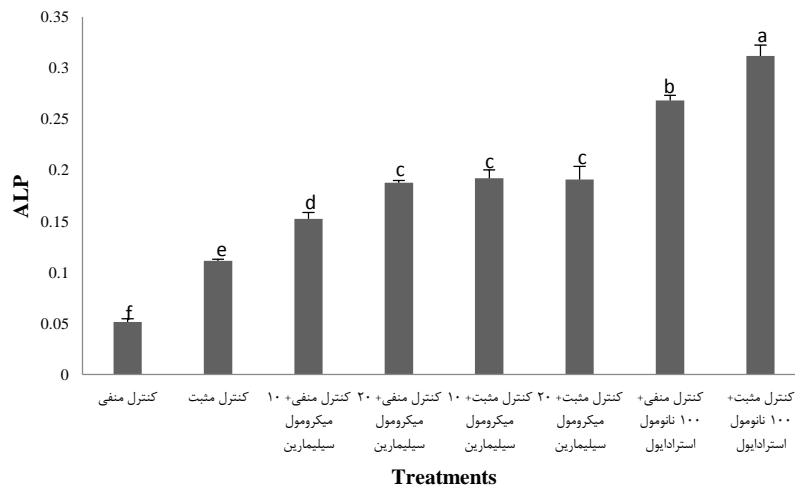
هم‌چنین مقایسه میانگین جذب نوری سلول‌ها در غلظت‌های مختلف بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نشان داد که میانگین جذب نوری سلول‌ها در غلظت صفر سیلیمارین، ۷۲ ساعت پس از تیمار نسبت به زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار کاهش نشان داد ($p < 0.05$) اما در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۳: مقایسه میانگین جذب نوری سلول‌ها بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت

سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز

همان‌گونه که در نمودار ۴ نشان داده شده است، بررسی میزان ترشح آنزیم ۲۱ روز پس از تیمار در گروه‌های کشت شده در محیط کشت معمول و تمایزی نشان داد که در مجموع بیش‌ترین میزان ترشح آنزیم در گروه ۸ با میانگین جذب (۰/۰۱۰۷ ± ۰/۳۱۱۶) بود که به صورت معنی‌دار از تمام گروه‌ها بیش‌تر بود ($p < 0/05$). پس‌از آن، در گروه ۷ با میانگین جذب (۰/۲۶۸۳ ± ۰/۰۰۴۹) بیش‌تر بود ($p < 0/05$). کم‌ترین میزان ترشح آنزیم در گروه ۱ (کنترل منفی) با میانگین جذب (۰/۰۵۱۳ ± ۰/۰۰۳۳) و پس‌از آن به ترتیب در گروه ۲ با میانگین جذب (۰/۰۱۱۳ ± ۰/۰۰۱۴) و گروه ۴ با میانگین جذب (۰/۱۵۲۴ ± ۰/۰۰۰۶) مشاهده شد ($p < 0/05$). بین گروه‌های ۴ با میانگین جذب (۰/۰۱۸۷۶ ± ۰/۰۰۲۲)، ۵ با میانگین جذب (۰/۱۹۲ ± ۰/۰۰۸۴) و ۶ با میانگین جذب (۰/۱۹۱۰ ± ۰/۰۱۲۷) تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0/05$).

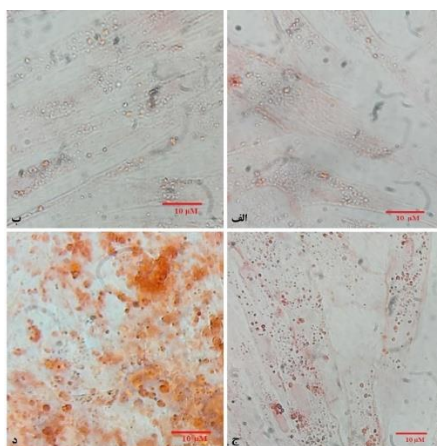


نمودار ۴: میانگین (SEM ± SD) میزان تولید آنزیم آلکالین فسفاتاز ۲۱ روز پس از تیمار در محیط کشت معمولی (۱-۴) و تمایزی (۵-۸). (حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0/05$ هست).

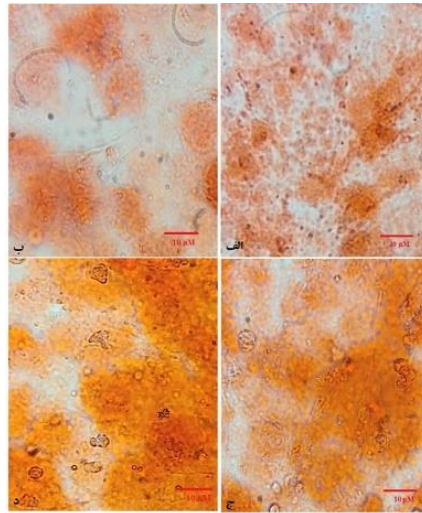
رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

پس از رنگ‌آمیزی سلول‌های کشت شده در محیط معمول توسط آلیزارین رد در روز ۲۱ (شکل ۵)، رسوب یون‌های هیدروکسی‌آپاتیت به صورت نواحی قرمز رنگی در گروه‌های تیمار مشاهده شد در حالی که در گروه کنترل مشاهده نشد. همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است، میزان رسوبات قرمز رنگ در گروه تیمار شده با استرادیول بیش‌تر از گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین بود. هم‌چنین میزان رسوبات در گروه تیمار شده با سیلیمارین ۰۲ بیش‌تر از گروه تیمار شده با سیلیمارین ۰۱ بود.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سلول‌های کشت‌شده در محیط کشت تمایزی استخوان توسط آلیزارین رد در روز ۲۱ (شکل ۶)، نشان داد که رسوبات قرمز رنگ هیدروکسی‌آپاتیت در همه گروه‌ها از جمله گروه کنترل مشاهده شد. باین‌حال مقایسه ظاهری فنوتیپ گروه‌های موردبررسی نشان داد که مقدار نواحی قرمز رنگ در گروه تیمار شده با استرادیول بیش‌ترین بود. هم‌چنین، گروه تیمار شده با سیلیمارین ۲۰ در مقایسه با گروه تیمار شده با سیلیمارین ۱۰ رسوبات بیش‌تری داشت. مقایسه گروه کنترل و گروه تیمار شده با سیلیمارین ۱۰ نیز نشان داد که میزان رسوبات در این دو گروه تقریباً مشابه هم‌دیگر بود.



شکل ۵: مورفولوژی سلول‌ها در گروه‌های مختلف ۲۱ روز پس از تیمار (بزرگنمایی $\times 400$) در محیط معمول الف) گروه کنترل (بدون تیمار)، ب) گروه تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار بر لیتر سیلیمارین، ج) گروه تیمار ۲ شده با غلظت ۲۰ میکرومولار بر لیتر سیلیمارین، د) گروه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ نانومولار بر لیتر استرادیول.



شکل ۶: مورفولوژی سلول‌ها در گروه‌های مختلف ۲۱ روز پس از تیمار (بزرگنمایی $\times 400$) در محیط استخوان‌ساز الف) گروه کنترل (بدون تیمار)، ب) گروه تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار بر لیتر سیلیمارین، ج) گروه تیمار ۲ شده با غلظت ۲۰ میکرومولار بر لیتر سیلیمارین، د) گروه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ نانومولار بر لیتر استرادایول.

۵- بحث

گزارشات Kim و همکاران نشان داد که سیلیمارین دارای اثرات تقویت‌کننده بر تمایز استئوبلاست، رونویسی ژن مارکر استخوانی و مینرالیزیشن ماتریکس خارج سلولی بود. در مطالعه آنها، استئوبلاست‌ها با ۱ تا ۲۰ میلی‌مول در میلی‌لیتر سیلیمارین به مدت ۱۵ روز در یک محیط کشت تمایزی تحت تیمار قرار گرفتند. سیلیمارین باعث تحریک فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) و تشکیل ندول کلسیم به طریق وابسته به غلظت شد. هم‌چنین سیلیمارین باعث افزایش ترشح کلاژن، رونویسی استئوکلسین و بیان پروتئین مورفوژنتیک استخوان (Bone morphogenetic protein: BMP) شد به طوری که مکمل سیلیمارین با افزایش تراکم مواد معدنی استخوان و سطح سرمی ALP و استئوکلسین استئوژنیک، استحکام استخوان را بهبود بخشید (۱۵). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Kim و همکاران انجام شد، عصاره خارمریم غنی از سیلیمارین (Milk thistle extract: MTE) و سیلیبیین فعالیت آلکالین فسفاتاز قلیایی استئوبلاست‌ها را افزایش داد اما فعالیت فسفاتاز اسیدی مقاوم به تارتارات (TRAP) استئوکلاست‌ها را کاهش داد. اثرات محافظت استخوانی MTE با ایزوفلاون استروژنیک (Estrogenic isoflavone) قابل‌مقایسه بود. در این مطالعه ترکیبی از دوز کم MTE و ایزوفلاون دارای یک هم‌افزایی داروشناختی (Pharmacological synergy) بود که ممکن است برای فعالیت‌های استئوژنیک مفید باشد (۱۶). مطالعه‌ی Kim و همکاران تلاشی برای نشان دادن اثرات سرکوب‌گری MTE روی تحلیل استخوانی بود. درمان موش‌های اواریکتومی با MTE غیرتوکسیک و سیلی‌بینین باعث بهبود تراکم مواد معدنی استخوان ران و نسبت لیگاند فعال‌کننده‌ی گیرنده‌ی هسته‌ای فاکتور کاپا بتاسرمی / استئوپروتگرین (Serum receptor activator of nuclear factor-B ligand/osteoprotegerin ratio)، شاخص محرک استئوکلاستوژنیک شد. علاوه‌براین، تجویز MTE یا سیلی‌بینین باعث مهار تحلیل استخوان ران ناشی از اواریکتومی و سرکوب فعالیت TRAP ران و القای کاتپسین K مسئول استئوکلاستوژنز و تحلیل استخوان می‌شود. در مجموع، دوز خوراکی MTE حاوی سیلی‌بینین در شرایط پرکلینیکال در جلوگیری از تحلیل رفتن استخوان ناشی از کمبود استروژن موثر بود (۱۶). در مطالعه Khoobi و همکاران، توانایی سیلیمارین در بهبود نقایص مهم استخوانی کالواریای موش صحرائی با کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از ژل وارتن انسانی (HWJMSC: Human Wharton's jelly Mesenchymal Stem Cell) روی داربست الکتروروسی (پلی اسید لاکتیک/نانولوله کربن) Electrospun scaffold of poly (lactic acid)/carbon nanotube (PLA/CNT))، بررسی شده است. نتایج آنها نشان داد که داربست electrospun PLA/CNT یک داربست زیست سازگار است و

HWJMSC می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی روی این داربست چسبیده و تکثیر شود و داربست نیز گزینه مناسبی برای بهبود روند ترمیم استخوان است. از این رو، استفاده از سیلیمارین به‌علاوه HWJMSC‌های کشت‌شده روی داربست PLA/CNT می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای فرایند استئوژنز و ترمیم استخوان استفاده شود (۱۷). سیلیمارین مخلوط استاندارد شده‌ای از فلاونولینگان‌ها است که به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود و ماده اصلی آن سیلی‌بینین به‌گرفته‌های استروژنی سیتوزولی متصل می‌شود (18). Seidlová-Wuttke و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که این اتصال منحصر به گیرنده استروژن β (ER β) است. تیمار موش‌های صحرایی اواریکتومی شده با سیلیمارین یا استرادایول (E2) ممکن است اجازه دهد که اثرات بیولوژیکی تمایز با واسطه ER α یا ER β ایجاد شود. E2 باعث مهار تجمع LH، کلسترول، LDL و HDL سرمی در خون و افزایش بیان ژن IGF1، HbEGF و C3 در رحم می‌شود، در حالی که سیلیمارین در تغییر این پارامترها کاملاً بی‌اثر یا آنتاگونیست بود (19). هم E2 و هم سیلیمارین بیان ژن ER β رحم را مهار می‌کنند. از این رو، در هیپوفیز، کبد (جایی که لیپوپروتئین‌ها سنتز می‌شوند) و رحم، E2 اساساً از طریق ER α عمل می‌کند. اثرات استروژنیک انحصاری سیلیمارین در متافیز استخوان ران، بر روی پارامترهای استئوبلاستی؛ بیان ژن IGF1، TGF β 1، استئوپوروتگرین، کلاژن-1 α 1، استئوکلسین و بیان ژن اسید فسفاتاز مقاوم در برابر تارتارات مارکر فعالیت استئوکلاستی (TRAP) موش‌های صحرایی بالغ اواریکتومی شده مشاهده شد. بیان ژن ER β در تمام اندام‌ها از جمله استخوان‌های در حال رشد اما نه در متافیز استخوان ران موش‌های صحرایی بالغ اواریکتومی شده تشخیص داده شده است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اثرات سیلیمارین در این قسمت از استخوان را نمی‌توان از طریق ER α اعمال کرد، زیرا به‌این زیرگروه گیرنده متصل نمی‌شود (۱۹). با وجود عدم شناسایی mRNA گیرنده‌ی استروژنی نوع بتا در متافیز استخوان ران در حیواناتی که Seidlová-Wuttke و همکاران مورد آزمایش قرار دادند، احتمال این که پروتئین ER β وجود داشته باشد وجود دارد و ممکن است واسطه‌ی اثرات سیلیمارین باشد. هیچ تاثیری از درمان E2 با ماندگاری یک هفته بر تری‌گلیسیرید سرمی در حیوان تحت درمان با E2 دیده نشد در حالی که این لیپیدها به‌میزان قابل‌توجهی توسط سیلیمارین کاهش یافتند، از این رو به‌نظر می‌رسد این اثرات با واسطه ER β انجام می‌شود (۱۹). طی مطالعاتی Seidlová-Wuttke و همکاران نشان دادند که متافیز استخوان ران موش‌های صحرایی اواریکتومی شده ژن ER β را بیان نمی‌کند. از این رو آن‌ها انتظار نداشتند که اثری به‌واسطه‌ی سیلیمارین در استخوان مشاهده کنند و از مشاهده اثرات ضد استئوپروتیک استروژنی (Estrogenic antiosteoporotic effects) واضح در این ساختار استخوانی متعجب شدند (۱۹). مشخص شده است که بسیاری از اثرات E2 در استخوان به‌واسطه‌ی IGF1 و TGF β 1 است. احتمال دیگر ممکن است این باشد که اثر سیلیمارین و یا امکان دارد که E2 در متافیز استخوان ران از طریق گیرنده‌هایی ناشناخته یا از طریق یک نوع اتصال به‌گیرنده‌ی استروژنی نوع بتا که با روش PCR مورد استفاده در مطالعه آنها، تشخیص داده نمی‌شد، واسطه شود. هم‌چنین سیلیمارین معیارهای یک تعدیل‌کننده‌ی انتخابی گیرنده‌ی استروژن (Selective estrogen receptor modulator (SERM)) با خواص مشابه رالوکسیفن (Raloxifene) را دارد. سیلیمارین یک آنتی‌اکسیدانت قوی و یک ترکیب ضد التهابی است و تاثیر مثبت آن بر بقا و رشد تاکنون در رده‌های سلولی مختلفی به‌اثبات رسیده است (20). در مطالعه‌ی آشتیانی و همکاران درصد بقا در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۸۹، ۹۳، و ۹۶ درصد محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل (۸۳ درصد) افزایش معنی‌داری داشت. با مقایسه‌ی میزان تکثیر hBMSCs در روزهای ۲، ۷ و ۱۴ با دوزهای ذکر شده‌ی سیلیمارین، شاهد افزایش درصد رشد سلول‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل در روزهای دوم تا هفتم و کاهش درصد رشد از روز هفتم تا چهاردهم در حضور سیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل بودند. مطالعه‌ی آنها نشان داد که تیمار سلول‌ها با سیلیمارین در مدت‌زمان مشخص، می‌تواند با افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی و هم‌چنین افزایش سرعت رشد، کارایی این سلول‌ها در حیطه بالینی را افزایش دهد (21). مطالعه‌ی Ying و همکاران نشان داد که سیلی‌بینین می‌تواند اثر استئوژنیک را با تحریک بیان ژن‌های استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان (Human bone marrow stem cells) (hBMSCs)، افزایش دهد. سیلیمارین باعث تقویت تکثیر استئوبلاست و مهار تکثیر استئوکلاست می‌شود و بر بازسازی استخوان تاثیر مثبت می‌گذارد. تجویز سیستمی سیلیمارین باعث افزایش استحکام استخوان و توده‌ی استخوان اسفنجی و کورتیکال یا متراکم (Cancellous and cortical bone mass) می‌شود (22). سیلیمارین سیستمیک می‌تواند یک راه‌کار مؤثر برای افزایش ادغام استخوانی اولیه ایمپلنت پوشش داده‌شده با هیدروکسی آپاتیت در مکان‌های استخوانی با استئوپورز یا

استئوپنی تثبیت شده باشد. (23). مطالعه‌ی مرادی و همکاران برای ارزیابی اثرات سیلیمارین بر وضعیت اکسیداتیو، خصوصیات استخوانی و برخی از پارامترهای خون در بلدرچین‌های ژاپنی تحت استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلریدکربن (CCl₄) انجام شد. در این مطالعه به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار، هر کدام با ۳۰ پرند، با استفاده از آزمایش فاکتوریل ۲ × ۲ با دو دوز سیلیمارین (صفر و ۱ میلی‌لیتر در کیلوگرم وزن بدن) و CCl₄ (صفر و ۱ میلی‌لیتر در کیلوگرم وزن بدن) انجام شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل سیلیمارین و CCl₄ در غلظت کلسترول تام، تری‌گلیسیریدها، گلوکز، آلبومین، کلسیم و آلکالین فسفاتاز معنی‌دار بود (p < ۰/۰۵). در مقابل، غلظت فسفر، پروتئین تام و لیپوپروتئین-کلسترول با دانسیته‌ی بالا در سرم خون بین تیمارهای تجربی تفاوتی نداشت. تیمارهای آزمایشی تاثیر مهمی بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) در سرم خون داشتند (p < ۰/۰۵)، اما بر فعالیت گلوکوتائین پراکسید و غلظت مالون‌دی‌آلدئید تاثیر نداشت. تیمارهای تجربی به طور قابل توجهی بر وزن، ضخامت و قطرهای خارجی و داخلی استخوان ساق، اما نه بر طول، خاکستر، حجم و تراکم آن تاثیر گذاشتند (p < ۰/۰۵). ضخامت ساق در بلدرچین‌های تحت تیمار با سیلیمارین افزایش یافت، اما CCl₄ تاثیری نداشت (p < ۰/۰۵). قطر خارجی و داخلی استخوان ساق در پرنده‌گانی که هر دو روش درمانی را دریافت کردند افزایش یافت (p < ۰/۰۵). CCl₄ منجر به تراکم کم‌تر و درصد کم‌تر خاکستر استخوان ساق شد (p < ۰/۰۵). مطالعه آنها نشان داد که سیلیمارین اثرات مثبت بیش‌تری بر ضخامت ساق نسبت به CCl₄ داشت که ممکن است به دلیل شباهت سیلی‌بین و استروژن در مینرالیزیشن بافت استخوان باشد. همچنین، سیلیمارین هم توانایی کاهش اثرات بد استرس اکسیداتیو ناشی از CCl₄ و هم بهبود خصوصیات استخوانی در بلدرچین‌های ژاپنی را داشت (24) که تاییدکننده نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما می‌باشد.

۶- نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ی سیلیمارین در غلظت‌های مورد بررسی روی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جنین گوسفند اثر سمیت سلولی نداشت. همچنین بر اساس نتایج حاصل از سنجش آنزیم ALP و رنگ‌آمیزی آلیزارین رد حضور سیلیمارین در محیط کشت معمول سلول‌ها باعث القای تمایز آنها به سمت رده استخوان‌ساز شد و در محیط کشت تمایز استئوژنیک نیز باعث افزایش پتانسیل تمایز سلول‌ها به سمت رده استخوان‌ساز شد. در مجموع سیلیمارین در غلظت‌های مورد بررسی باعث افزایش تمایز سلول‌ها به رده‌ی استخوان‌ساز شد که این افزایش وابسته به غلظت بود. از این رو، به نظر می‌رسد با مطالعات بیش‌تر، می‌توان از آن در سلول درمانی جهت ترمیم ضایعات استخوانی استفاده کرد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه رازی برای حمایت‌های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

۸- منابع

1. Adachi T, Aonuma Y, Ito S, Tanaka M, et al. Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation. *J Biomech.* 2009; 42(15):2507-2512.
2. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol.* 2020; 10(82):485-506.
3. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-650.
- 4- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411):143-147.
5. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med.* 2019; 4:22. doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.
6. Parfitt A. M. The bone remodeling compartment: A circulatory function for bone lining cells. *J. Bone Miner. Res.* 2001;16(9):1583-1585.
7. Rutkovskiy A, Stenslökken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016; 26(22):95-106.
8. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-137.

9. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000;21(11):1095-1102.
10. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2001;7(1):89-99.
11. Kawai S, Yoshitomi H, Sunaga J, Alev C, et al. In vitro bone-like nodules generated from patient-derived iPSCs recapitulate pathological bone phenotypes. *Nat Biomed Eng*. 2019; 3(7): 558–70.
12. Mechiche Alami S, Gangloff SC, Laurent-Maquin D, Wang Y, et al. Concise Review: In Vitro Formation of Bone-Like Nodules Sheds Light on the Application of Stem Cells for Bone Regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(11):1587-1593.
13. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, MoralesGonzález Á, Esquivel-Soto J, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J hepatol* 2014;6(3):144-149.
14. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res*. 2010;24(10):1423-1432.
15. Kim JL, Park SH, Jeong D, Nam JS, et al. Osteogenic activity of silymarin through enhancement of alkaline phosphatase and osteocalcin in osteoblasts and tibia-fractured mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(4):417-428.
16. Kim JL, Kim YH, Kang MK, Gong JH, et al. Antiosteoclastic activity of milk thistle extract after ovariectomy to suppress estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Biomed Res Int*. 2013 :1-11.
17. Khoobi MM, Naddaf H, Hoveizi E, Mohammadi T. Silymarin effect on experimental bone defect repair in rat following implantation of the electrospun PLA/carbon nanotubes scaffold associated with Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2020;108 (9) :1944-1954.
- 18- El-Shitany, Nagla A., Sahar Hegazy, and Karema El-Desoky. "Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats." *Phytomedicine*. 2010; 17(2): 116-125.
- 19- Seidlová-Wuttke D, Becker T, Christoffel V, Jarry H, et al. Silymarin is a selective estrogen receptor beta (ERbeta) agonist and has estrogenic effects in the metaphysis of the femur but no or antiestrogenic effects in the uterus of ovariectomized (ovx) rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 ;86(2):179-188.
- 20- Dixit N, Baboota S, Kolhli K, Ahmad S, Ali J. Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioviability enhancement approaches. *Indian J Pharmacol*. 2007; 39: 172-179.
21. Ahmadi Ashtiani H, Allameh A, Hamidipour N, Rastegar H, et al. Increasing Rate of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Proliferation in the Presence of Silymarin. *J. Med. Plants*. 2010; 9 (34) :156-164.
22. Ying X, Chen X, Liu H, Nie P, et al. Silibinin alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells via antioxidant effect and PI3K/Akt signaling. *Eur J Pharmacol*. 2015;765: 394-401.
23. Tao ZS, Wu XJ, Yang M, Xu HG. Local administration with silymarin could increase osseointegration of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats. *J Biomater Appl*. 2019; 34(5): 664-672.
- 24- Moradi F, Samadi F, Dastar B, Samadi S. The effects of silymarin on oxidative status and bone characteristics in Japanese quail subjected to oxidative stress induced by carbon tetrachloride. *Poultry Sci J*, 2017; 5(2): 97-104.