نقش ان ـ نیترو ـ ال ـ آرژنین متیل استر در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های استخوانی

الهام ارفعی[*]
سیما نصری[**]
رضا محمودی[***]
ایرج امیری[****]

[*] کارشناس ارشد زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
[**] دکترای زیست شناسی، استاد یار دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
[***] دکترای علوم تشریح، استادیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
[****] دکترای علوم تشریح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی همدان، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

تاریخ وصول : ۱۳۸۸/۱۲/۲۳
تاریخ پذیرش:۱۳۸۹/۱۲/۲۸

مولف مسئول: دکتر ایرج امیری
پست الکترونیکی:amiri44@yahoo.com

چکیده:

مقدمه و هدف: نتایج حاصل از برخی مطالعه‌های آزمایشگاهی جدید نشان داده است که نیتریک اکساید احتمالاً نقش مهمی‌در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سلول‌های استخوانی در محیط کشت دارد . هدف از این پژوهش بررسی تأثیر یک مهار کننده تولید نیتریک اکساید به نام ان ـ نیترو ـ ال آرژنین متیل استر با مقادیر مختلف بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های استخوانی در محیط آزمایشگاه بود.

مواد وروش‌ها: این پژوهش یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد. سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش‌های صحرایی در شرایط کاملاً استریل جدا شده و در محیط کشت مناسب کشت داده شدند. پس از پاساژ سوم، سلول‌های فوق برای تمایز به استخوان تحت تأثیر فاکتورهای تمایزی قرارگرفتند. در برخی از پلیت‌ها در زمان تمایز، ال‌نایم با غلظت‌های (۲۵۰،۱۲۵ و ۵۰۰ میکرو مولار) به محیط تمایزی اضافه شد تا تأثیر آن بر تمایز سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد. در حین تمایز محیط تمایزی هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد و عمل تمایز تا ۲۸ روز ادامه یافت. پس از پایان دوره تمایز، به منظور بررسی وقوع تمایز استخوانی، از روش رنگ‌آمیزی آلیزارین رد برای ماتریکس معدنی شده، استفاده گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در حضور ال‌نایم تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های استخوانی مختل شده و از میزان تولید ماتریکس معدنی شده به طور معنی‌داری در یک روند وابسته به دز کاسته می‌شود($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که مهار تولید نیتریک اکساید با استفاده از ال‌نایم موجب اختلال در تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در یک روند وابسته به دز در آزمایشگاه می‌شود.

واژه‌های کلیدی:سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نیتریک کساید، استخوان سازی، ال نایم

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های هستند که دارای دو ویژگی اساسی؛ یعنی توانایی تقسیم شدن و تمایز می باشند. به عبارت دیگر می‌توانند برای مدت نسبتاً طولانی تقسیمات خود تجدیدی داشته باشند و در شرایط مناسب به رده‌های سلول‌های اسکلتی متمایز شوند(۱). سلول‌های بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغین ، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌اشاره کرد که در بسیاری از بافت‌های با منشاء مزانشیمی، مثل؛ استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی وجود دارند و در ترمیم آنها شرکت می‌کنند(۳ و ۲).

مغز استخوان یکی از مهم‌ترین منابع برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌می‌باشد(۴). سلول‌های مزانشیم مغز استخوان سلول‌های چند توانی هستند که در مغز استخوان یافت شده و توان تمایز به سلول‌های استخوان، چربی و غضروف را دارا می‌باشند(۶ـ۴). در مطالعه‌ای پیتنگر و همکاران[1] (۱۹۹۹) نشان دادند که سلول‌های جدا شده از آسپیره مغز استخوان انسان در صورت اعمال محرک‌های مناسب به رده‌های سلولی استخوانی، غضروفی یا چربی تمایز می‌یابند(۲). پتانسیل تمایز به استخوان یکی از توانایی‌های بارز سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌می‌باشد که با کشف آن امیدهای زیادی برای ترمیم ضایعات بافت استخوانی به وجود آمده است(۹ـ۷).

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که سیگنال‌های داخل سلولی و بین سلولی متعددی در تمایز و رشد بافت استخوانی نقش دارند(۱۲ـ۱۰). یکی از مولکول‌های سیگنالی که احتمالاً می‌تواند نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان‌ساز داشته باشد نیتریک اکساید[2] است. نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد است که در اثر فعالیت آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز[3] تولید و در بافت‌ها و سلول‌های مختلف آزاد می‌شود(۱۳). سه ایزوفرم مختلف از نیتریک اکساید سنتاز وجوددارد؛ یک نوع مغزی یا عصبی، نوع اندوتلیالی که به آن نوع ساختمانی هم گفته می‌شود و نوع سوم آن ایزوفرم القایی می‌باشد(۱۴). آنزیم‌های فوق اسیدآمینه ال ـ آرژینین را به نیتریک اکساید و سیترولین تبدیل می‌کنند که این امر به وسیله جایگزین نمودن آرژنین با آنالوگ‌های آن نظیر ان ـ نیترو ـ ال آرژنین متیل استر(ال‌نایم)[4] مهار می‌شود(۱۶).

ال‌نایم یکی از آنالوگ‌های مهم اسید آمینه ال ـ آرژینین می‌باشد که در واکنش با ایزوفرم‌های مختلف آنزیم نیتریک اکساید سنتاز موجب مهار تولید نیتریک اکساید به وسیله سلول‌ها می‌گردد، لذا در

1-Pittenger et al
2-NO
3-NOS
4-N^G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester(L-NAME)

مطالعه‌های آزمایشگاهی به منظور مهار تولید نیتریک اکساید این ماده به محیط کشت اضافه می‌شود(۱۶).

با توجه به قابلیت‌های متعدد نیتریک اکساید امروزه نقش آن در بسیاری از اعمال بدن تحت مطالعه می‌باشد. یکی از اعمالی که نقش نیتریک اکساید در آن تا حدودی شناخته شده است استخوان‌سازی می‌باشد. اهمیت نیتریک اکساید در بیولوژی و تکامل استخوان هم در محیط بدن و هم در مطالعه‌های آزمایشگاهی به خوبی مشخص شده است(۱۸ و ۱۷).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که ایزوفرم‌های اندوتلیالی نیتریک اکساید سنتاز نقش مهمی در بیولوژی استخوان دارند و به ویژه ایزوفرم‌های اندوتلیالی نقش مهمی در استخوان‌سازی در بدن دارد. به طوری که پیشنهاد شده است که تولید مداوم نیتریک اکساید در بدن یک اثر اتوکرینی بر رشد و فعالیت سلول‌های استخوان‌ساز در بدن دارد و از بین بردن هدفمند آنزیم فوق در سلول‌های استخوان‌ساز موجب از کار افتادن این سلول‌ها و تحلیل رفتن استخوان‌ها در بدن می‌شود(۱۸). هم‌چنین بیان آنزیم ایزوفرم‌های اندوتلیالی نیتریک اکساید سنتاز در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان نیز اخیراً گزارش شده است، هر چند که نقش آنزیم فوق در تمایز سلول‌های فوق هنوز ناشناخته می‌باشد(۲۰ و ۱۹). یافته‌های فوق نظر محققینی را که در زمینه سلول‌های بنیادی تحقیق می‌نمایند به خود جلب نموده است و با ایجاد سؤال‌های زیادی در مورد اهمیت نیتریک اکساید در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوان‌ساز موجب آغاز تحقیقاتی در این زمینه شده است که اخیراً گزارش‌هایی نیز در این زمینه منتشر شده است، اما به دلیل تازگی موضوع این گزارش‌ها بسیار محدود می‌باشند.

در مطالعهٔ دامولیس و همکاران[1](۲۰۰۷) نشان دادند که در طی تمایز سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان به سلول‌های استخوانی در محیط کشت آنزیم ایزوفرم‌های اندوتلیالی نیتریک اکساید سنتاز بیان می‌شود و مهار فعالیت آنزیم فوق روند تمایز این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۲۱). هم‌چنین اُرسیانی و همکاران[2](۲۰۰۹) یک ارتباط مثبت بین تولید نیتریک اکساید به وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمال رباط دور دندانی با میزان تمایز آنها به سلول‌های استخوانی را نشان دادند(۲۲).

با توجه به اهمیت موضوع و محدود بودن اطلاعات در این زمینه در این مطالعه با مهار تولید نیتریک اکساید در هنگام تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های استخوانی به وسیله ال‌نایم نقش نیتریک اکساید در این روند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد. مواد مورد

1-Damoulis et al
2-Orciani et al

استفاده در این پژوهش همگی از شرکت سیگما ساخت کشور آمریکا تهیه گردید، مگر در مواردی که به آن اشاره شده است.

موش‌های صحرایی نر جوان از نژاد اسپراگو ـ داولی[1] به وسیله اتر یا کلروفرم بیهوش شده و به منظور جلوگیری از انتقال آلودگی، تمام بدن آنها با الکل ۷۰ درصد آغشته و ضد عفونی شد. سپس استخوان‌های ران و ساق آنها با عمل جراحی و تحت شرایط استریل از بدن خارج و به داخل یک پتری دیش حاوی بافر فسفات[2] استریل منتقل شدند و پس از جداسازی بافت‌های نرم و ماهیچه‌ها، دو انتهای استخوان‌ها، به وسیله استخوان بُر ظریف قطع شد و مغز استخوان به وسیله سرنگ ۵ میلی‌لیتری محتوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنینی گوساله[3] و ۱۰۰ واحد بر لیتر بنزیلپنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرپتومایسین به داخل فلاسک ۴۰ میلی‌لیتری تخلیه شد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها به وسیله سرنگ فوق چند مرتبه آسپیره شدند. سپس فلاسک به داخل یک انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد گاز دی اکسید کربن و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با بافر فسفات شسته و به محیط کشت تازه اضافه شد.

از ویژگی‌های منحصر به فرد سلول‌های مزانشیمی که از آن برای جداسازی سلول‌های فوق استفاده می‌شود توانایی آنها در چسبیدن به پلاستیک است(۲۳)، که در این مطالعه نیز ویژگی فوق مورد استفاده قرار گرفت، لذا به سلول‌های چسبیده به کف فلاسک ۱۰ـ۷ روز برای تکثیر فرصت داده شد و در طی این مدت محیط کشت هر سه روز یک‌بار مورد تعویض قرار گرفت. بعد از این که تراکم سلول‌ها در کف فلاسک به حدود ۹۰ـ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها به کمک محلول ۰/۰۵ درصد Trypsin-EDTA از کف فلاسک جدا و نیمی‌از آنها در یک فلاسک دیگر کشت داده شد. این عمل که به منظور مضاعف‌سازی کشت، خالص‌سازی سلول‌های مزانشیمال انجام می‌گرفت، تا سه بار تکرار شد.

برای تمایز سلول‌های فوق به سلول‌های استخوان‌ساز از پاساژ سوم این سلول‌ها بهره گرفته شد. به این صورت که پس از انجام پاساژ سلولی، سلول‌ها به چهار قسمت تقسیم شده و به طور متوسط تعداد ۵×۱۰^{۶} سلول به داخل هر خانه پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل شدند و بعد از چسبیدن آنها به کف پلیت و رسیدن تراکم آنها به ۶۰ تا ۷۰ درصد محیط کشت عادی از ظرف‌های کشت خارج شده و با محیط کشت تمایزی تعویض می‌شد(۶). محیط کشت تمایزی شامل؛ DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله به اضافه ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محلول اسید آسکوربیک و ۱۰ نانو مولار محلول دگزامتازون و هم‌چنین ۱۰ میلی‌مولار محلول بتا گلیسرول فسفات بود.

1-Sprague-Dawley (SD)
2-PBS
3-FBS

جهت بررسی تأثیر نیتریک اکساید بر روند تمایز سلولی در سه عدد از پلیت‌های فوق به محیط کشت تمایزی به ترتیب مقادیر؛ ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار از ال‌نایم اضافه می‌شد. عمل تمایز سلول‌ها تا ۲۸ روز ادامه یافت و هر سه روز یک‌بار محیط‌های کشت با محیط تازه از همان نوع تعویض شدند(۲۲). در طی روند تمایز تغییرات مورفولوژیک سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی و تشکیل ندول‌های مینرالیزه شبه استخوانی[۱] به طور روزانه با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. در پایان نیز میزان مینرالیزاسیون و تشکیل ماتریکس استخوانی با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز[۲] ارزیابی شد. این عمل تا ۵ بار بر روی سلول‌هایی که از مغز استخوان موش‌های صحرایی مختلف به دست آمده بود تکرار شد.

مینرالیزاسیون لایه سلولی با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز مورد بررسی قرار گرفت. آلیزارین قرمز ماده‌ای است که به طور اختصاصی ماتریکس معدنی شده را رنگ می‌کند، به طوری که شدت رنگ پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد.

در این مطالعه میزان مینرالیزاسیون با استفاده از کیت کمی‌سازی آلیزارین رد ساخت شرکت میلی‌پور آمریکا مورد بررسی قرار گرفت و طبق روش پیشنهادی در بروشور کیت اندازه‌گیری کمی میزان مینرالیزا سیون نیز انجام پذیرفت. به طور خلاصه، سلول‌ها دو بار در بافر فسفات شسته شده و با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اطاق فیکس شدند. سپس با محلول رنگی آلیزارین قرمز به مدت ۱۰ دقیقه رنگ شدند. هم‌چنین پس از شستشو با آب مقطر، ماتریکس قرمز رنگ در اسید استیک ۱۰ درصد حل شد و مواد مینرالیزه شده از کف پلیت جدا شده و در یک لوله ریخته شدند. آن گاه لوله‌های فوق در یک بن ماری تا ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت دیده و بلافاصله بر رو ی یخ سرد شدند و بعد با دور ۱۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. در ادامه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول رویی در یک میکروتیوب ریخته شد و با استفاده از محلول آمونیاک pH آن خنثی شد. در انتها تراکم اپتیکال محلول‌های حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد و با تراکم اپتیکال غلظت‌های مشخص آلیزارین رد که طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده تهیه شده بود، مقایسه گردید. پس از رسم نمودار استاندارد مقادیر کمی میزان مینرالیزاسیون در هر نمونه به دست آمد(۶).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [۳]و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه[۴] و تست توکی[۵] تجزیه و تحلیل شدند.

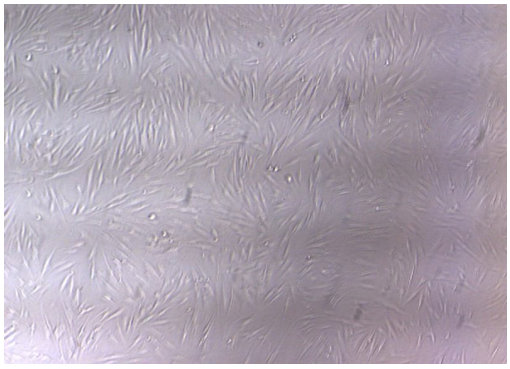
یافته‌ها

در این مطالعه سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش‌های صحرایی با استفاده از خاصیت چسبندگی آنها به پلاستیک جدا شدند. سلول‌ها ظاهری فیبروبلاستی داشتند و این مورفولوژی را در طی پاساژها حفظ کردند (تصویر۱).

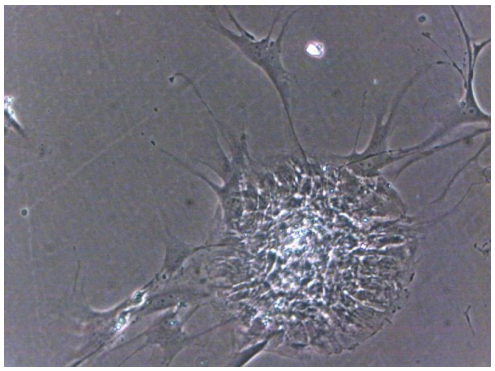
1-Bone Nodule Like
2-Alizarian Red
Statistical Package for Social Sciences
2-One way ANOVA
3-Tukey

بررسی مورفولوژیک تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی با کمک میکروسکوپ معکوس انجام شد و ظهور ندول‌های شبه استخوانی در لایه سلولی مشاهده شد. حضور سلول‌های زنده ارگانیزه شده در ساختارهای مشابه ندول‌های استخوانی مشخص شد(تصویر۲). بررسی کیفی پلیت‌های کشت پس از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان داد که تشکیل ندول‌های استخوانی و مینرالیزاسیون آنها در گروه‌های تیماری در یک روند وابسته به دز به شدت مختل می‌گردد(تصویر۳).

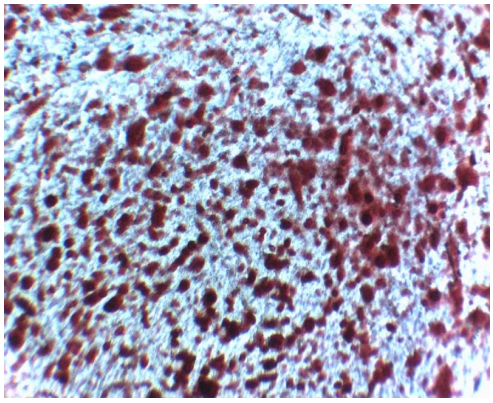
آنالیز کمی میزان رسوب مواد معدنی نیز نشان داد که میزان رسوبات کلسیفیه در گروه‌های تیماری به شدت کاهش می‌یابد. آنالیز واریانس یک طرفه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان مینرالیزاسیون و مقایسه بین گروهی آنها با استفاده از تست توکی نیز نشان داد که الن‌ایم در یک روند وابسته به دوز موجب کاهش معنی‌دار تولید ماتریکس مینرالیزه می‌شود، به طوری که میزان مینرالیزاسیون در گروه کنترل ۵۶۱ میکرومولار بود که اختلاف معنی‌داری با گروه‌های تیماری داشت($p<0/001$). میزان مینرالیزاسیون در گروه تیماری برابر با ۱۲۳، گروه الن‌ایم ۱۲۵ برابر با ۶۶/۳۳ و گروه الن‌ایم ۵۰۰ برابر با ۸/۲۴ میکرومولار بود به طوری که در یک روند وابسته به غلظتی از الن‌ایم که به محیط کشت اضافه شده بود از میزان مینرالیزاسیون کاسته شد و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیماری مشاهده گردید($p<0/001$)(نمودار۱).



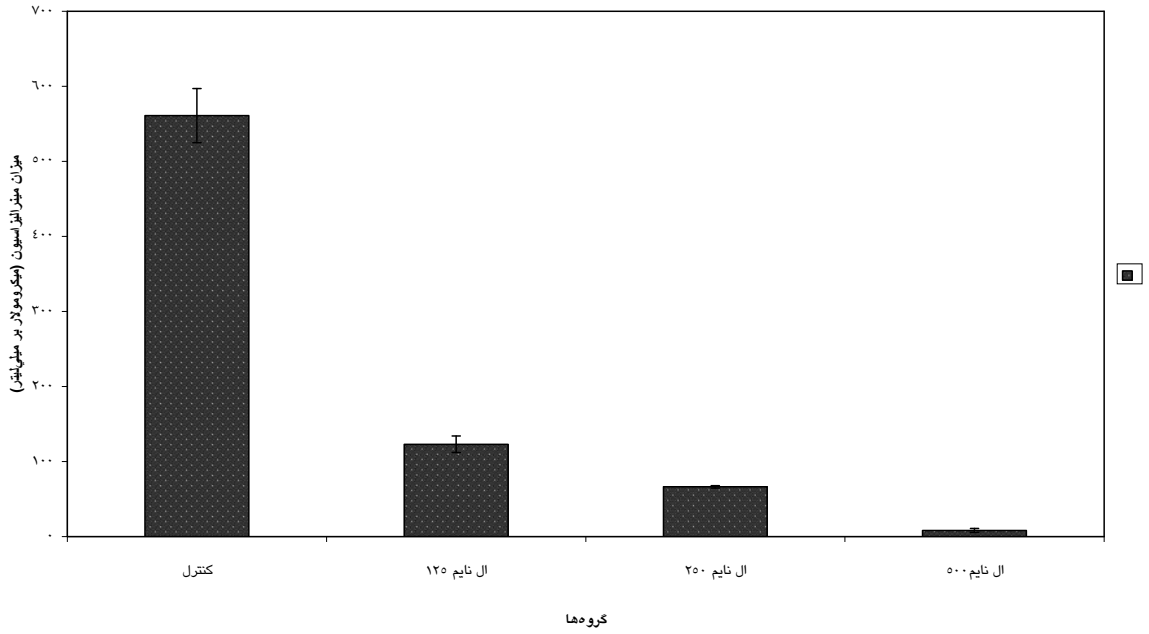
تصویر ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ سوم، سلول‌ها ظاهری فیبروبلاستی(دوکی شکل)داشتند و این مورفولوژی را در طی پاساژها حفظ کردند(میکروسکوپ معکوس، بزرگ نمایی ۱۰۰).



تصویر ۲: ندول‌های شبه استخوانی در لایه سلولی ۲۱ روز پس از آغاز تمایز، حضور سلول‌های زنده‌ی ارگانیزه شده در این ساختارهای مشابه ندول های استخوانی مشخص است(میکروسکوپ معکوس، بزرگ نمایی ۴۰۰).



تصویر ۳: رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز، که ندول‌های استخوانی در آن به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند(میکروسکوپ معکوس بزرگ نمایی ۴۰۰).



نمودار ۱: مقایسه میزان تولید ماتریکس مینرالیزه در گروه‌های تیمار با گروه کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

سیگنال‌های داخل سلولی و بین سلولی متعددی در تمایز و رشد بافت استخوانی نقش دارند. یکی از مولکول‌های سیگنالی که نقش آن در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان‌ساز تحت بررسی می‌باشد، نیتریک اکساید است. اهمیت نیتریک اکساید در بیولوژی و تکامل استخوان هم در محیط بدن و هم در مطالعه‌های آزمایشگاهی به خوبی مشخص شده است(۱۸و۱۷) و مطالعه‌های اخیر نقش احتمالی آن را در تمایز سلول‌های استخوانی مطرح نموده‌اند(۲۲و۲۱). در تحقیق حاضر مسیر تولید نیتریک اکساید در طی تمایز سلول‌های مزانشیمی‌به سلول‌های استخوانی با استفاده از مهار کننده آنزیم مهار شد و تأثیر آن بر روند تمایز مورد نظر بررسی گردید.

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که با مهار تولید نیتریک اکساید در زمانی که سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت تحت شرایط تمایزی قرار می‌گیرند تا به سلول‌های استخوانی تبدیل شوند، روند تمایزی فوق مختل می‌شود. این عمل در یک روند وابسته به دوز قرار داشته به طوری که در مقادیر بالای ال‌نایم کاملاً متوقف می‌شود. در مطالعه داموس و همکاران(۲۰۰۷) ثابت شد که استفاده از غلظت ۲۵۰ میکرومولارال‌نایم در زمان تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های استخوانی موجب اختلال در روند تمایز شده و از میزان آن می‌کاهد(۲۱).

هم‌چنین مطالعه هانگ و همکاران[1] (۲۰۰۸) نشان داد که استفاده از نیتروگلیسیرین در محیط

1-Huang et al

کشت موجب افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سلول‌های استخوانی با استفاده از مسیر تولید نیتریک اکساید می‌شود(۲۴). مطالعه اُرسیانی و همکاران(۲۰۰۹) بر سلول‌های مزانشیمی لیگامان دور دندانی نیز نشان داد که سلول‌های فوق در زمان تمایز به سلول‌های استخوانی در محیط کشت نیتریک اکساید تولید می‌نمایند و این عمل نقش مهمی‌در تمایز آنها دارد(۲۲).

توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌در تمایز به رده سلول‌های استخوانی نوید بخش این مسئله است که در آینده نزدیک بتوان از این سلول‌ها در سلول درمانی ضایعات وسیع استخوانی استفاده کرد(۹ـ۷ و۴). برخی از محققین معتقدند که در ضایعات استخوانی، چنانچه از استراتژی سلول درمانی استفاده شود بهتر است سلول‌های مورد استفاده کاملاً تمایز یافته باشندو اگر غیر از این باشد ممکن است در محل پیوند سلول‌های ناخواسته غیر استخوانی به وجود آید و در نتیجه کارآیی پیوند را کاهش دهد(۹ـ۷). با در نظر گرفتن این مطلب، اهمیت مطالعه‌های مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی در محیط آزمایشگاهی آشکار می‌گردد، لذا آگاهی از کلیه عواملی که در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی نقش دارند و شناختن کلیه سیگنال‌های مولکولی که در روند تمایز سلوهای مزانشیمی‌دخیلند بسیار حایز اهمیت می‌باشد. این مطالعه نشان می‌دهد که نیتریک اکساید یک مولکول سیگنالی بسیار مهم در تمایز سلوهای مزانشیمی‌به سلول‌های استخوانی در محیط کشت می‌باشد و هرگونه اختلال در تولید آن به وسیله سلول‌ها موجب کاهش تمایز و احیاناً توقف آن می‌گردد. با توجه به این که در گذشته مطالعه‌های متعدد اهمیت نیتریک اکساید را در استخوان‌سازی در بدن و نقش آن در بیولوژی بافت استخوانی نشان داده است(۲۰ و ۱۸، ۱۷)، بررسی‌های آزمایشگاهی مانند مطالعه حاضر اهمیت این نقش را در محیط آزمایشگاه نیز به اثبات می‌رساند.

در مجموع این مطالعه نشان می‌دهد که نیتریک اکساید نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های استخوانی در محیط کشت دارد، به طوری که استفاده از الناییم در محیط تمایزی موجب مهار تمایز سلول‌های فوق به سلول‌های استخوانی می‌گردد، لذا به نظر می‌رسد که استفاده از موادی که موجب افزایش تولید نیتریک اکساید به وسیله سلول‌های مزانشیمی می‌شوند، می‌تواند موجب تسریع تمایز سلول‌های فوق به سلول‌های استخوانی شود.

در پایان پیشنهاد می‌شود که با انجام مطالعه‌های آزمایشگاهی کامل‌تر، نقش نیتریک اکساید در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی به طور کامل روشن شود که این امر می‌تواند گام مهمی در ترمیم ضایعه‌های استخوانی به شمار آید.

تقدیر و تشکر

مؤلفین مراتب تشکر خود را از طیبه غیاثوند کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی که در انجام این طرح کمال همکاری را داشتند، ابراز می‌دارند.

Effects of Nitric Oxide Production Inhibitor Named, N^G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME), on Rat Mesenchymal Stem Cells Differentiation

Arfaei E[*], Nasri S[**], Mahmodi R[***], Amiri E[****].

[*] MSc in Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran
[**] Assistant Professor of Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Payame noor University, Tehran, Iran
[***] Assistant Professor of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[****] Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received:14/03/2010
Accepted:17/04/2010

Corresponding Author: Amiri I
Email: **amiri44@yahoo.com**

ABSTRACT:

Introduction & Objectives: Recently, the findings of some studies have shown that, nitric oxide (NO) probably has an important role in differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts. The aim of the present investigation was to study the effects of nitric oxide production inhibitor named, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on rat mesenchymal stem cells differentiation to osteoblasts in vitro.

Materials & Methods: This was an experimental study conducted at Hamedan University of Medical Sciences in 2009, in which rat bone marrow stem cells were isolated in an aseptic condition and cultured in vitro. After third passage, the cells were cultured in osteogenic differentiation medium. To study the effects of L-NAME on osteogenic differentiation, the L-NAME was added to the culture medium at a concentration of 125, 250, and 500 μM in some culture plates. During the culture procedure, the media were replaced with fresh ones, with a three days interval. After 28 days of culturing; the mineralized matrix was stained using Alizarian red staining method. The gathered data were analyzed by SPSS software version 12 using one way ANOVA.

Results: The findings of this study showed that in the presence of L-NAME, differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts was disordered and matrix mineralization significantly decreased in a dose dependent manner.

Conclusion: This study revealed that, inhibition of nitric oxide production using L-NAME can prevent the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblast. The results imply that NO is an important constituent in differentiation of mesenchymal stem cell to osteoblasts.

Key words: Mesenchymal stem cell, Nitric Oxide, Osteogenesis, L-NAME

REFERENCES

1.Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy, and ethics. The Journal of Clinical Investigation 2004; 11 4: 1364 – 70.
2.Pittenger MF,Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Moosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 248: 143-7.
3.Prockop DJ. Marrow Stromal cells as stem cells for non hematopoeitic tissues. Science 1997; 276: 71-4.
4.Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential application. Stem cells 2002; 19:180-92.
5.Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci 1988; 3 : 63-7.
6.Masahiro M, Ken K. Differentiation of bone marrow cells in culture and in vivo. International Congress Scries 2003;1252: 461-8.
7.Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view . J Cell Mol Med 2006: 10; 17-19.
8.Tuan RS, Boland G,Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther 2003; 5(1): 32-45.
9.Horvitz EM, Goedon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8932-7.
10.Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Hartmann C, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia,and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt receptor. J Cell Biol 2002; 15: 303-14.
11.Stefan H, Claire LK. Wnt signaling : variety at the core. J cell science 2007; 120: 385-93.
12.Bian G, Muller T, Wang X, Papkoff J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. Biochem Biophys Res Commun 2003; 31: 84-91.
13.Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology & pharmacology , pharmacological . Rew 1991;43(2): 109 - 42.
14.Fostermann U, Class E , Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. characterization, purification , molecular cloning and functions Hypertension.1994; 23: 1121-1131.
15.Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase: Properties, cellular distribution and expressional control. Biochem Pharmacol 1995; 50: 1321-32.
16.Alderton W, Cooper C, Knowles G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochemistry 2001; 357: 593–615.
17.Koyama A, Otsuka E, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. Nitric oxide accelerates the ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells by stimulating the production of prostaglandin E(2). Eur J Pharmacol 2000; 391: 225–31.
18.Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez de Marticorena I, Hukkanen M. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, defects in osteoblast maturation activity. Am J Path 2001;158: 247–57.
19.Klinz FJ, Schmidt A, Schinköthe T, Arnhold S, Desai B, Popken F, et al. Phospho-eNOS Ser-114 in human mesenchymal stem cells: constitutive phosphorylation, nuclear localization and upregulation during mitosis. Eur J Cell Biol 2005; 84: 809–18.
20.Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashi U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesnchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. Nitric Oxide 2008;19: 320-5.
21.Damoulisa PD, Drakosa DE, Gagarib E, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human mesenchymal bone marrowCells in silk scaffolds is regulated by nitric oxide. Ann N Y Acad Sci 2007; 1117: 367–76.
22.Orciani M, Trubiani O, Vignini A, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Salvolini E. Nitric oxide production during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. Acta Histochemica 2009; 111: 15-24.
23.Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999; 72: 570-85.
24. Huang L, Qiu N, Zhang C, Wei H, ya-lin L, Zhou H, Xiao ZS. Nitroglycerin enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via nitric oxide pathway. Acta Pharmacol Sin 2008; 29(5): 580–6.