

بررسی نقش اپی ژنتیکی ژن‌های RUNX2 و DLX5 در تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی ناشی از داروی زولدرونیک اسید

مجید فرش دوستی حق^۱، مهرداد نوروزی نیا^{۲*}، یوسف مرتضوی^۳، مسعود سلیمانی^۲، سعید کاویانی^۲،
مریم محمودی نیا میمند^۴

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
- ۴- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۱۲/۱۰

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۰۱

چکیده

هدف: زولدرونیک اسید به عنوان یکی از درمان‌های بیماری استئوپورز در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش دارد. با این حال مکانیسم اثر این دارو در القای تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنوز به خوبی شناخته نشده است. بر این اساس در این تحقیق تأثیر زولدرونیک اسید روی متیلاسیون پروموتور ژن‌های RUNX2 و DLX5 ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی پس از جداسازی و تکثیر، تحت تیمار ضربانی با زولدرونیک اسید با غلظت نهایی ۵ میکرومولار به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند و به مدت ۳ هفته در محیط تمایزی کشت داده شدند. استخراج DNA در هفته‌های اول، دوم و سوم تمایز استئوبلاستیک و همچنین از سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت گرفت. پس از تیمار DNA با سدیم بی سولفیت، آزمایش PCR اختصاصی متیلاسیون با استفاده از آغازگرهای متیله و غیرمتیله به منظور ارزیابی متیلاسیون پروموتور ژن‌های RUNX2 و DLX5 انجام شد.

نتایج: نتایج آزمایش PCR اختصاصی متیلاسیون با آغازگرهای متیله و غیرمتیله برای ژن‌های RUNX2 و DLX5 در سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مثبت بود. بر این اساس وضعیت متیلاسیون ناحیه پروموتوری ژن‌های RUNX2 و DLX5 نشان دهنده متیلاسیون ناکامل است.

نتیجه‌گیری: ژن‌های RUNX2 و DLX5 در تمایز استئوبلاستیک ناشی از داروی زولدرونیک اسید تغییر آرایش متیلاسیون نمی‌دهند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که زولدرونیک اسید به واسطه مکانیسم‌های اپی ژنتیکی به ویژه متیلاسیون پروموتور منجر به تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی نمی‌شود. بر این اساس، مکانیسم اثر داروی زولدرونیک اسید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در القای تمایز می‌تواند یک مسیر مستقل از تغییرات اپی ژنتیکی در این دو ژن باشد.

کلیدواژه‌ها: زولدرونیک اسید، متیلاسیون DNA، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز استئوبلاستی

۱- مقدمه

بافت استخوانی به واسطه حضور و فعالیت چهار نوع سلول استخوانی شامل استئوبلاست (Osteoblast)، استئوسیت (Osteocyte)، استئوکلاست (Osteoclast) و سلول‌های آستری (Lining cells) همواره در حال بازسازی بوده و به عنوان یک بافت پویا و زنده است. بافت‌های جدید استخوانی توسط استئوبلاست‌ها ساخته می‌شوند. این سلول‌ها ماتریکس ارگانیک استخوان را از طریق ترشح تعداد زیادی از پروتئین‌های خارج سلولی سنتز می‌کنند. علاوه بر سنتز ماتریکس خارج سلولی، استئوبلاست‌ها در فرایند زیست‌کانی‌سازی و کنترل عملکرد استئوکلاست‌ها مشارکت دارند. استئوبلاست‌ها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) موجود در مغز استخوان منشأ می‌گیرند. فاکتورهای نسخه‌برداری متعددی در تمایز استئوبلاستی نقش دارند که در این بین فاکتورهای نسخه‌برداری RUNX2 و DLX5 نقش مهمی را ایفا می‌کنند. RUNX2 برای تمایز استئوبلاستی و ریخت‌زایی اسکلتی ضروری بوده و به عنوان داربستی برای اسیدهای نوکلئیک و فاکتورهای تنظیمی دخیل در بیان ژن‌های اسکلتی عمل می‌کند. جهش‌های این ژن با اختلالات تکامل استخوان همراه است [۱]. DLX5 در تکامل استخوان و بهبود شکستگی‌های استخوان نقش داشته و تحقیقات اخیر نشان داده است که DLX5، بیان نشانگرهای زودرس تمایز استئوژنیک را تسریع می‌کند و میزان زیست‌کانی‌سازی بعد از تولد را افزایش می‌دهد [۲، ۳].

MSCs به غیر از استئوبلاست‌ها می‌توانند سایر انواع سلولی همانند کندروسیت، فیبروبلاست، آدیپوسیت و میوبلاست‌ها را نیز تولید کنند [۴، ۵]. شناسایی MSCs به واسطه حداقل ۳ معیار زیر صورت می‌گیرد: (۱) خاصیت چسبندگی به سطوح پلاستیکی در شرایط کشت استاندارد، (۲) وجود نشانگرهای سطحی CD90، CD73، CD105 و عدم وجود نشانگرهای سطحی CD19، CD79α، CD11b، CD14، CD34، CD45 و HLA-DR (Human Leukocyte Antigen DR) در سطح

این سلول‌ها، (۳) قابلیت تمایز به استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروبلاست در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) [۶]. امروزه MSCs به دلیل توانایی تمایز به چندین رده سلولی و همچنین در دسترس بودن آن‌ها، سلول‌های مهمی در پزشکی ترمیمی و سلول درمانی محسوب می‌شوند [۷-۹]. در عین حال، مکانیسم‌های کنترلی تمایز و تکثیر MSCs به رده‌های مختلف سلولی همانند استئوبلاست‌ها هنوز به خوبی شناخته نشده است. زولدرونیک اسید (Zoledronic Acid) یک آمینو بی‌فسفونات است که برای پیشگیری از شکستگی‌های اسکلتی در بیماران مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سال ۲۰۰۷، اداره غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration: FDA) مجوز استفاده از این دارو برای درمان استئوپوروز (Osteoporosis) در زنان یائسه را صادر کرد. تحقیقات نشان داده است که مصرف زولدرونیک اسید میزان شکستگی مهره‌ها را به شدت کاهش می‌دهد و چگالی استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۰]. تأثیر ضربانی زولدرونیک اسید به مدت ۳ ساعت منجر به القا نشانگرهای استئوژنیک در hMSC می‌شود که با تسریع تمایز MSCs به استئوبلاست همراه است [۱۱]. در عین حال، مکانیسم اثر داروی زولدرونیک اسید به طور کامل شناخته شده نیست. بنابراین بررسی تأثیر داروی زولدرونیک اسید برای درمان استئوپوروز با رویکرد شناخت تأثیرات اپی ژنتیکی آن‌ها، می‌تواند راه کارهای مناسبی جهت درک مکانیسم اثر دارو و درمان مناسب برای بیماری‌های استخوانی به ویژه استئوپوروز ارائه دهد.

یکی از مکانیسم‌های کنترل بیان ژن، فرایندهای اپی ژنتیکی است که شامل متیلاسیون DNA اغلب در نواحی پروموتور ژن‌ها و پیرایش‌های هیستونی اعم از استیلاسیون، داستیلاسیون، متیلاسیون، فسفوریلاسیون و ... است. تحقیقات متعددی نشان داده است که تغییرات اپی ژنتیکی به عنوان یکی از مکانیسم‌های مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی است [۱۲، ۱۳]. تحقیقات گروه ما توانسته است از نقش اپی ژنتیکی ژن Receptor Orphan ROR2 (Receptor tyrosine kinase 2) در تمایز استئوبلاستی پرده

بردارد [۱۴]. تغییرات اپی‌ژنتیکی به علت قابلیت تغییر در مقایسه با تغییرات ژنتیکی هدف‌های مناسب‌تری در ایجاد درمان‌های جدید است. در عین حال این پدیده‌ها می‌تواند بسیاری از خصوصیات پدیده‌های ژنتیکی مانند توارث، تغییر عملکرد ژن‌ها و غیره را شبیه‌سازی کند [۱۵]. تحقیقات اخیر اهمیت متیلاسیون اختصاصی ژن‌ها (Gene Specific Methylation) در فرایندهای سلولی همانند تمایز را نشان می‌دهد. بنابراین تعیین وضعیت متیلاسیون ژن‌های اختصاصی در تمایز استئوبلاستیک همانند RUNX2 و DLX5 در طول تمایز MSCs تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید داری اهمیت خواهد بود.

هدف از تحقیق حاضر شناخت بیشتر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مؤثر در تمایز MSCs به استئوبلاست تحت تیمار با داروی زولدرونیک اسید است. بنابراین وضعیت متیلاسیون ژن‌های RUNX2 و DLX5 در طول تمایز استئوبلاستیک MSCs تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید با استفاده از روش PCR اختصاصی متیلاسیون (Methylation Specific PCR: MSP) بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و کشت MSCs

حدود ۱۰ میلی‌لیتر از مغز استخوان انسانی پس از کسب رضایت از یک اهدا کننده سالم که از بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهیه شده بود در یک لوله هپارینه به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد. جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول و ساتریفوژ شیب غلظتی صورت گرفت. سلول‌های تک هسته‌ای بعد از شستشو با بافر HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) در فلاسک کشت سلول T75 به همراه ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-low glucose (Gibco) و ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) در انکوباتور ۳۷ درجه

سانتی‌گراد با دی اکسید کربن ۵ درصد به مدت یک شب (Overnight) کشت داده شدند [۱۶]. سلول‌های تک هسته‌ای قبل از کشت شمارش شده و درصد زنده بودن (Viability) آن‌ها مشخص شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از مخلوط سلولی با ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو (Trypan Blue) مخلوط شده و با لام نئوبار شمارش شدند. روز بعد محیط کشت از فلاسک خالی شده و سلول‌های چسبیده به سطح فلاسک سه بار با ۲۰ میلی‌لیتر بافر PBSA (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند. محیط سلول‌های چسبیده تعویض شده و تا یک هفته کشت داده شدند تا به هم‌شاری (Confluency) ۶۰-۷۰ درصد رسیده و سپس با تریپسین (Trypsin) جدا شده و پاساژ داده شدند. تمایز استئوبلاستیک MSCs در پاساژ ۲-۳ انجام شد. برای تهیه محیط تمایزی استئوبلاستی از محیط کشت عمومی DMEM، L-گلوتامین و ۱۰ درصد FBS استفاده شد که به این محیط کشت فاکتورهای دگزامتازون (Dexamethasone) با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار، بتا-گلیسرول فسفات با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار و آسکوربات-۲ فسفات با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. MSCs استخراج شده برای تأیید ماهیت، فلوسیتومتری شدند [۱۷].

۲-۲- تیمار MSCs با زولدرونیک اسید

داروی زولدرونیک اسید در ویال حاوی ۴ میلی‌گرم پودر زولدرونیک اسید از شرکت دارویی Novartis تهیه شد. این دارو محلول در آب بوده و همچنین قابلیت انحلال در محیط کشت را نیز دارد. برای تیمار ضربانی (Pulse Treatment) از غلظت نهایی ۵ میکرومولار در محیط کشت استفاده شد. برای القای تمایز استئوبلاستی، hMSC در فلاسک‌های T75 کشت داده شدند. بعد از اینکه سلول‌ها به هم‌شاری ۳۰-۴۰ درصد رسیدند، تحت تیمار ضربانی با ۵ میکرومولار داروی زولدرونیک اسید به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند [۱۱]. سپس محیط کشت تحلیه شده و با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شد. در نهایت محیط تمایزی روی آن‌ها اضافه شد

و به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. علاوه بر سلول‌های تیمار شده با زولدرونیک اسید، MSCs بدون تیمار به عنوان کنترل کشت داده شدند.

۲-۳- رنگ آمیزی آلیزارین قرمز (Alizarin Red)

برای تأیید تمایز استئوبلاستی از رنگ آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. بدین منظور MSCs در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. گروهی از سلول‌ها با زولدرونیک اسید تیمار شدند و گروهی هم به عنوان کنترل بدون تیمار کشت داده شدند. رنگ آمیزی آلیزارین قرمز در روز ۲۱ کشت انجام گرفت. برای این منظور محیط کشت تخلیه شد و سلول‌ها با PBS شستشو شدند. سپس سلول‌ها با فرمالدهید ۴۰ درصد تثبیت شده و مجدداً با PBS شستشو شدند. در نهایت رنگ آلیزارین قرمز ۱ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم ارزیابی شدند.

۲-۴- استخراج DNA

MSC DNA ها و MSC های تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید در هفته اول، دوم و سوم با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Roche براساس برنامه پیشنهادی کیت استخراج شدند. به طور خلاصه، سلول‌ها تریپسینه شده و پس از شستشو در ۲۰۰ میکرولیتر، PBS سوسپانسیون شدند. از هر فلاسک T75 حدود 3×10^6 سلول استحصال شد. ۲۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی (Binding) و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شده و به فیلتر تیوب منتقل شد و سانتریفوژ شد. فیلتر تیوب یک مرحله با بافر ممانعت کننده و ۲ مرحله با بافر شستشو، شستشو داده شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر بافر الوشن (Elution) اضافه و سانتریفوژ شد و بدین ترتیب استخراج DNA انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز

روی ژل آگارز بررسی شد. مقدار DNA استخراج شده به واسطه جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. خلوص DNA استخراج شده از طریق نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

۲-۵- تیمار DNA با سدیم بی سولفیت و آنزیم Sss1

قبل از انجام MSP، DNA استخراج شده با سدیم بی سولفیت (Sodium Bisulfite: SBS) تیمار شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر DNA (حدود ۱ میکروگرم) به ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد و ۵/۵ میکرولیتر NaOH ۲ مولار به آن افزوده و ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به ترتیب ۳۰ میکرولیتر هیدروکینون ۱۰ میلی مولار تازه تهیه شده و ۵۲۰ میکرولیتر سدیم بی سولفیت ۳ مولار تازه تهیه شده به تیوب اضافه شد و در نهایت به کمک روغن معدنی سطح محلول پوشانده شد. سپس ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. DNA با استفاده از کیت Roche از محلول استخراج و در این مرحله دسولفوناسیون (Desulfonation) روی DNA انجام شد. برای این منظور ۲۲ میکرولیتر از هیدروکسید سدیم ۳ مولار به آن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس DNA به روش اتانول استات آمونیوم رسوب کرده و در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شد.

برای تهیه DNA متیله به عنوان کنترل مثبت از آنزیم Sss1 شرکت New England Biolabs براساس برنامه پیشنهادی کیت استفاده شد [۱۸]. بدین منظور ۶ میکرولیتر DNA خون محیطی به همراه ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر S-آدنوزیل متیونین ۳۲ میلی مولار، ۲ میکرولیتر آنزیم Sss1 با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید. مخلوط متیلاسیون به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس DNA متیله با استفاده از کیت، استخراج شد. DNA متیله حاصل به عنوان کنترل مثبت در MSP با آغازگر متیله (M) استفاده شد.

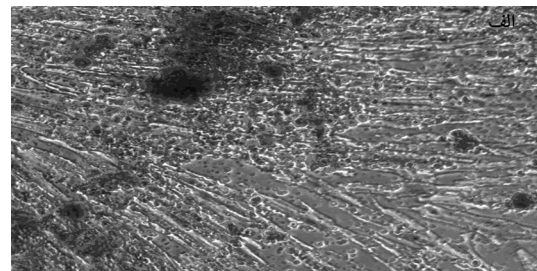
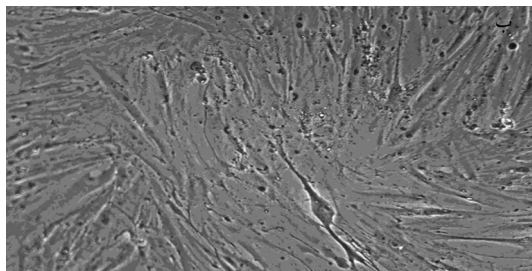
MSP - ۶-۲

MSP با استفاده از آغازگرهای اختصاصی متیله (M) و غیرمتیله (U) که قادر به تشخیص DNA متیله و غیرمتیله هستند، روی DNA استخراج شده از نمونه‌های به‌دست آمده از MSCs در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید، به‌صورت سه‌گانه (Triplicate) انجام شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار بر خط Methprimer صورت

گرفت [۱۹]. آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص متیلاسیون در جدول ۱ آورده شده است. مخلوط واکنش PCR محتوی بافر ۱۰X، مخلوط dNTP (هر کدام ۱/۲۵ میلی‌مولار)، آغازگرها (۰/۵ میکرومولار)، $MgCl_2$ ۲ میلی‌مولار، Dimethyl DMSO (۱/۲۵ Sulfoxide) ۴-۱ درصد، واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentase) و DNA تیمار شده با SBS (۵۰ نانوگرم) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای M و U ژن RUNX2 و DLX5

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه باند (جفت‌باز)
RUNX2	RUNX2MF	TTTCGGAAATTGTATACGGCGC	۹۳
	RUNX2MR	AACAACGAATCTCGAACCTACG	
	RUNX2UF	GGTTTGGAAATTGTATATGGTGT	۹۶
	RUNX2UR	AAACAACAAATCTCAAACCTACA	
DLX5	DLX5MF	TTGGGGAATAAAGGTATACGTTATC	۱۵۰
	DLX5MR	ACATAACTTCTTAACGATAAACCGC	
	DLX5UF	GGGGAATAAAGGTATATGTTATTGG	۱۴۷
	DLX5UR	CATAACTTCTTAACAATAAACACACA	



شکل ۱ رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز؛ الف) سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با زولدرونیک اسید در روز ۲۱ تمایز، ب) MSC ها

۳- نتایج

۳-۱- تأیید تمایز استئوبلاستیک با رنگ‌آمیزی آلزارین

قرمز

رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز رسوب توده‌های کلسیمی را که در این رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز دیده می‌شوند، در سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با زولدرونیک اسید (روز ۲۱ تمایز) نشان داد (شکل ۱، الف). مشاهده رسوب توده‌های کلسیمی تأییدی بر تمایز استئوبلاستیک MSCs است. در

حالی که MSCs برای این رنگ‌آمیزی منفی بودند و هیچ‌گونه رسوب کلسیم در آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۱، ب).

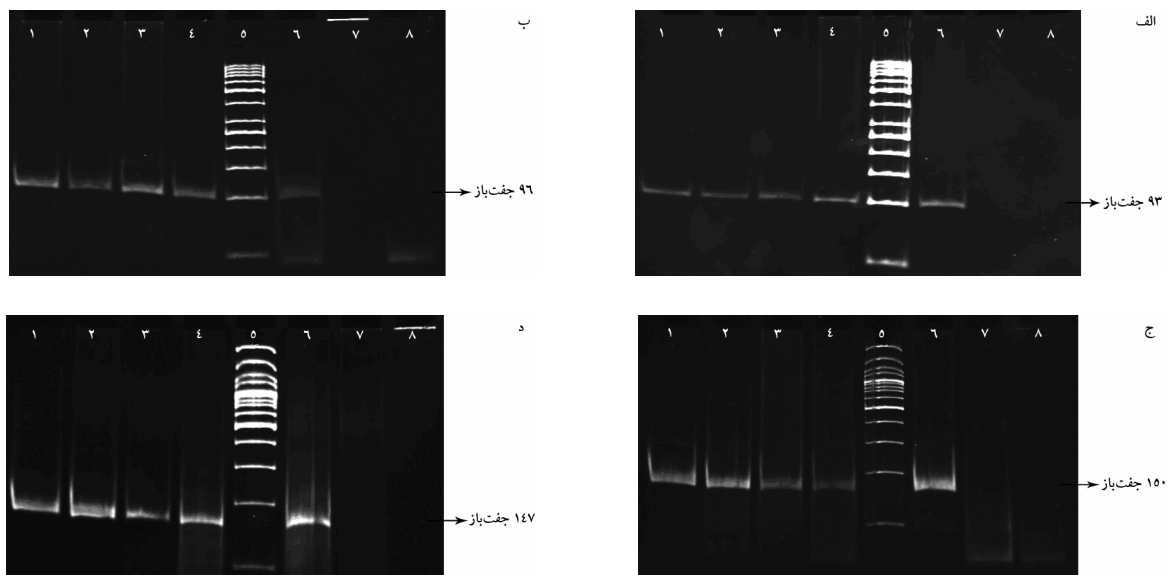
۳-۲- وضعیت متیلاسیون RUNX2 و DLX5

در تمایز استئوبلاستیک MSCs تیمار شده با زولدرونیک اسید

داروهای متعددی به‌واسطه مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی همانند تغییر متیلاسیون ژنوم، پیرایش‌های هیستونی و غیره اعمال اثر

نشده است. بر این اساس در این تحقیق تأثیر داروی زولدرونیک اسید روی متیلاسیون پرموتر ژنهای RUNX2 و DLX5 ارزیابی شد. در این تحقیق مشخص شد که الگوی متیلاسیون ژنهای RUNX2 و DLX5 در طول تمایز استئوبلاستیک MSCs تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید در سلولهای تمایز یافته استئوبلاستی و MSCs مشابه است. در این الگو ناحیه پرموتر ژنهای RUNX2 و DLX5 در وضعیت متیلاسیون ناقص قرار دارند. نتایج MSP با آغازگرهای M و U برای ژنهای RUNX2 و DLX5 در سلولهای تمایز یافته استئوبلاستی و MSCs مثبت بود (شکل ۲).

می‌کند. پیتروسکا (Piotrowska) و همکارانش نشان دادند که تریکوآستاتین A (Trichostatin A)، سدیم بوتیرات (Sodium Butyrate)، ۵-آزا-۲-داکسی سیتیدین (5-Aza-2'-deoxycytidine) به واسطه تغییرات اپی ژنتیکی منجر به افزایش بیان گیرنده α گلوکوکورتیکوئیدی در بدخیمی‌های خونی و بیماری‌های خود ایمن می‌شوند [۲۰]. میلوتینوویچ (Milutinovic) و همکارانش نشان دادند که داروی والپروات (Valproate) در درمان اپی لپسی (Epilepsy) و میگرن با تغییر استیلاسیون هیستون‌ها و متیلاسیون ژنهای خاص اعمال اثر می‌کند [۲۱]. از طرفی مکانیسم اثر داروی زولدرونیک اسید در القای تمایز استئوبلاستیک MSCs هنوز به خوبی شناخته



شکل ۲ نتایج MSP با آغازگرهای M (متیله) و U (غیرمتیله) بر روی ژنهای RUNX2 و DLX5: الف) ژن RUNX2 آغازگر متیله؛ ب) ژن RUNX2 آغازگر غیرمتیله؛ ج) ژن DLX5 آغازگر متیله؛ د) ژن DLX5 آغازگر غیرمتیله؛ ستون ۱) MSC تیمار نشده، ستون ۲) MSC تیمار شده بعد از یک هفته، ستون ۳) MSC تیمار شده بعد از دو هفته، ستون ۴) MSC تیمار شده بعد از سه هفته، ستون ۵) مربوط به Ladder، ستون ۶) کنترل مثبت، ستون ۷) DNA تیمار نشده، ستون ۸) کنترل منفی

مردان بالای ۵۰ سال در معرض ابتلا به استئوپوروز قرار دارند. این عارضه سالانه هزینه‌های درمانی بسیار بالایی را به خود اختصاص می‌دهد. درمان‌های رایج استئوپوروز به واسطه مهار بازجذب استخوان از طریق مهار تمایز استئوکلاست‌ها و

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های استخوانی، استئوپوروز است. استئوپوروز به واسطه کاهش توده استخوانی و افزایش شکنندگی استخوان‌ها مشخص می‌شود. ۵۰ درصد زنان و ۲۰ درصد

فعالیت آن‌ها صورت می‌گیرد. اما این‌گونه درمان‌ها تنها بازجذب استخوان را مهار کرده و نمی‌توانند منابع استخوانی از دست رفته را احیا کنند. از سوی دیگر، داروهایی توسعه پیدا کرده است که مکانیسم اثر آن‌ها به واسطه افزایش استخوان‌سازی و مهار فعالیت استئوکلاست‌ها است. بنابراین استفاده از این گونه داروها و شناخت مکانیسم‌های اثر آن بر تمایز استئوبلاستی اهمیت دارد.

بی‌فسفونات‌ها آنالوگ‌های پیروفسفاتی هستند که به فسفات کلسیم باند می‌شوند و به عنوان عواملی قوی و مؤثر بر تجزیه استخوانی عمل می‌کنند. کلودرونات بی‌فسفونات (Clodronate Bisphosphonates) غیرنیتروژنه نسل اول است. سایر بی‌فسفونات‌ها عبارت‌اند از پامیدرونات (Pamidronate)، آلندرونات (Alendronate)، ایباندرونات (Ibandronate)، ریزدرونات (Risedronate) و زولدرونیک اسید که در بین این عوامل، زولدرونیک اسید نسبت به سایر عوامل قوی‌تر است. اسید زولدرونیک یک اسید بی‌فسفونات منوهیدرات است که به نام شیمیایی ۱-هیدروکسی-۲-ایمیدازول-۱-یل-فسفونواتیل شناخته می‌شود [۲۲]. مکانیسم اولیه شناخته شده برای عملکرد بی‌فسفونات‌ها این بود که بی‌فسفونات‌ها در ماتریکس زیست‌کانی شده استخوان تجمع می‌یابند و آن را در مقابل تجزیه توسط استئوکلاست‌ها مقاوم می‌کنند. اما با گذشت زمان آثار مولکولی و سلولی این دارو بر استئوکلاست‌ها مشخص شد. بی‌فسفونات‌های نیتروژن‌دار، مکانیسم اثر منحصر به فردی دارند که به توانایی آن‌ها در مهار مسیر سنتز موالونات (Mevalonate) مربوط می‌شود [۲۳-۲۶]. برخلاف داروهای نسل اول این رده که به آنالوگ‌های سیتوتوکسیک آدنوزین تری فسفات متابولیزه می‌شوند، بی‌فسفونات‌های نیتروژن‌دار، فعالیت فARNسیل دی فسفات سنتاز (Farnesyl Diphosphate Synthase) را که آنزیم کلیدی مسیر موالونات است، مهار می‌کند. مسیر موالونات مسئول بیوسنتز کلسترول، سایر استرول‌ها و لیپیدهای ایزوپرنوئید است. ترکیبات اخیر برای پرنیلاسیون (Prenylation) آنزیم‌های کوچک همانند GTPase ها مورد نیاز است.

پرنیلاسیون این آنزیم‌ها منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شود. این آنزیم‌ها فرایندهای متعدد داخل سلولی را که برای ریخت‌شناسی، عملکرد و بقای استئوکلاست‌ها ضروری هستند را تنظیم می‌کند. این فرایندها شامل پاسخ به محرک‌هایی همانند نظم اسکلت سلولی، چین‌خوردگی غشایی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) می‌شود [۲۷، ۲۸]. در نتیجه عملکرد استئوکلاست‌ها مختل شده و منجر به آثار توقف رشد و تکثیر سلولی می‌شود و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در استئوکلاست‌ها القا می‌کند [۲۴].

زولدرونیک اسید دارای دومین اتم نیتروژن در حلقه ایمیدازول بوده و قوی‌ترین بی‌فسفونات شناخته شده تا به حال است. این دارو برای پیشگیری از شکستگی‌های اسکلتی در بیماران مختلف استفاده می‌شود. در سال ۲۰۰۷، FDA مجوز استفاده از این دارو برای درمان استئوپوروز در زنان یائسه را صادر کرد. زولدرونیک اسید پتانسیل و ویژگی‌های فارماکولوژیک بالاتری نسبت به سایر بی‌فسفونات‌ها دارد. تحقیقات مختلف مکانیسم‌های اثر متعددی را برای زولدرونیک اسید روی استئوکلاست‌ها عنوان کرده است که عبارتند از مهار بلوغ استئوکلاست‌ها، مهار فراخوانی استئوکلاست‌ها به موضع بازجذب استخوان، مهار عملکرد استئوکلاست‌های بالغ [۲۹]، کاهش تولید سیتوکین‌ها همانند اینترلوکین ۱ (Interleukin 1: IL-1)، فعالیت ضد توموری مستقیم (متوقف کننده رشد و تکثیر سلولی و سلول‌کشی) [۳۰-۳۲]، مهار انتشار، مهاجم و چسبندگی به ماتریکس استخوانی سلول‌های توموری [۳۳].

تحقیقات اخیر نشان داده است که زولدرونیک اسید علاوه بر مهار استئوکلاست‌ها، می‌تواند منجر به تمایز MSCs به استئوبلاست‌ها شود ولی مکانیسم اثر این دارو بر MSCs و استئوبلاست‌ها به خوبی شناخته نشده است. مصرف زولدرونیک اسید میزان شکستگی مهره‌ها را به شدت کاهش می‌دهد و چگالی استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۰]. تحقیقات نشان داده است که بیان ژن‌های شاخص استئوژنیک (Osteogenic Index) همانند استئوکالسن (Osteocalcin) و استئوپونتین (Osteopontin) به دوز داروی زولدرونیک اسید

بستگی دارد؛ به طوری که با کاهش دوز داروی زولدرونیک اسید بیان استئوکلسین و استئوپونتین در طول تمایز استئوبلاستیک کاهش پیدا می کند [۳۴]. تحقیق دیگری نشان داد زولدرونیک اسید نشانگرهای ساخت و ساز استخوانی و چگالی استخوان را در بیماران بتا-تالاسمی (Beta-Thalassemia) مبتلا به استئوپورز بهبود می بخشد [۳۵]. درمان کوتاه مدت با زولدرونیک اسید چگالی استخوانی و پیشتازهای فیبروبلاستیک مغز استخوان را بعد از پیوند هم گونه (Autologus Transplantation) سلول بنیادی افزایش می دهد [۳۶]. زولدرونیک اسید در غلظت های ۲۰ و ۵۰ میکرومولار در شرایط آزمایشگاهی برای مدت بیش از ۲۴ ساعت منجر به مهار تکثیر و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی MSC می شود. در حالی که تأثیر ضربانی آن برای ۳ تا ۶ ساعت در غلظت ۵ میکرومولار و سپس کشت به مدت ۲ هفته تحت شرایط استئوژنیک منجر به حفظ نشانگرهای استئوژنیک در hMSC می شود [۱۱].

در تحقیق حاضر پس از تیمار MSCs با داروی زولدرونیک اسید، وضعیت متیلاسیون پروموتور RUNX2 و DLX5 به منظور بررسی مکانیسم تأثیر دارو ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تیمار با زولدرونیک اسید هرچند موجب تمایز MSCs به استئوبلاست می شود، وضعیت متیلاسیون پروموتور RUNX2 و DLX5 در طول تمایز استئوبلاستیک MSCs را تغییر نمی دهد. در حالی که تحقیقات نشان داده است که بیان این فاکتورهای نسخه برداری در طول تمایز استئوبلاستی

افزایش می یابد [۱]. این نتایج می تواند نمایانگر آن باشد که داروی زولدرونیک اسید به واسطه مکانیسم های اپی ژنتیکی به ویژه متیلاسیون پروموتور منجر به تمایز استئوبلاستیک MSCs نمی شود. مکانیسم اثر داروی زولدرونیک اسید در القای تمایز MSCs می تواند یک مسیر مستقل از متیلاسیون ژن های RUNX2 و DLX5 باشد. از طرفی، تحقیقات اخیر نشان داده است که مهار مسیر مولونات در سلول های بنیادی رویانی (Embryonic Stem Cells: ESC) قدرت خود بازسازی این سلول ها را به واسطه مهار پر نیلاسیون پروتئین Rho GTPase مهار می کند. این امر نشان می دهد که مهار مسیر مولونات در ESC با مهار تکثیر همراه است [۳۷]. مهار این مسیر می تواند یکی از مکانیسم های پیشنهادی اثر داروی زولدرونیک اسید باشد.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه دکتری رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از نمایندگی شرکت Novartis و آقای دکتر جعفری به دلیل تأمین داروی زولدرونیک اسید و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و سلول های بنیادی صارم به دلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه و بعضی مواد نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

۶- منابع

- [1] Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. Birth Defects Res C Embryo Today 2005; 75(3): 213-25.
- [2] Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5. Development 1999; 126(17): 3795-809.
- [3] Zhang J, Zhu J, Valverde P, Li L, Pageau S, Tu Q, Nishimura R, Yoneda T, Yang P, Zheng W, Ma W, Chen J. Phenotypic analysis of Dlx5 overexpression in post-natal bone. J Dent Res 2008; 87(1): 45-50.

- [4] Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1195-201.
- [5] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226(6): 507-20.
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- [7] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 2006; 39(4): 678-83.
- [8] Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(4): 435-41.
- [9] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4): 568-84.
- [10] Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR; HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356(18): 1809-22.
- [11] Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, Eulert J, Jakob F. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone* 2009; 44(5): 858-64.
- [12] Ezura Y, Sekiya I, Koga H, Muneta T, Noda M. Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2009; 60(5): 1416-26.
- [13] Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, Baek KH, Kim CC, Rhyu MG. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem* 2007; 102(1): 224-39.
- [14] Tarfeei GA, Noruzinia M, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M, Farshdousti Hagh M, Pujol P. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *CJY*, In Press.
- [15] Whitelaw NC, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18(3): 273-9.
- [16] Freshney RI, Stacey GN, Auerbac JM. *Culture of Human Stem Cells*. 2007, New York: John Wiley & Sons, Inc. p: 45-90.
- [17] Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirzadeh N, Jazayeri M. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-

- dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(2): 278-87.
- [18] CpG Methyltransferase (M.SssI). <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0226.asp>
- [19] MethPrimer-Design Primers for Methylation PCRs. <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>
- [20] Piotrowska H, Jagodzinski PP. Trichostatin A, sodium butyrate, and 5-aza-2'-deoxycytidine alter the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in Hut-78 T- and Raji B-lymphoma cell lines. *Biomed Pharmacother* 2007; 61(7): 451-4.
- [21] Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 2007; 28(3): 560-71.
- [22] Green JR, Müller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994; 9(5): 745-51.
- [23] Russell RG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporos Int* 1999; 9(2): S66-80.
- [24] Russell RG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Croucher PI, Shipman C, Fleisch HA. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res* 1999; 14 Suppl 2: 53-65.
- [25] Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4): 581-9.
- [26] Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000; 88(12 Suppl): 2961-78.
- [27] Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 241-69.
- [28] Oliff A. Farnesyltransferase inhibitors: targeting the molecular basis of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1423(3): C19-30.
- [29] Evans CE, Braidman IP. Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro. *Bone Miner* 1994; 26(2): 95-107.
- [30] Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 1998; 12(2): 220-9.
- [31] Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res* 2000; 15(11): 2211-21.
- [32] Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000; 82(8): 1459-68.
- [33] Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaissé JM, Clézardin P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone

- metastases. *Cancer Res* 2000; 60(11): 2949-54.
- [34] Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999; 74(4): 616-27.
- [35] Perifanis V, Vyzantiadis T, Tziomalos K, Vakalopoulou S, Garipidou V, Athanassiou-Metaxa M, Harsoulis F. Effect of zoledronic acid on markers of bone turnover and mineral density in osteoporotic patients with beta-thalassaemia. *Ann Hematol* 2007; 86(1): 23-30.
- [36] Tauchmanová L, Ricci P, Serio B, Lombardi G, Colao A, Rotoli B, Selleri C. Short-term zoledronic acid treatment increases bone mineral density and marrow clonogenic fibroblast progenitors after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2): 627-34.
- [37] Lee MH, Cho YS, Han YM. Simvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibiting RhoA geranylgeranylation. *Stem Cells* 2007; 25(7): 1654-63.