*Original Article*

# Synergism between the aqueous extract of saffron (*Crocus sativus L)* and vitamin D3 on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

**Baharara J[1*], Nejhad Shahrokhabadi Kh[2], Nazemi M[2], Ramezani T[3]**

1-Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.
3- PhD Student in Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.

Received Jan 4, 2014; Accepted September 9, 2014

## Abstract:

**Background:** Saffron has the various significant pharmacological effects.Vitamin D3 is also involved in differentiation and functions in various cells. This study aimed to investigate the synergetic effects of the aqueous extract of saffron and vitamin D3 on the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts.

**Materials and Methods:** Flushing method was used to extract mesenchymal stem cells. Immunocytochemistry agonist CD44 antigen was also used to verify the identification of stem cells. In the experimental group, cells were treated with 600,700,800 mg/l doses of the saffron extract and the above-mentioned doses of saffron with $5\times10^{-7}$ M of vitamin D3 were used to induce differentiation. The control group did not receive any treatment. Cell differentiation was evaluated by the alkaline phosphatase activity assay after 10 days and Alizarin Red staining was also performed 21 days after the treatment.

**Results:** Alkaline phosphatase activity in the vitamin D3 and saffron groups showed a significant increase compared to the control groups. The activity of this enzyme in the combined treatment groups showed a significant increase compared to their single use. The Alizarin Red staining showed the differentiative effects of vitamin D3, saffron and their coadministration in the differentiation of stem cells into osteoblast**.**The saffron and Vitamin D3 coadministration has the most profound effect on the differentiation of mesenchymal stem cell into osteoblast.

**Conclusion:** The results indicate that the coadministration of saffron and vitamin D3 has a significant effect on the differentiation of mesenchymal stem cell into osteoblast cells.

**Keywords:** Osteoblast, Differentiation, Saffron, Stem Cell, Vitamin D3

* **Corresponding Author.**
**Email:** baharara@yahoo.com
**Tel:** 0098 513 843 7092
**Fax:** 0098 513 843 709

Conflict of Interests: ***No***

***Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences December, 2014; Vol. 18, No 5, Pages 411-418***

***Please cite this article as:*** Baharara J, Nejhad Shahrokhabadi Kh, Nazemi M, Ramezani T. Synergism between the aqueous extract of saffron (*Crocus sativus L)* and vitamin D3 on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. ***Feyz*** 2014; 18(5): 411-8.

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]

# اثر هم‌افزایی عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus L*) و ویتامین D3 بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان موش صحرایی

جواد بهارارا [1*]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی [2]، مریم ناظمی [3]، طیبه رمضانی [4]

**خلاصه:**

**سابقه و هدف:** زعفران دارای اثرات فارماکولوژیک متعددی بوده و ویتامین D3 نیز در تمایز و عملکرد بسیاری از سلول‌ها دخالت دارد. در مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی عصاره آبی زعفران و ویتامین D3 بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار استخراج شده و شناسایی به کمک روش ایمونوسیتوشیمی انجام شد. در گروه‌های تجربی، سلول‌های بنیادی با غلظت‌های ۶۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم در لیتر زعفران و نیز غلظت‌های فوق الذکر زعفران همراه با غلظت $5\times10^{-7}$ مولار ویتامین D3 جهت القا تمایز استفاده شد. گروه کنترل هیچ‌گونه تیماری دریافت نکرد. تمایز سلول‌ها با سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز پس از ۱۰ روز و رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۲۱ پس از تیمار بررسی گردید.

**نتایج:** فعالیت آلکالین فسفاتاز گروه‌های دریافت کننده ویتامین D3 و زعفران در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشت. هم‌چنین، میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تیمار توام زعفران و ویتامین D3 نسبت به کاربرد هریک به‌تنهایی افزایش داشت. رنگ آمیزی آلیزارین رد، اثرات تمایزی ویتامین D3، زعفران و تیمارهای توام آنها بر سلول‌های بنیادی به سمت به استئوبلاست را نشان داد و بیشترین اثر تمایزی در گروه تجربی زعفران همراه با ویتامین D3 مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** کاربرد توام زعفران و ویتامین D3 دارای اثرات معنی‌دار در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به استئوبلاست‌ها می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** استئوبلاست، تمایز، زعفران، سلول بنیادی، ویتامین D3

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۳، صفحات ۴۱۸-۴۱۱

## مقدمه

پیوند استخوان یکی از معمول‌ترین شیوه‌ها در ارتوپدی و ترمیم بافت استخوانی می‌باشد [۱]. امروز استفاده از داربست‌های طبیعی و مصنوعی که بتواند حامل سلول‌های بنیادی برای کمک به ترمیم استخوان‌های آسیب دیده باشد، در پیوندهای استخوان استفاده می‌شود [۲]. سلول‌های بنیادی در نقاط مختلفی از بدن از قبیل: مغز استخوان، خون بند ناف و اکثر بافت‌های بدن یافت می‌شوند؛ این سلول‌ها دارای دو ویژگی اصلی مهم یعنی پرتوانی و خودنوسازی می‌باشند [۳].

منبع اصلی این سلول‌ها مغز استخوان است که در مهندسی بافت نیز مورد توجه ویژه قرار گرفته است؛ به این دلیل که این سلول‌ها پس از تمایز یافتن به استئوبلاست بیشترین شباهت را به استئوبلاست‌های بافت طبیعی دارند [۴،۱]. از طرف دیگر، استفاده مستقیم از سلول‌های بنیادی برای اهداف درمانی ممکن است با مشکلاتی از جمله رشد غیر قابل کنترل سلول‌ها مواجه شود [۵]. بنابراین، برای استفاده از سلول‌های بنیادی در اهداف درمانی روش معمول بدین صورت است که سلول‌ها را با مواد و فاکتورهای مناسب به سمت رده سلول‌های مورد نظر تمایز می‌دهند و سپس از این سلول‌های متعهد برای اهداف درمانی استفاده می‌شود [۶]. مواردی که تاکنون برای القا تمایز استئوسیتی استفاده شده‌اند، بیشتر محدود به فاکتورهای رشد هستند که دسترسی به آنها مشکل می‌باشد و از نظر اقتصادی استفاده از آن‌ها مقرون به صرفه نمی‌باشد [۷،۳]. استخوان‌زایی یک فرایند تکوینی است که تعداد زیادی از عوامل بیرونی مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، مسیرهای پیام‌رسان و فاکتورهای رونویسی در آن دخالت دارند. استئوبلاست‌ها شاخص‌های استئوکلسین، استئوپونتین، آلکالین فسفاتاز و سیالو-پروتئین استخوانی را بیان می‌کنند [۸،۶]. یکی از فاکتورهای دخیل در تمایز استخوان مشتقات ویتامین D می‌باشند. ویتامین D3 یک هورمون سکواستروئیدی است که به رسپتورهای هسته‌ای که

[1] دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

[2] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد مشهد

[3] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

[4] دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

* **نشانی نویسنده مسئول:**
مشهد خیابان راهنمایی ۲۴، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه ازاد اسلامی مشهد

**تلفن:** ۰۵۱۱۸۴۳۷۰۹۲ **دورنویس:** ۰۵۱۱۸۴۳۷۰۹۲

**پست الکترونیک:** baharara@yahoo.com

**تاریخ دریافت:** ۹۲/۱۰/۱۴ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۶/۱۵



[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]

گیرنده D3 نامیده می‌شود، اتصال پیدا می‌کند. این ویتامین در مجموع نقش شناخته شده‌ای در هومئوستازی اسکلتی و معدنی دارد و می‌تواند تمایز و رشد و عملکرد طیف گسترده‌ای از سلول-ها را کنترل کند [۹]. زعفران (*Crocus sativus*) گیاهی کوچک از خانواده زنبق می‌باشد [۱۰]. گیاه زعفران دارای اثرات فارماکولوژیک متعددی می‌باشد؛ به‌طوری‌که پژوهش‌ها نشان داده-اند که زعفران و مواد موثر آن دارای اثرات ضد تومور، آنتی-اکسیدان، آنتی ژنوتوکسیک، حفاظت سلولی، ضد درد و التهاب، ضد تشنج، ضد افسردگی و کاهنده علائم محرومیت از اوپیوئید می‌باشند [۱۰]. طعم تلخ زعفران ناشی از ماده‌ای به نام پیکرو-کروسین است که تحت تجزیه آنزیمی، به آلدئیدی معطر به نام سافرانال تبدیل می‌شود [۳]. کاروتنوئیدهای دیگری مانند بتا-کاروتن، لیکوپن و زآگزانتین و ویتامین‌ها به‌خصوص ریبوفلاوین و تیامین در زعفران یافت می‌شود؛ در حالی‌که کروسین، کروستین و سافرانال مواد موثره اصلی زعفران هستند که اجزایی کاروتنوئیدی می‌باشند [۱۱،۱۰]. شواهدی وجود دراد که نشان می‌دهد کارو-تنوئیدها و انواع مواد مشتق از آنها قادر به متآثر ساختن انواع سلول‌های بنیادی و سرطانی می‌باشند و می‌تواند تمایز را در آن‌ها القا کنند [۱۲] و با توجه به اینکه عصاره زعفران سه فرآیند متابولیکی مهم یعنی ساخت DNA، RNA و پروتئین را در سلول‌های سرطانی متوقف و مهار می‌کند، می‌توان انتظار داشت که در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با مهار تکثیر سلولی باعث بروز تمایز شود [۱۴،۱۳]. از آنجا که اثرات القا کننده تمایز ویتامین D3 نیز اثبات شده است و هم‌چنین با توجه به ضرورت مطالعه در مورد عوامل موثر در القا تمایز سلول‌های بنیادی، در پژوهش حاضر با کاربرد توام زعفران (به‌عنوان یک فرآورده طبیعی) و ویتامین D3، اثر هم‌افزایی آن‌ها در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش‌های صحرایی به سمت استئو-بلاست بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد به‌شرح ذیل انجام گردید.

تهیه عصاره آبی زعفران: زعفران از موسسه نوین زعفران خراسان رضوی تهیه گردید. سه گرم از کلاله‌های خشک زعفران (*Crocus sativus L*) کاملا ساییده شد و عصاره گیری با استفاده از دستگاه سوکسله و آب مقطر انجام گردید و سپس برای خشک کردن عصاره زعفران از دستگاه انجماد در خلاء استفاده شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز، پودر حاصل از عصاره‌گیری کلاله‌های زعفران توزین شده و در محیط کشت (Sigma, UK) DMEM حل گردید.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۶-۸ هفته از موسسه سرم سازی رازی مشهد با محدوده وزنی ۱۸۰-۱۲۰ گرم خریداری گردید و در اتاق حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به مقدار کافی آب و غذا در دسترس داشتند. در ضمن در کلیه مراحل تحقیق، مقررات در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. ابتدا موش‌ها با کلروفرم کشته شدند و در شرایط کاملا استریل استخوان ران و درشت نی آنها جدا گردید و دو سر این استخوان‌ها با کمک قیچی تیز بریده شد و مغز استخوان از داخل کانال استخوانی با روش Flushing و به کمک سرنگ حاوی محیط کشت DMEM خارج در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب سلولی در فلاسک‌های کشت سلولی قرارداده شده و از محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Sigma,UK) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین استفاده شد. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک‌بار تعویض شده و هنگامی که تراکم سلولی به اندازه مطلوب رسید پاساژ سلولی انجام شد [۵].

شناسایی سلول‌های بنیادی به‌وسیله آنتی‌ژن‌های سطحی: بدین منظور از روش ایمونوسیتوشیمی و آنتی‌بادی بر علیه مارکر سطحی CD44 (Abcam, Germany) استفاده گردید. بدین ترتیب که سلول‌های خالص شده در پارافرمآلدئید ۴ درصد ثابت گردید و با آنتی‌بادی اولیه بر علیه CD44 موش صحرایی IGg ایزوتایپ به‌مدت ۴ ساعت تیمار شد. سپس، سلول‌ها با کمک فسفات بافر سالین شتسشو داده شدند و سپس در معرض آنتی‌بادی ثانویه بر ضد موش صحرایی (Abcam, Germany) نشان‌دار با ماده فلوئورسنس FITC (Sigma,Uk) قرار گرفتند. در انتها بعد از گذشت ۱ ساعت سلول‌ها سه بار شتسشو داده شدند و سپس رنگ آمیزی با DAPI به‌مدت ۵ دقیه انجام گرفت و بعد از انجام مراحل شتسشو نتیجه با میکروسکوپ فلوئورسنس LaboMed, (Korea) آنالیز شد. گروه کنترل منفی که آنتی‌بادی اولیه و یا ثانویه را دریافت نکرده بودند، نیز لحاظ گردید.

تیمار سلول‌ها با ویتامین D3، زعفران و این دو ماده به-صورت هم‌زمان برای القاء تمایز: سلول‌های بنیادی مزانشیمی ($۵\times۱۰^{۳}$) در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. در ابتدا سلول‌های کشت داده شده با غلظت‌های زعفران (۶۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم



[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]

در لیتر) تیمار گردیدند. این غلظت‌ها بر اساس غلظت‌های غیر سمی گزارش شده در گزارش‌ها قبلی گروه حاضر انتخاب شدند [۵]. هم‌چنین، غلظت‌های مختلف ویتامین D3 ($۱۰^{-۷}$, $۱۰^{-۷}$×۵ و $۱۰^{-۶}$ مولار) نیز که براساس گزارشات قبلی انتخاب شده بودند [۱۳] نیز برای بررسی اثرات تمایزی به سلول‌ها اضافه شدند. سپس، بر اساس نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با هر یک از موارد زعفران و ویتامین D3 به‌تنهایی تیمار این سلول‌ها به‌صورت هم‌زمان با غلظت‌های ۸۰۰،۷۰۰،۶۰۰ میلی گرم در لیتر زعفران همراه با غلظت ثابت $۵×۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 به‌صورت سینرژیست انجام گرفت. گروه تیمار هیچ‌گونه تیماری را دریافت ننمود. در طی مدت تیمار تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس (INV, Italy) کنترل گردید و پس از طی شدن زمان مورد نظر آزمون‌های الیزارین رد و آلکالین فسفاتاز انجام شد.

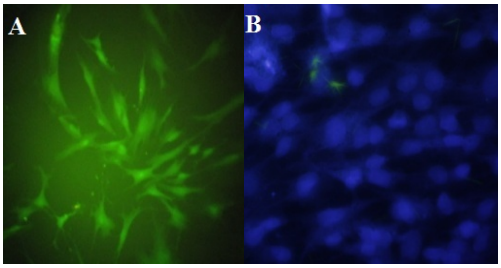
رنگ آمیزی با آلیزارین رد: پس از گذشت ۲۱ روز از تیمار، سلول‌ها چندین بار توسط بافر فسفات سالین شستشو داده شده و با پارا فرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند. سپس، توسط رنگ آلیزارین رد (Merck, Germany) به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. برای مطالعات کمی رسوب رنگ آلیزارین رد به‌وسیله اسید استیک ۱ درصد حل شده و جذب نوری در 405nm به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Epoch, USA) بررسی شد [۱۳].

بررسی میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز: پس از گذشت ۱۰ روز از تیمار، سلول‌ها چند بار با PBS شستشو داده شد و توسط بافر لیز کننده NP4O لیز شده و محلول فوق در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا شده و با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز (Pars Azmoon, Iran) فعالیت آلکالین فسفاتازی در طول موج 405nm با روش رنگ سنجی با استفاده از اسپکتروفتومتر (Epoch, USA) مورد آزمایش قرار گرفت [۱۴].

داده‌های کمی حاصل توسط نرم افزار SPSS با استفاده از آنالیز آزمون‌های واریانس یک عاملی و پس آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ آنالیز گردید و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شدند.

## نتایج

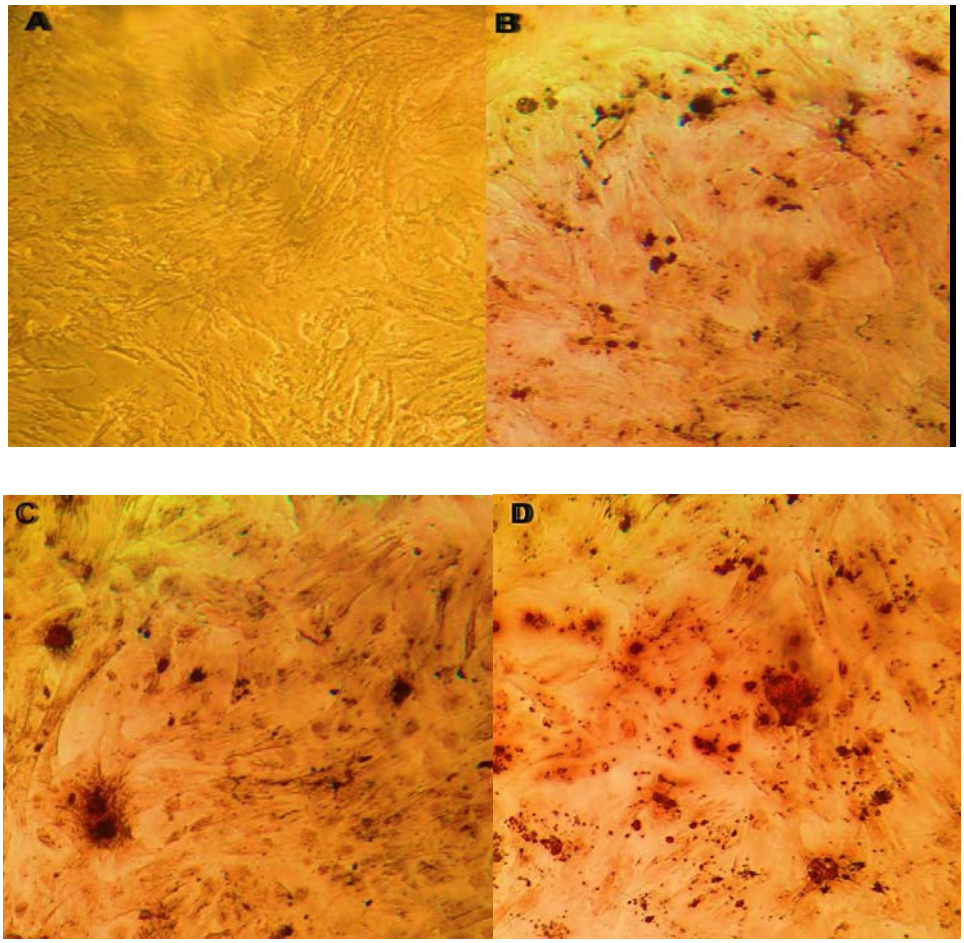
سلول‌ها پس از انجام ایمنوسیتوشیمی توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. وجود آنتی ژن CD44 و تجمع این مارکرها بر سطح سلول با رنگ سبز در اثر آنتی بادی ثانویه در شکل A ۱ مشاهده می‌شود و در نتیجه بنیادی بودن سلول‌ها توسط این روش تایید شد. هم‌چنین، وجود سلول با رنگ‌آمیزی هسته‌های آن‌ها با رنگ DAPI در نمونه‌هایی که ایمنو سیتوشیمی انجام گرفت تایید شد (شکلB ۱).




شکل شماره ۱- A: مشاهده رنگ سبز فلورسنت در اطراف سلول‌های بنیادی به‌علت وجود آنتی ژن CD44 بر سطح سلول‌ها. B: رنگ آمیزی DAPI، 10×10X.

با بررسی‌های کیفی از میزان رنگ پذیری ماتریکس و قرمز شدن آن‌ها می‌توان به میزان تمایز پی برد [۵]. بررسی نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد نشان داد که ویتامین D3 منجر به القای تمایز به سمت استئوبلاست‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده است و بیشترین اثر تمایز در دوز $۵×۱۰^{-۷}$ مولار نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (شکل شماره ۲، B). سلول‌های بنیادی مزانشیمی هم‌چنین تحت تیمار با عصاره زعفران تمایز استئوبلاستی نشان داده و این اثر در حضور دوز ۸۰۰ میلی گرم در لیتر زعفران حداکثر بود (شکل شماره ۲، C). بیشترین میزان رنگ پذیری ماتریکس خارج سلولی با رنگ آلیزارین رد مشاهده گردید. در مرحله بعد غلظت‌های مختلف زعفران و بهترین غلظت ویتامین D3 که مطابق با نتایج بررسی آن به تنهایی بیشترین اثرات تمایزی را داشت، به‌صورت هم‌زمان برای القا تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده گردید. بررسی نمونه‌های رنگ آمیزی شده با آلیزارین رد در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌های زعفران همراه با غلظت $۵×۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 نشان داد که کاربرد غلظت ۸۰۰ میلی گرم در لیتر زعفران و $۵×۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 به صورت توام حداکثر اثر تمایزی در مقایسه با کاربرد هر یک از موارد به تنهایی را دارد (شکل شماره ۲، D).

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]




شکل شماره ۲- نتایج رنگ آمیزی الیزارین رد برای دوزهای مختلف ویتامین D3، زعفران و هم‌افزایی آنها. رسوب رنگ الیزارین رد و رنگ قرمز نشانه تمایز سلول‌های بنیادی به اوستئوبلاست می‌باشد. A: کنترل، B: دوز ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر، C: غلظت دوز $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 به‌تنهایی و D : دوز $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 و زعفران به‌صورت توام، بزرگ‌نمایی (۱۰×۱۰x).

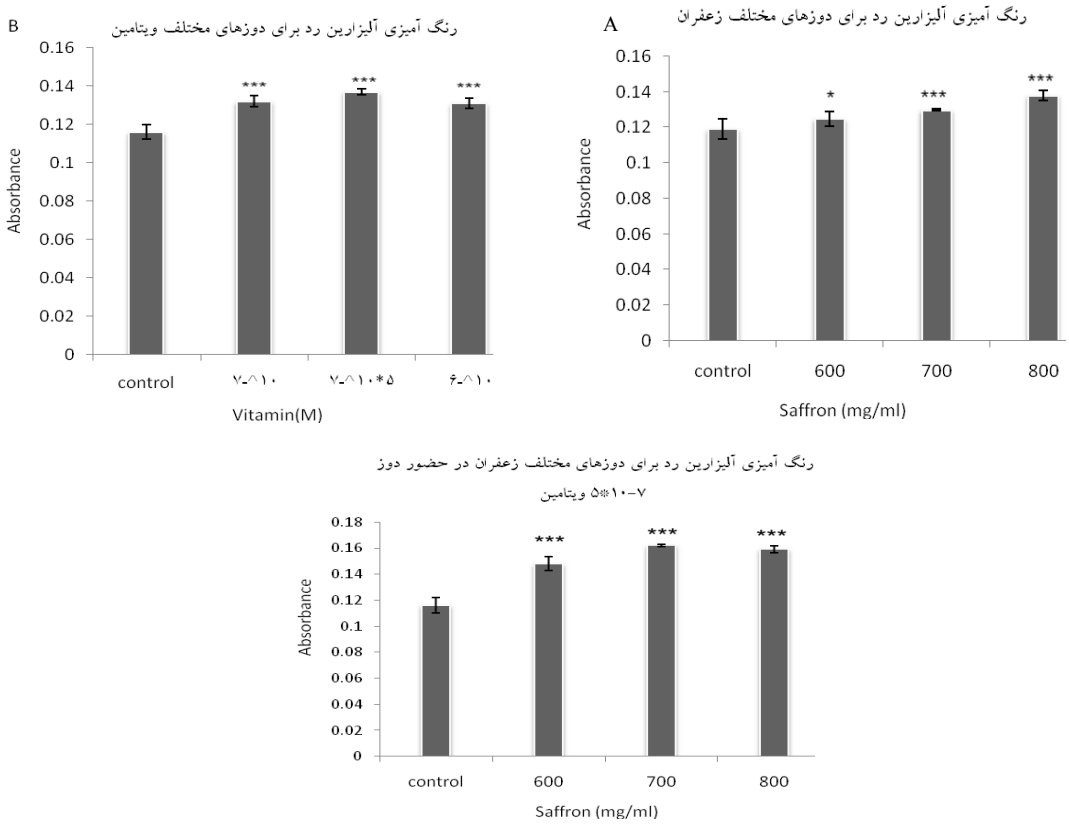
بررسی کمی رسوب آلیزارین رد از طریق تعیین جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر نشان داد که میزان جذب در گروه تیماری ویتامین D3 با غلظت $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار نسبت به شاهد در مقایسه با دوزهای دیگر افزایش معنی‌دار دارد ($P<۰/۰۰۱$). هم‌چنین، بررسی در گروه‌های تیماری با دوزهای مختلف زعفران نشان داد که گروه تجربی ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین جذب را در مقایسه با شاهد دارد ($P<۰/۰۰۱$). به‌علاوه، در گروه‌های تجربی کاربرد توام غلظت‌های سه گانه زعفران همراه با غلظت $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 بیشترین جذب نوری در گروه ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر زعفران توام با دوز $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). بررسی نتایج کمی فعالیت آلکالین فسفاتاز نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تیماری زعفران با غلظت‌های ۶۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار دارد ($P<۰/۰۰۱$) و بیشترین فعالیت مشاهده شده آلکالین فسفاتازی در گروه تیمار با ۸۰۰ میلی گرم در لیتر رخ داد (نمودار ۱ A). بررسی کمی فعالیت آلکالین فسفاتاز نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تجربی مربوط به ویتامین D3 با غلظت‌های $۱۰^{-۷}$ و $۵\times۱۰^{-۷}$ و $۱۰^{-۶}$ مولار افزایش دارد؛ به‌نحوی‌که بیشترین فعالیت آلکالین فسفاتازی در غلظت $۵\times۱۰^{-۷}$ مول با سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل تعیین شد (نمودار ۱ B). بررسی کمی فعالیت آلکالین فسفاتازی نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تیماری کاربرد توام هریک از غلظت‌های ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰ میکرو گرم در لیتر همراه با غلظت $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 افزایش معنی‌دار دارد ($P<۰/۰۰۱$). بیشترین میزان فعالیت آلکالین فسفا-تازی در گروه تیماری غلظت ۸۰۰ میلی گرم در لیتر زعفران همراه با دوز $۵\times۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$، نمودار C۱).

## بحث

زعفران به‌طور سنتی به‌عنوان یک رنگ یا طعم دهنده استفاده می‌شود، اما تحقیقات اخیر توان بالقوه این ماده را در

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]

ارتقاء سلامت نشان داده است و ترکیبات مهم زعفران نظیر کروسین، پیکروکروسین و سافرانال دارای اثرات ویژه هستند [۱۵].




نمودار شماره ۱- بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در دوزهای مختلف زعفران (A) ویتامین D3 (B)، و دوزهای هم‌افزایی زعفران و ویتامین D3 (C). $P<۰/۰۱$**, $P<۰/۰۰۱$***

ترکیب بیولوژیکی ویتامین D3 نوعی هورمون سکوستروئید می‌باشد که در تنظیم بافت استخوان و متابولیسم کلسیم-فسفات دخالت دارد [۱۷،۱۶]. از جهت دیگر با توجه به ضرورت شناسایی عوامل مؤثر بر القاء تمایز سلولی‌های بنیادی به سمت رده‌های مختلف بافت‌های استخوانی با اهداف درمانی از جمله درمان شکستگی‌ها لزوم توجه به مواد طبیعی که بتوانند تمایز را در سلول‌های بنیادی القا کنند، کاملا ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف این مطالعه استفاده از زعفران (به‌عنوان عاملی طبیعی) و به‌صورت هم‌افزایی با ویتامین D3 (که به‌صورت آماده و تجاری مصرف درمانی دارند) به‌منظور افزایش القای تمایز در سلول‌های استرومایی استخراج شده از مغز استخوان موش صحرایی بود. اگر چه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابعی متنوعی نظیر خون نوزادان، خون بند ناف و مایع آمنیوتیک نیز قابل جداسازی هستند، اما در دسترس‌ترین منبعی که برای استفاده از این سلول‌ها پیشنهاد می‌شود، مغز استخوان است [۱۸]. بنابراین، در مطالعه حاضر نیز به‌علت قابلیت دسترسی آسان، روش ساده جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، از این سلول‌ها به‌منظور بررسی قدرت تمایزی زعفران و ویتامین D3 استفاده شد. موش‌های صحرایی استفاده شده در محدود سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته قرار داشتند. طبق گزارشات قبلی در این سن تعداد سلول‌های بنیادی به‌دست آمده از حیوان بیشتر بوده و قابلیت گسترش سلول‌ها بیشتر می‌باشد [۱۹]. سلول‌های مزانشیمی جدا شده بر اثر خاصیت چسبندگی خود به کف فلاسک چسبیده و سلول‌های خون ساز با تعویض محیط حذف شدند. این سلول‌ها به‌صورت خالص پس از ۳ پاساژ ظاهری دوکی شکل و کشیده داشتند. این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده در بسیاری از تحقیقات از جمله مطالعه Amani و همکاران بود [۲۰]. نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی نشان داد که سلول‌های مزانشیمی جدا شده داری مارکر سطحی CD44 می‌باشند. این مارکر یکی از شاخص‌های بنیادی بودن سلول‌ها می‌باشد [۲۱]. برای بررسی اثرات تمایز استئوژنیکی به‌کارگیری توام عصاره زعفران و ویتامین D3 از رنگ آمیزی آلیزارین رد و سنجش آلکالین فسفاتاز استفاده شد. میزان فعالیت آلکالین فسفا-

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]

تازی سلول‌ها ۱۰-۷ روز پس از تیمار افزایش می‌یابد که این موضوع به‌عنوان شاخص اولیه جهت تمایز سلول‌های بنیادی به اوستئوبلاست مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان جذب نوری شاخصی از جذب رنگ الیزارین رد و جذب رنگ نشانه میزان معدنی شدن ماتریکس سلولی است. استفاده از این دو روش در مطالعات تمایزی به سمت بافت استئوژنیک متداول است و محققان دیگر نیز برای تآیید تمایز به استئوسیت‌ها از این دو روش استفاده نموده‌اند [۲۲،۲۰]. ارزیابی نتایج حاصل از رنگ آمیزی با آلیزارین رد به‌صورت کیفی و کمی نشان داد که قدرت تمایز دهی ویتامین D3 و زعفران به‌صورت توام بیشتر از کاربرد هر یک به‌تنهایی است. در تجربه حاضر بیشترین میزان تمایز در نمونه‌های تحت تیمار با ویتامین D3 در دوز $5\times10^{-7}$ مولار مشاهده شد. در گروه‌های هم‌افزایی بیشترین تاثیرگذاری در هم‌افزایی $5\times10^{-7}$ مولار ویتامین D3 و ۸۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید؛ در این رابطه آشتیانی و همکاران طی تحقیقی نشان دادند که ماده گیاهی سیل مارین دارای توانایی حفاظت سلولی و حفظ تکثیر و زیست پذیری سلول‌ها می‌باشد [۲۳]. بنابراین، گیاهان می‌تواند زمینه امید بخش جهت استفاده در اهداف درمانی با واسطه سلول‌های بنیادی باشند. گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد کروسین، کروستین و مشتقات آن‌ها، رشد برخی از سلول‌های سرطانی بدخیم را در محیط کشت مهار می‌کنند و به‌عنوان مثال رشد سلول‌های سرطانی HL60 و K562 به‌طور واضحی توسط کروسین، کروستین و دی متیل کروستین مهار شده است [۲۴]. در برخی تجربیات دیگر اثر مهاری مواد فوق الذکر روی سلول‌های سرطان سینه به‌صورت وابسته به دوز مشاهده شده است [۲۵،۲۴]. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره زعفران دارای اثرات مهاری بر تکثیر سلولی است و در سلول‌های بنیادی وقتی که در آن‌ها تقسیم مهار می‌شود، وارد فاز تمایزی می‌شوند [۲۵]. البته در این مورد باید توجه داشت ماده مورد نظر در غلظت‌های کشنده استفاده نگردد، زیرا مهار تکثیر در این غلظت‌ها مرگ سلولی را نیز به‌دنبال دارد. بنابراین، در این مطالعه با استفاده از نتایج مطالعات قبلی گروه ما غلظتی از زعفران استفاده گردید که مرگ سلولی را به‌دنبال نداشته باشد و با مهار تکثیر سلول فرصت شروع روندهای تمایزی را در اختیار سلول قرار دهد. بدین ترتیب، می‌توان انتظار داشت سلول‌هایی مزانشیمی بنیادی که توانایی ورود به فاز تقسیم را از دست می‌دهند، وارد فاز تمایزی شوند و این موضوع با نتایج این مطالعه مبنی بر اثر تمایزی زعفران هم‌سو می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی زعفران می‌تواند منجر به افزایش تمایز سلول‌های بنیادی به استئوبلاست شود. در این راستا Mahmoud و همکاران از عصاره اتانولی گیاه باریجه برای تمایز سلول‌های بنیادی به سمت استئوبلاست استفاده نمودند. یافته‌های حاصل از مطالعات این گروه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه باریجه دارای اثرات مثبت بر روند تکثر و تمایز سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان انسان می‌باشد. در واقع این محققین با استفاده از فرآورده‌های طبیعی گیاهی توانستند تمایز را در سلول‌های مزانشیمی القا نمایند و نتایج تجربه ما نیز با نتایج حاصل از پژوهش‌های آنان سازگار و هم‌سو می‌باشد؛ زیرا زعفران نیز گیاهی دارویی است که دارای اثرات مثبت در حفظ سلول‌ها می‌باشد [۱۶]. Wei و همکاران اثرات تمایزی Catechin (پلی‌فنول استخراج شده از چای سبز) را بر روند تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به استئوبلاست‌ها را بررسی نمودند؛ گزارشات این گروه نشان می‌دهد که این پلی‌فنول توانایی افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز را در گروه سلولی تیمار شده را دارد. بنابراین، می‌توان عنوان نمود که از جمله ترکیبات طبیعی که توانایی القای تمایز را در سلول های مزانشیمی دارند، فنل‌ها می‌باشند که در گیاهان از جمله زعفران به وفور یافت می‌شود [۲۵].

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه بیان‌گر آن است که زعفران و ویتامین D3 هرکدام به‌تنهایی می‌توانند منجر به القای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان موش صحرایی گردند؛ لیکن کاربرد توام آنها باعث اثر سینرژیک افزایش معنی‌دار تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به استئوبلاست‌ها می‌شود.

## تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## References:

[1] Veshkini A, Marjani M, SelkGhaffari M, Moridpour R, An Y. Radiological Evaluation of Rabbit Femoral Defect Healing in Caspian SEASHELL Pellets. ***J Mazandaran Univ Med Sci*** 2007; 17(61): 105-13. [in Persian]

[2] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. ***Biomaterial*** 2006; 27(22): 4079-86.



[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]

[3] Kadivar M, Piryaei F, Ramezani M. Isolation, Culture and Differentiation of Chicken Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. ***Armaghane-danesh***2010; 14(4): 1-11. [in Persian]
[4] Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymalstem cells photoencapsulated in PEG hydrogels. ***J Biomed Mater Res A*** 2004; 68(4): 773-82.
[5] Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. Osteogenic Differentiation Effect of Saffron Aqueous Extract (Crocus sativus L) on Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. ***J BUMS*** 2013; in press.
[6] Tarfiei G, Mahmoodinia-Maymand M, Noruzinia M. The effect of differentiation inducing factors on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. Genetics in the 3rd Millennium, 2010; 7(4): 1864-70.
[7] Nemati Sh, Zare Mehrjerdi N, Baharvand H. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to neural- like cells in vitro. ***Tehran Univ Med J*** 2009;67(8): 527-34.
[8] Fadaei R, Amirizadeh N, Nikougoftar M, Habibi-Roudkenar M. Effect of human hematopoietic stem cells on differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblast cells. ***Sci J Iran Blood Transfus Organ*** 2012; 9(3): 226-38. [in Persian]
[9] Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Eugenio Leone B, et al. Vitamin D3 Affects Differentiation, Maturation, and Function of Human, Monocyte-Derived Dendritic Cells. ***J Immunol*** 2012; 28: 4443-51.
[10] Kianbakht S. A systematic Review on Farmacology of Saffron and its active Constituents. ***J Med Plants*** 2008; 28(4): 1-23, 28.
[11] Nikawa T, Schulz W, Vandenbrink CM, Hanusch M, Vandersaag P, Stahl W, et al. Efficacy of All-trans-β-Carotene, Canthaxanthin, and All-trans, 9-cis-, and 4-Oxoretinoic Acids in Inducing Differentiation of an F9 Embryonal Carcinoma RARβ-lacZ Reporter Cell Line. ***Arch Biochem Biophys*** 1995; 316(2): 665–72.
[12] Gudas LJ, Wagner JA. Retinoids regulate stem cell differentiation. ***J Cell Physiol*** 2011; 226(2): 322–30.
[13] Song I, Kim BS, Kim CS, Im GI. Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2011; 408: 126–31.
[14] Mahmody Z, Solimani M, Saeedy A, Iranshohi M. The effect of ethanol extracts of Galbanum on osteognic proliferation and differentiation human mesenchymal stem cells. ***J Med Plants*** 2013; 12(2): 1-8.
[15] Melnic J, Wang S, Marcone M. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice:Saffron. ***Food Res Int*** 2010; 43(8): 981-1989.
• [16] Ghadrdoosta B, Vafaeia A, Rashidy-oura A, Hajisoltania R, Bandegib A, Motamedic F, Haghighid S, Samenid H, Pahlvan S. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. European Journal of Pharmacology 2011; 667(3) : 30 222–229.
[17] Penna G, Adorini L. a,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. ***J Immunol*** 2000; 164(5): 2405-11.
[18] Baghban-Eslaminejad M, Salami F, Soleimani M, Abnoosi M. Study of BIO (6-Bromoindirubin - 3′-Oxim) Effect on Growth and Bone Differentiation of Rat Marrow-Derived MesenchymalStem Cells. ***J Hamedan Univ*** 2008; 9(3): 5-13. [in Persian]
[19] Khoshchehreh R, Ebrahimi M, Baghban-EslamiNejad M, Aghdami N, Baharvand H. In-vitro Potential of Human Bone Marrow and Umbilical Cord Vein Mesenchymal Stem Cells to Differentiate into Insulin Producing Cells. ***Iran J Endocrinol Metabolism*** 2011; 13(4): 384-97.
[20] Amani M, Amirizadeh N, Soleimani M, Malekan H, Habibi Roudkenar M, Bashtar M. Effect of growth factors of platelet gel on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. ***Sci J Iran Blood Transfus Organ*** 2009; 6(2): 71-83. [in Persian]
[21] Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. ***J Cell Sci*** 2003; 116 (Pt 9): 1827-35.
[22] Trompeter H, Dreesen J, Hermann E, Iwaniuk K. MicroRNAsmiR-26a,miR-26b, and miR-29baccelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. ***BMC Genomics*** 2013; 14: 24-32.
[23] Ashteiani H, Allameh A, Hamied poor N, Rastegar H. Accelerating growth and proliferation of mesenchymal stem cells derived from human samples in the presence Sylmaryn. ***J Med Plants*** 2011; 9(2): 1-9.
[24] Abdullaev FI. Cancer chemopreventive andtumoricidal properties of saffron (Crocus savitus L.). ***Exp Biol Med (Maywood)*** 2002; 227(1): 20-5.
[25] Rahaiee S, Moini S, Hashemi S, Shojaosadati M. Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus*L.): a review. ***J Food Sci Technol*** 2014; in press.

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31 ]