مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۱: از ۵۹-۶۹
بهار ۱۳۹۰

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

مجید فرش‌دوستی‌حق[۱]، مهرداد نوروزی‌نیا[۲*]، یوسف مرتضوی[۳]، مسعود سلیمانی[۲]، سعید کاویانی[۲]، مریم محمودی‌نیا میمند[٤]

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

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۰۱ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۲/۱۰

## چکیده

**هدف:** زولدرونیک اسید به‌عنوان 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 به‌خوبی شناخته نشده است. بر این اساس در این تحقیق تأثیر زولدرونیک اسید روی متیلاسیون پروموتر 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 به‌مدت ۳ ساعت قرار گرفتند و به‌مدت 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 بی‌سولفیت، آزمایش PCR اختصاصی متیلاسیون با استفاده از آغازگرهای متیله و غیرمتیله به‌منظور ارزیابی متیلاسیون پروموتر 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 پروموتری 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 به‌واسطه مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی به‌ویژه متیلاسیون پروموتر منجر به تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانیشیمی نمی‌شود. بر این اساس، مکانیسم اثر داروی زولدرونیک اسید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در القای تمایز می‌تواند یک مسیر مستقل از تغییرات اپی‌ژنتیکی در این دو ژن باشد.

**کلیدواژگان:** زولدرونیک اسید، متیلاسیون DNA، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایزاستئوبلاستی

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱۶
Email: noruzinia@modares.ac.ir



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

## ۱- مقدمه

بافت استخوانی به‌واسطه 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 به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 [٤، ٥]. شناسایی MSCs به‌واسطه حداقل ۳ معیار زیر صورت می گیرد: ۱) خاصیت چسبندگی به سطوح پلاستیکی در شرایط کشت استاندارد، ۲) وجود نشانگرهای سطحی CD105، CD73، CD90 و عدم وجود نشانگرهای سطحی CD45، CD34، CD14، CD11b، CD79α، CD19 و HLA-DR (Human Leukocyte Antigen DR) در سطح این سلول‌ها، ۳) قابلیت تمایز به استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروبلاست در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) [٦]. 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 به‌خوبی 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 استئوپورز (Osteoporosis) در زنان یائسه را صادر کرد. تحقیقات نشان داده است که مصرف زولدرونیک اسید میزان شکستگی مهره‌ها را به‌شدت کاهش می‌دهد و چگالی استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۰]. تأثیر ضربانی زولدرونیک اسید به‌مدت 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 به‌طور کامل شناخته شده نیست. بنابراین بررسی تأثیر داروی زولدرونیک اسید برای درمان استئوپورز با رویکرد شناخت تأثیرات اپی‌ژنتیکی آن‌ها، می‌تواند راه‌کارهای مناسبی جهت درک مکانیسم اثر دارو و درمان مناسب برای بیماری‌های استخوانی به‌ویژه استئوپورز ارایه دهد.

یکی از مکانیسم‌های کنترل بیان ژن، فرایندهای اپی‌ژنتیکی 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 اپی‌ژنتیکی به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی است [۱۲، ۱۳]. تحقیقات گروه ما توانسته است از نقش اپی‌ژنتیکی ژن ROR2 (Receptor Orphan Receptor tyrosine kinase 2) در تمایز استئوبلاستی پرده



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

بردارد [۱٤]. تغییرات اپی‌ژنتیکی به علت قابلیت تغییر در مقایسه با تغییرات ژنتیکی هدف‌های مناسب‌تری در ایجاد درمان‌های جدید است. در عین حال این پدیده‌ها می‌توانند 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 سانتریفوژ شیب غلظتی صورت گرفت. سلول‌های تک هسته‌ای بعد از شستشو با بافر HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) در فلاسک کشت سلول T75 به‌همراه ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشتDMEM-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 به‌مدت یک شب (Overnight) کشت داده شدند [۱٦]. 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 چسبنده به سطح فلاسک سه بار با ۲۰ میلی‌لیتر بافر PBSA (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند. محیط سلول‌های چسبنده تعویض شده و تا یک هفته کشت داده شدند تا به هم‌شاری (Confluency) ٦۰-۷۰ 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 ٤ 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 ۳۰-٤۰ درصد رسیدند، تحت تیمار ضربانی با ۵ میکرومولار داروی زولدرونیک اسید به‌مدت ۳ ساعت قرار گرفتند [۱۱]. سپس محیط کشت تخلیه شده و با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شد. در نهایت محیط تمایزی روی آن‌ها اضافه شد



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

و به‌مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. علاوه بر سلول‌های تیمار شده با زولدرونیک اسید، MSCs بدون تیمار به‌عنوان کنترل کشت داده شدند.

## ۲-۳- رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز (Alizarin Red)

برای تأیید تمایز استئوبلاستی از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. بدین منظور MSCs در پلیت‌های ٦ خانه‌ای کشت داده شدند. گروهی از سلول‌ها با زولدرونیک اسید تیمار شدند و گروهی هم به‌عنوان کنترل بدون تیمار کشت داده شدند. رنگ‌آمیزی 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 ٤٠ درصد تثبیت شده و مجدداً با PBS شستشو شدند. در نهایت رنگ آلیزارین قرمز ۱ درصد اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم ارزیابی شدند.

## ۲-٤- استخراج DNA

DNA MSCها و MSCهای 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. به‌طور خلاصه، سلول‌ها ترپیسینه شده و پس از شستشو در ۲۰۰ میکرولیتر، PBS سوسپانسیون شدند. از هر فلاسک T75 حدود $3-4\times10^{6}$ سلول استحصال شد. ۲۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی (Binding) و ٤٠ 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 به‌واسطه جذب در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. خلوص DNA استخراج شده از طریق نسبت جذب در طول موج ۲٦۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

## ۲-۵- تیمار DNA با سدیم بی‌سولفیت و آنزیم Sss1

قبل از انجام MSP، DNA استخراج شده با سدیم بی‌سولفیت (Sodium Bisulfite: SBS) تیمار شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر DNA (حدود ۱ میکروگرم) به ٤٠ 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. به‌ترتیب ۳۰ میکرولیتر هیدروکینون ۱۰ میلی‌مولار تازه تهیه شده و ۵۲۰ میکرولیتر سدیم بی‌سولفیت ۳ مولار تازه تهیه شده به تیوب اضافه شد و در نهایت به کمک روغن معدنی سطح محلول پوشانده شد. سپس ۱٦ 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 به‌مدت 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 به‌عنوان کنترل مثبت از آنزیم Sss1 شرکت New England Biolabs براساس برنامه پیشنهادی کیت استفاده شد [۱۸]. بدین منظور ٦ میکرولیتر DNA خون محیطی به همراه ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر S-آدنوزیل متیونین ۳۲ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر آنزیم Sss1 با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید. مخلوط متیلاسیون به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس DNA متیله با استفاده از کیت، استخراج شد. DNA متیله حاصل به‌عنوان کنترل مثبت در MSP با آغازگر متیله (M) استفاده شد.



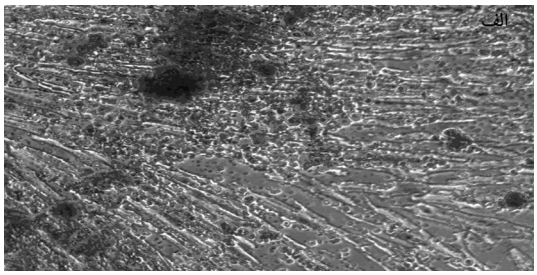
[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

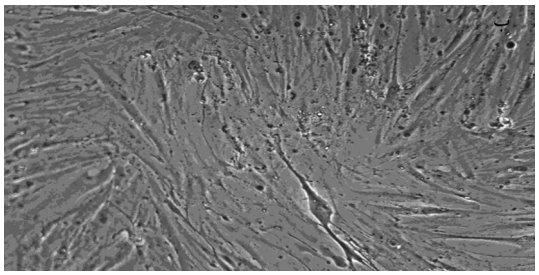
### MSP -۲-۶

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، ۱٤ 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، DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ۱-٤ درصد، ۱/۲۵ 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 | GGTTTTGGAAATTGTATATGGTGT | ۹٦ |
| | RUNX2UR | AAACAACAAATCTCAAACCTACA | |
| **DLX5** | DLX5MF | TTGGGGAATAAAGGTATACGTTATC | ۱۵۰ |
| | DLX5MR | ACATAACTTCTTAACGATAAACCGC | |
| | DLX5UF | GGGGAATAAAGGTATATGTTATTGG | ۱٤۷ |
| | DLX5UR | CATAACTTCTTAACAATAAACCACA | |




**شکل ۱** رنگ‌آمیزی آلیزارین 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 آلیزارین قرمز

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

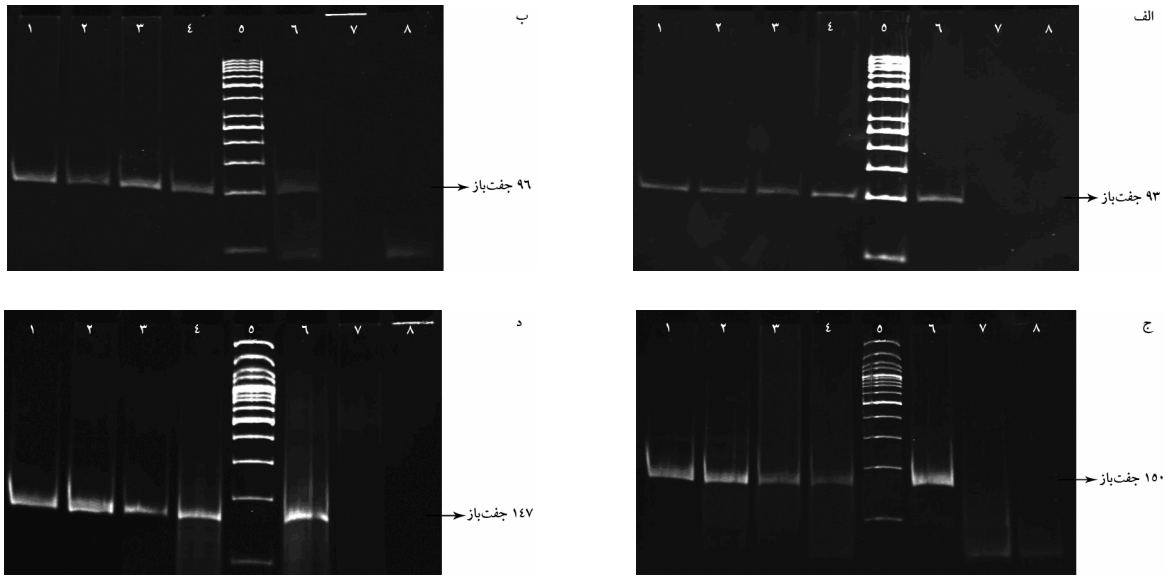
### ۳-۲- وضعیت متیلاسیون RUNX2 و DLX5 در تمایز استئوبلاستیک MSCs تیمار شده با زولدرونیک اسید

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



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

می‌کند. پیتروسکا (Piotrowska) و همکارانش نشان دادند که تریکواستاتین A (Trichostatin A)، سدیم بوتیرات (Sodium Butyrate)، ۵-آزا-۲ داکسی سیتیدین (5-Aza-2'-deoxycytidine) به‌واسطه تغییرات اپی‌ژنتیکی منجر به افزایش بیان گیرنده α گلوکوکورتیکوئیدی در بدخیمی‌های خونی و بیماری‌های خود ایمن می‌شوند [۲۰]. میلوتینوویچ (Milutinovic) و همکارانش نشان دادند که داروی والپروآت (Valproate) در درمان اپی‌لپسی (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 به‌خوبی شناخته نشده است. بر این اساس در این تحقیق تأثیر داروی زولدرونیک اسید روی متیلاسیون پروموتر 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 پروموتر 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).




**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 ٤)** MSC تیمار شده بعد از سه هفته، **ستون ٥)** مربوط به Ladder، **ستون ٦)** کنترل مثبت، **ستون ۷)** DNA تیمار نشده، **ستون ۸)** کنترل منفی

## ٤- بحث

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های استخوانی، استئوپورز است. استئوپورز به‌واسطه کاهش توده استخوانی و افزایش شکنندگی استخوان‌ها مشخص می‌شود. ۵۰ درصد زنان و ۲۰ درصد مردان بالای ۵۰ سال در معرض ابتلا به استئوپورز قرار دارند. این عارضه سالانه هزینه‌های درمانی بسیار بالایی را به‌خود اختصاص می‌دهد. درمان‌های رایج استئوپورز به‌واسطه مهار بازجذب استخوان از طریق مهار تمایز استئوکلاست‌ها و



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

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 به‌واسطه 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 به‌عنوان عواملی قوی و مؤثر بر تجزیه استخوانی عمل می‌کنند. کلودرونات بی‌فسفونات (Clodronate Bisphosphonates) غیرنیتروژنهٔ 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 قوی‌تراست. اسید زولدرونیک یک اسید بی فسفونات 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 فارنسیل 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 به‌حال است. این دارو برای پیشگیری از شکستگی‌های اسکلتی در بیماران مختلف استفاده می‌شود. در سال ۲۰۰۷، FDA مجوز استفاده از این دارو برای درمان استئوپورز 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، تهاجم 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 به‌خوبی 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 استئوکلسین (Osteocalcin) و استئوپونتین (Osteopontin) به دوز داروی زولدرنیک اسید



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

بستگی دارد؛ به‌طوری که با کاهش دوز داروی زولدرونیک اسید بیان استئوکلسین و استئوپونتین در طول تمایز استئوبلاستیک کاهش پیدا می‌کند [۳٤]. 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 می‌بخشد [۳۵]. درمان کوتاه مدت با زولدرونیک اسید چگالی استخوانی و پیشتازهای فیبروبلاستیک مغز استخوان را بعد از پیوند هم‌گونه (Autologus Transplantation) سلول بنیادی افزایش می‌دهد [۳٦]. زولدرونیک اسید در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکرومولار در شرایط آزمایشگاهی برای مدت بیش از ۲٤ ساعت منجر به مهار تکثیر و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی MSC می‌شود. در حالی که تأثیر ضربانی آن برای ۳ تا ٦ ساعت در غلظت ۵ میکرومولار و سپس کشت به‌مدت ۲ هفته تحت شرایط استئوژنیک منجر به حفظ نشانگرهای استئوژنیک در hMSC می‌شود [۱۱].

در تحقیق حاضر پس از تیمار MSCs با داروی زولدرونیک اسید، وضعیت متیلاسیون پروموتور RUNX2 و DLX5 به‌منظور بررسی مکانیسم تأثیر دارو ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تیمار با زولدرونیک اسید هرچند موجب تمایز MSCs به استئوبلاست می‌شود، وضعیت متیلاسیون پروموتور RUNX2 و DLX5 در طول تمایز استئوبلاستیک MSCs را تغییر نمی‌دهد. در حالی‌که تحقیقات نشان داده است که بیان این فاکتورهای نسخه‌برداری در طول تمایز استئوبلاستی افزایش می‌یابد [۱]. این نتایج می‌تواند نمایانگر آن باشد که داروی زولدرونیک اسید به‌واسطه مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی به‌ویژه متیلاسیون پروموتر منجر به تمایز استئوبلاستیک MSCs نمی‌شود. مکانیسم اثر داروی زولدرونیک اسید در القای تمایز MSCs می‌تواند یک مسیر مستقل از متیلاسیون ژن‌های RUNX2 و DLX5 باشد. از طرفی، تحقیقات اخیر نشان داده است که مهار مسیر موالونات در سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic Stem Cells: ESC) قدرت خود بازسازی این سلول‌ها را به‌واسطه مهار پرنیلاسیون پروتئین Rho GTPase مهار می‌کند. این امر نشان می‌دهد که مهار مسیر موالونات در ESC با مهار تکثیر همراه است [۳۷]. مهار این مسیر می‌تواند یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی اثر داروی زولدرونیک اسید باشد.

## ۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دکتری رشته خون‌شناسی 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 سلول‌های بنیادی صارم به دلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه و بعضی مواد نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

## ٦- 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.



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

[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] Tarfiei 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, Amirizadeh N, Jazayery M. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

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



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]

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] Tauchmanovà 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 geranyl-geranylation. Stem Cells 2007; 25(7): 1654-63.



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30 ]