Archive of SID

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم– شماره ۱۰۵
تیر ۱۳۹۲

مقایسه میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در زنان باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی

نویسندگان: انسیه سادات میرشریف[۱]، سکینه موید محسنی*[۲]، عیسی صالحی[۳]، سیدمحمود هاشمی[٤]، طوبی غضنفری[٥]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استادیار گروه زنان و زایمان و مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

٤- دکترای ایمونولوژی، گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، تهران، ایران

٥- استاد گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: سکینه موید محسنی **E-mail: smmohseni@yahoo.com**

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۶/۱۱
پذیرش: ۱۳۹۲/٦/۱۲

چکیده

مقدمه و هدف: پراکلامپسی یکی از عوارض شایع دوران بارداری است که بعد از هفته بیستم بارداری در زنان با فشار خون طبیعی بروزمی‌کند؛ پاتوفیزیولوژی این بیماری، ناشناخته است. با توجه به تغییرهای سطح نیتریک اکساید در سرم افراد پراکلامپتیک و همچنین، نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترشح نیتریک اکساید به‌عنوان تنظیم‌کننده ایمنی، در این پژوهش برآن‌شدیم تا سطح نیتریک اکساید را در ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی بسنجیم.

مواد و روش‌ها: از چربی زیرجلدی ۱۰ خانم باردار پراکلامپتیک و ۱۰خانم باردار سالم در حین عمل سزارین، نمونه‌گیری‌شد. پس از جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی تمایز و ویژگی‌های ایمونوفنوتایپ آنها ارزیابی‌شد. سپس با استفاده از روش گریس میزان ترشح نیتریک اکساید توسط آنها سنجیده شد.

نتایج: سلول‌های بنیادی جداشده در هر دو گروه، به خوبی به استئوسیت و آدیپوسیت متمایز شدند. آنالیزهای فلوسایتومتری در دو گروه حاکی از بیان مارکرهای CD44, CD73, CD90 و CD105 و عدم بیان مارکرهای CD-14, CD34, CD45 و HLA-DR بود. تغییر معناداری در میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های دو گروه مشاهده‌نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن است که به‌احتمال، نیتریک اکساید ترشح‌شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در تغییرهای سطح سرمی این فاکتور و پاتولوژی پراکلامپسی نقشی معنی‌دار ندارد؛ البته لازم است این مطالعه روی تعدادی بیشتر نیز آزمایش‌شود.

واژگان کلیدی: نیتریک اکساید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، پراکلامپسی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اختلال‌های فشار خون در دوران بارداری، اختلال-هایی شایع هستند که همراه با خون‌ریزی و عفونت، یکی از سه علت اصلی مرگ‌ومیر زنان باردار در سراسر دنیا محسوب‌می‌شوند. به افزایش فشار خون همراه با دفع پروتئین در ادرار، «پراکلامپسی» اطلاق‌می‌شود (۱). پراکلامپسی، یکی از عوارض شایع دوران بارداری است که بعد از هفته بیستم بارداری در زنان با فشار خون طبیعی بروزمی‌کند؛ میزان شیوع این بیماری ۳ تا ۸ درصد است (۲)؛ در مطالعه‌ای میزان شیوع آن در ایران ٦/٤ درصد تخمین‌زده‌شده‌است (۳).

در پراکلامپسی، تهاجم کم‌عمق سیتوتروفوبلاست‌ها به اطراف عروق مارپیچی رحمی و عدم اتساع کافی این عروق، به کاهش جریان خون مادری جنینی، ایسکمی و هایپوکسی جفتی به‌رغم پیشرفت حاملگی منجرمی‌شود (٤-۷).

با توجه به عدم شناخت کامل اتیولوژی پراکلامپسی، تاکنون هیچ روشی برای پیشگویی، پیشگیری و درمان مناسب آن وجودنداشته و ختم بارداری بدون توجه به سن بارداری، برای به‌حداقل‌رساندن مرگ‌ومیر مادری، تنها راه بهبود آن است (۸).

اغلب مطالعات انجام‌شده از آن حکایت‌دارند که سلول‌های تروفوبلاست، مسئول تغییرهای ایجادشده در پراکلامپسی هستند؛ درحالی‌که جفت انسان، ارگانی هتروژن بوده، شامل جمعیت‌های سلولی مختلف مانند سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های پروژنیتور، میوفیبروبلاست و سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که همگی در حفظ عملکرد جفت نقش‌دارند. به‌تازگی در مطالعه‌ای نشان‌داده‌شده‌است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از جفت، با ترشح فاکتورهای پاراکرین بر رگزایی و با فعالیت‌های ضدالتهابی و ضد-فیبروتیک خود در حفاظت در مقابل آسیب ایسکمیک نقش‌دارند (۹)؛ بنابراین، این احتمال وجوددارد که اختلال در فعالیت‌های ضدالتهابی و پروآنژیوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاتوژنز پراکلامپسی نقش‌داشته‌باشد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی تمایز به بافت‌های مزانشیمی، ترشح تعدادی از سایتوکاین‌های پروآنژیوژنیک و آنتی‌آنژیوژنیک و سرکوب ایمنی، سلولی برای تحقیق‌ها و اقدام‌های درمانی مطلوب‌اند (۱۰). مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است اما به‌تازگی، این سلول‌ها از منابع فرعی دیگری مانند بافت چربی (۱۱)، بافت جفت (۱۲)، بندناف (۱۳) و خون محیطی (١٤) نیز جدا شده‌اند. مطالعات انجام‌شده نشان‌می‌دهند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی، از لحاظ مورفولوژی و بیان مارکرهای سطحی، مشابه سلولهای بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان و جفت بوده، از لحاظ رفتار سلولی در محیط کشت و قدرت تمایزی به سلول‌های استخوان، غضروف و چربی با یکدیگر تفاوتی‌ندارند (۱۵ و١٦)؛ از مزیت‌های جداسازی این دسته از سلول‌ها از بافت چربی نسبت‌به مغز استخوان می‌توان به سهولت در دسترسی و جداسازی و همچنین فراوانی بیشتر این دسته از سلول‌ها در این منابع اشاره-کرد (۱۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی برخلاف سلول‌های بنیادی جنینی بسیار ایمونوساپرسیو هستند؛ یکی از مهم-ترین عوامل مؤثر در سرکوب ایمنی القاشده توسط این دسته از سلول‌ها، نیتریک اکساید است (۱۷)؛ این مدیاتور، همچنین، با تأثیرگذاری بر سلول‌های عضلانی صاف عروق به‌عنوان متسع‌کننده نیز عمل‌می‌کند. در حاملگی نرمال، تغییرهای قلبی-عروقی مانند افزایش ضربان قلب، برون‌ده قلبی، حجم خون سبب افزایش تولید نیتریک اکساید (NO) می‌شود (۱۸و۱۹). برخی از مطالعات از افزایش (۲۰)، کاهش (۲۱) یا عدم تغییر این مدیاتور (۲۲) در شرایط پراکلامپتیک حکایت-دارند. محققان بر این باورند که تناقض‌های موجود ممکن است به دلیل تفاوت در رژیم غذایی افراد، تداخلات دارویی و دفع ادراری باشد (۲۳).

با توجه به تغییرهای سطح نیتریک اکساید در سرم

www.SID.ir

Archive of SID

افراد پراکلامپتیک و نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترشح نیتریک اکساید به‌عنوان تنظیم‌کننده ایمنی، در این پژوهش بر آن شدیم تا سطح این مدیاتور را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در زنان باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی ارزیابی‌کنیم. فهم ساختارهای تنظیم ایمنی توسط این سلول‌ها برای استفاده از آنها در ایمونوتراپی و کاربردهای بالینی ضروری است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، پس از اخذ موافقت از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شاهد و رضایت‌نامه کتبی از افراد وارد-شده به مطالعه، از چربی زیرجلدی در ناحیه اپی-گاستریک دیواره شکم ۱۰ خانم باردار سالم و ۱۰ خانم مبتلا به پراکلامپسی که تحت عمل سزارین قرارگرفتند، نمونه‌گیری‌شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل خانم‌های ۲۰ تا ۳۵ ساله باردار با تشخیص پراکلامپسی پس از هفته بیستم بارداری (فشار خون دیاستولیک مساوی یا بیشتر از ۹۰ میلی‌متر جیوه و سیستولیک مساوی یا بیشتر از ۱٤۰ میلی‌متر جیوه و وجود پروتئین در ادرار در حد ۳۰۰ میلی‌گرم در ادرار ۲٤ ساعته یا +۱ در دو نمونه ادرار تصادفی) و معیارهای خروج از مطالعه شامل سابقه فشار خون مزمن، اختلال کلیوی، اختلال کبدی، دیابت، سندرم HELLP[1]، ناهنجاری‌های ژنتیکی در جنین و بیماری‌های قلبی- عروقی بودند و گروه کنترل شامل خانم‌های ۲۰-۳۵ ساله سالم با حاملگی نرمال را دربرمی‌گرفتند.

نمونه‌ها از بیمارستان‌های شهید مصطفی خمینی، مهدیه و ولیعصر (عج) تأمین‌شدند. نمونه‌های بافت چربی در ظروف استریل دردار که حاوی بافر phosphate-) buffered saline (PBS همراه با ۵ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (Sigma) بودند، به آزمایشگاه منتقل‌شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی

جداسازی و کشت سلول‌های بافت چربی مشابه روش *بونل*[2] و همکارانش (۲٤) با اندکی تغییرها انجام-شد. نمونه‌های بافت چربی، در شرایط استریل، توسط بافر PBS حاوی ۳ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین چندی بار شستشوشده، پس از جداکردن بافت‌های زائد، با استفاده از تیغ جراحی تا حد امکان ریز شدند. قطعات حاصل به‌منظور هضم در کلاژناز ۰/۰۷۵ درصد (GIBCO)، در انکوباتور مرطوب $37^{\circ}C$ و co2 ۵ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرارداده‌شدند؛ سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژشدند. سوسپانسیون سلولی همراه با محیط کشت DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium – GIBCO) حاوی FBS(GIBCO) ۱۰ درصد و ۱ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین در فلاسک‌های متوسط کشت و در انکوباتور قرارداده‌شده و هر ۲٤ ساعت یک‌بار از لحاظ مورفولوژی و روند رشد بررسی‌شدند.

فلاسک‌ها هر ۳ تا ٤ روز یک‌بار به‌مدت دو هفته تعویض محیط شدند؛ سپس پاساژ اول صورت‌گرفت، به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از ٪ Trypsin (Sigma) 0/25 از کف ظروف کشت کنده‌شده، اثر آنزیم با محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد و ۱ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین خنثی‌شد؛ سپس سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم مناسب برای بار دوم پاساژداده‌شدند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت و استئوسیت

پس از پاساژ دوم و تهیه سوسپانسیون سلولی، در پلیت‌های ۲٤ خانه، توانایی تمایز به استخوان و چربی بررسی‌شد. پس از گذشت ۳ تا ٤ روز و چسبیدن سلول-ها به کف پلیت، محیط اختصاصی تمایز به چربی و استخوان جایگزین شد. لازم به توضیح است که محیط-های اختصاصی تمایزی از شرکت بن‌یاخته خریداری-

[1] - Hemolysis elevated liver enzymes low platelet count

[2] - Bunnell

www.SID.ir

Archive of SID

شدند. محیط تمایز به چربی، دارای 0.5 mM ایزوبوتیل متیل گزانتین، 100 µM ایندومتاسین و 0.1 µM دگزامتازون و 5 µM انسولین است. محیط تمایز به استخوان، دارای 10 mM بتاگلیسرول فسفات، 10nM دگزامتازون و50µg/ml اسکوربات ۲ فسفات است. هر ۳ تا ٤ روز یک‌بار محیط‌ها تعویض‌شدند. پس از گذشت حدود ١٤ تا ٢١ روز، محیط‌های تمایزی تخلیه‌شدند و پس از تثبیت با محلول پارافرمالدهید، شستشوداده‌شدند. با اضافه‌کردن محلول Oil Red-O به چاهک‌های مربوط به تمایز به چربی، واکوئل‌های لیپیدی خنثی و با اضافه‌کردن محلول Alizarin Red 1% به چاهک‌های مربوط به تمایز به استخوان، رسوب کلسیم فسفات در زیر میکروسکوپ مشاهده‌شد.

بررسی‌های فلوسیتومتری

پس از پاساژ دوم و تهیه سوسپانسیون سلولی، حجمی مناسب از آن که حاوی 1×10^5 سلول بود داخل لوله‌های فلوسایتومتری ریخته‌شد و با مقادیری مناسب از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) ضدمارکرهای CD-45، CD-105 وCD34 و نیز آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با فیکواریترین (PE) ضد مارکرهای CD-44 و-CD-73,HLA CD-14, DR,CD-90 در دمای ٤° در تاریکی به‌مدت ۳۰ تا ٤٥ دقیقه انکوبه‌شدند. تمامی مونوکلونال آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت BD Pharmingen خریداری‌شدند. در مرحله بعد، سلول‌ها با PBS شستشو و سپس به سلول‌ها بافر فیکس‌کننده فرمالین اضافه‌شدند و بررسی‌های ایمونوفنوتایپینگ با استفاده از دستگاه FACSCalibur (Becton Dickinson) انجام و یافته‌ها با نرم‌افزار Cyflogic(CyFloLtd.) آنالیزشدند.

سنجش نیتریک اکساید (NO)

پس از پاساژ دوم و تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد ۱۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی، شمارش و در پلیت‌های ٢٤ خانه ریخته‌شد. پس از گذشت ۳ تا ۵ روز و تکثیر آنها، سوپرناتانت سلول‌ها جمع‌آوری و به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژشد. سنجش NO با استفاده از روش Griess، با سنجش نیتریت در محیط کشت ارزیابی‌شد که اساس این روش رنگ‌سنجی، تشکیل رنگ از دی‌آزوتاسیون به کمک نیتریت در محیط اسیدی و کونژوگاسیون آن با نفتیل اتیلن- دی‌آمین موجود در ماده Griess است(۲۵). به‌طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پاساژ دوم برداشته‌شد و طبق پروتکل روش با ۵۰ میکرولیتر محلول سولفانیل‌آمید با غلظت ۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۵ درصد و ۵۰ میکرولیتر محلول نفتیل اتیلندی آمین با غلظت ۰/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۵ درصد ترکیب‌شد و توسط دستگاه قرائتگر الایزا در طول موج ٤٩٢ نانومتر خوانده‌شد. منحنی استاندارد با سنجش طول موج غلظت‌های مختلف معرف NO (NaNO2) محاسبه‌شد و با توجه به منحنی رسم‌شده، غلظت نیتریت نمونه‌ها محاسبه‌شد.

یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک و بالینی گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده‌است؛ همان‌طورکه در این جدول نشان‌داده‌شده‌است، هیچ تفاوت معناداری میان متغیرهای سن مادر و نمایه توده بدن در دو گروه زنان باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی وجودنداشت؛ درمقابل، تفاوت آماری معنی‌داری، میان سن بارداری در هنگام زایمان، فشار خون سیستولیک، فشار خون دیاستولیک و وزن نوزاد در هنگام تولد میان دو گروه وجودداشت.

www.SID.ir

Archive of SID

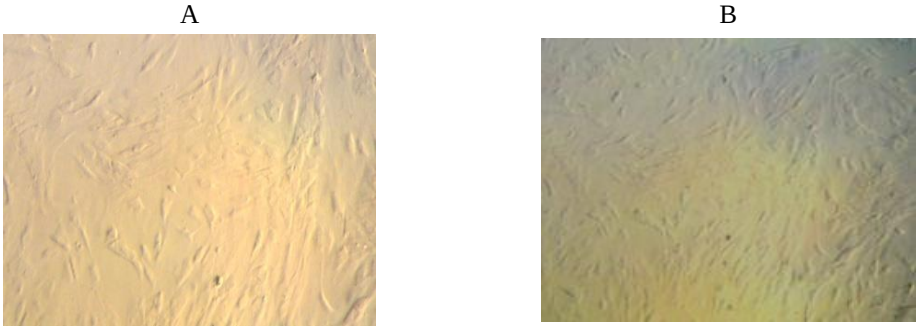
جدول ۱. مقایسه پارامترهای دموگرافیک و مامایی در دوگروه مورد مطالعه

متغیر	بادار سالم (تعداد =۱۰)	باردار پراکلامپتیک (تعداد =۱۰)	p value
سن مادر (سال)	۲۸/۶±۳/۶	۲۸/۱±۵/۲	۰/۸
سن حاملگی در هنگام زایمان (هفته)	۳۹/۱±۱/۳	۳۷/۴±۰/۹۶	*۰/۰۰۴
نمایه توده بدن (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۹/۵۳±۴/۵۲	۳۱/۰۸±۵/۱۱	۰/۴۸
فشار خون سیستولیک (میلی متر جیوه)	۱۱۴/۵±۱۱/۶۵	۱۵۵±۱۲/۷	*<۰/۰۰۱
فشار خون دیاستولیک (میلی متر جیوه)	۷۷±۸/۲۳	۹۹/۵±۸/۹۵	*<۰/۰۰۱
وزن نوزاد (گرم)	۳۳۷۴±۴۲۲/۲۷	۲۷۴۵±۶۲۸/۲۶	*۰/۰۰۲

میانگین ± انحراف معیار، مقایسه برمبنای آزمون تی و Man-witeny انجام‌گرفته‌است. *مقدار۰/۰۵>p از نظر آماری معنی‌دار است.

مورفولوژی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی

بعد از هضم آنزیماتیک بافت چربی و کشت آن، پس از دو هفته تک‌لایه‌ای از سلول‌های به‌طور عمده کشیده فیبروبلاستی تشکیل‌شد؛ این جداسازی براساس خاصیت چسبندگی سلول‌های مزانشیمی به ظروف کشت، صورت‌گرفت. در پاساژهای بعدی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی خالص‌تر شدند و از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی‌شکل) شباهت‌یافتند. نتایج مشاهدات مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس، در شکل ۱ آمده‌است.



شکل ۱. مورفولوژی دوکی‌شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در پاساژ دوم در نمای میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی x۱۰۰ (A : باردار سالم و B : باردار مبتلا به پراکلامپسی)

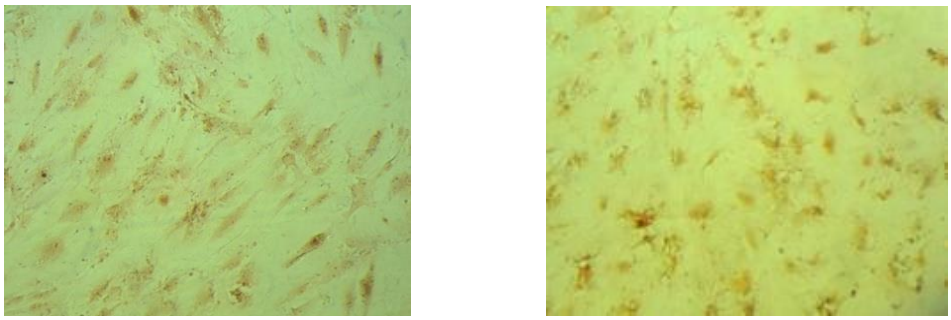
تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی به استخوان و چربی

سلول‌های پاساژ دوم به‌مدت ۱۴ تا ۲۱ روز در محیط‌های اختصاصی تمایز به استخوان و چربی قرار‌گرفتند و به‌طور چند روز در میان با میکروسکوپ فاز کنتراست مورد مشاهده قرارگرفتند؛ طی این مدت، مورفولوژی سلول‌ها در محیط تمایز دستخوش تغییر شدند، بدین ترتیب که با ادامه دوره تمایز در چاهک‌های مربوط به تمایز به استخوان، بعضی نقاط متراکم‌تر شدند و مناطق ندول‌مانند ایجاد و در چاهک‌های مربوط به تمایز به چربی، واکوئل‌های لیپیدی تشکیل‌شد. در پایان این دوره، تمایز سلولی به‌ترتیب با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین در (شکل ۲) و Oil red o (شکل ۳) ارزیابی‌شدند.

www.SID.ir

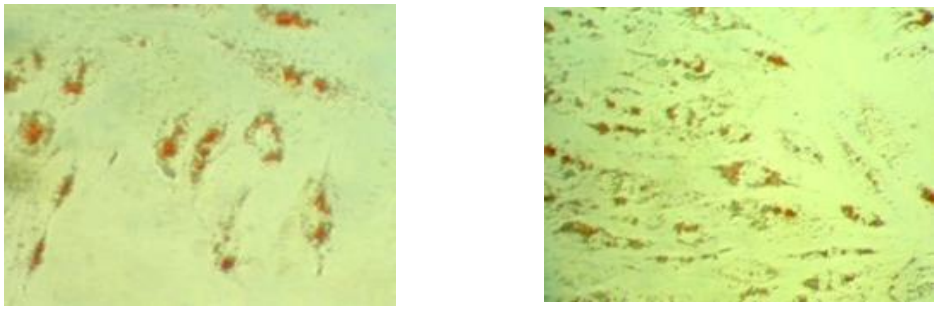
Archive of SID

A B



شکل ۲. نمای میکروسکوپ نوری تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در پاساژ دوم به استخوان (استئوسیت) با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد با بزرگ‌نمایی x۱۰۰ (A : باردار سالم و B : باردار مبتلا به پراکلامپسی)

A B



شکل ۳. نمای میکروسکوپ نوری تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در پاساژ دوم به چربی (آدیپوسیت) با رنگ‌آمیزی Oil red O با بزرگ‌نمایی x۱۰۰ (A : باردار سالم و B : باردار مبتلا به پراکلامپسی)

ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق-شده از بافت چربی

یکی دیگر از راه‌های اثبات ماهیت مزانشیمی این سلول‌ها، بررسی بیان مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق-شده از بافت چربی در دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی، CD105 ,(SH2/Endoglin)، CD73 (SH3)، CD44 و CD90(Thy-1) را بیان‌کردند؛ درمقابل، مارکرهای CD45 (به‌عنوان مارکر همه لکوسیت‌ها)، CD34 (مارکر سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک) و CD14 (مارکر ماکروفاژی) و HLA-DR در سطح این سلول‌ها بیانی اندک داشتند. در جدول ۲، نتایج درصد بیان مارکرها در یک نمونه آورده‌شده‌است؛ سایر نمونه‌ها نیز در همین حدود بودند.

جدول۲. بررسی برخی آنتی‌ژن‌های سطح سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در پاساژ دوم به روش فلوسایتومتری برحسب درصد

	CD-14	CD-34	CD-44	CD-45	CD-73	CD-90	CD-105	HLA-DR
باردار سالم	۵/۳۷	۴/۷۱	۴۳/۵۳	۴/۳۲	۵۳/۸۶	۴۲/۲۵	۱۱/۲۵	۶/۶
مبتلا به پراکلامپسی	۴/۶	۴/۷۶	۴۷/۴۳	۸/۵۹	۴۴/۱۳	۴۹/۸۷	۲۱/۸۲	۴/۰۹

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی

پس از پاساژ دوم، تعدادی مشخص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌داده‌شدند. بعد از گذشت ۳ تا ۵ روز و تکثیر سلول‌ها، سوپرناتانت سلول‌ها جمع‌آوری‌شدند و سنجش NO با استفاده از روش Griess، با بررسی نیتریت در محیط کشت ارزیابی‌شد. نتایج سنجش میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در هر دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی از آن، حاکی است که هیچ تفاوت معنی‌داری در ترشح نیتریک اکساید در این دسته از سلول‌ها در دو گروه مورد مطالعه وجودندارد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در پاساژ دوم در دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی

	تعداد	میانگین غلظت نیتریت (nmol/ml)	انحراف معیار (SD)	P-value
باردار سالم	۱۰	۰/۵	۰/۶۵	۰/۸۱
مبتلا به پراکلامپسی	۱۰	۰/۵۷	۰/۸۵	

این مقایسه برمبنای آزمون تی انجام‌گرفته‌است. مقدار $p<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار است.

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی‌های بالقوه خود در زمینه‌های زیست‌شناسی تکوینی و پزشکی توجه زیادی را به خود جلب‌کرده‌اند. فرایند سرکوب ایمنی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط موضعی با فاکتورهایی مانند NO و PGE2 و در شرایط سیستمیک توسط تغییر پاسخ ایمنی میزبان از TH-1/TH-17 به TH-2 القامی‌شود (۲۶). یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در سرکوب ایمنی القاشده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نیتریک اکساید است که یک مولکول زیستی فعال است. نیتریک اکساید و واسطه‌های فعال نیتروژنی مشتق‌شده از آن، می‌توانند با بسیاری از آنزیم‌ها، کانال‌های یونی و رسپتورها واکنش‌دهند. ازآنجاکه نیتریک اکساید، بسیار ناپایدار است، تنها به شکل موضعی عمل‌می‌کند. توانایی ایمونوساپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی ذاتی نیست و توسط سایتوکاین‌های التهابی، IFN-γ به همراه IL-1α,IL-1β یا TNF-α القامی‌شود. این سایتوکاین‌ها سبب افزایش بیان iNOS و کموکاین‌هایی مانند CXCL-9 و CXCL-10 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شوند که در فراخوانی سلول‌های ایمنی، شامل سلول‌های B ,T و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به نزدیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش‌دارند؛ بنابراین فراخوانی لنفوسیت‌ها با واسطه کموکاین‌ها، مرحله‌ای کلیدی در سرکوب ایمنی القاشده توسط NO است (۱۷).

در بارداری نرمال برای حفظ شرایط مطلوب، پاسخ‌های ایمنی از TH-1 به TH-2 شیفت‌می‌شوند، اما در پراکلامپسی این تغییر دیده‌نمی‌شود (۲۷)؛ بنابراین سطح سایتوکاین‌های التهابی در سرم مادر افزایش‌می‌یابد؛ درواقع، شرایط برای فعال‌سازی مقدماتی عملکرد ایمونوساپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهیاست.

در مطالعه حاضر، بررسی‌های تمایزیin vitro روی سلول‌های دو گروه مورد مطالعه، توانایی تمایز آنها را به استئوسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها نشان‌داد و تفاوتی در ویژگی‌های تمایزی آنها دیده‌نشد؛ همچنین بیان مارکرهایی مانند CD90, CD73, CD44 و CD105 و عدم بیان مارکرهایی مانند CD-14, CD34, CD45 و HLA-DR توسط فلوسایتومتری ارزیابی‌شد و تفاوتی یافت‌نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

رولفو[1] و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از پرزهای کوریونیک جفت در دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی نشان‌دادند که این سلول‌ها در هر دو گروه، از لحاظ بیان مارکرهایی مانند CD105, CD166, CD90 , CD73, مثبت و از لحاظ بیان مارکرهایی مانند HLAII, CD34, CD133, CD20, CD326, CD31, CD45 , CD14 منفی هستند (۹). *واگنر*[2] و همکاران در سال ۲۰۰۵، با مقایسه ویژگی‌های ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان، بافت چربی و خون بند ناف، نشان‌دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هر سه منبع، از لحاظ بیان مارکرهایی مانند CD34, CD36, CD38, CD10, CD14, CD24, CD31, CD45, CD49d, CD117, CD133, منفی و از لحاظ بیان مارکرهایی مانند CD13 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-ABC مثبت هستند (۲۸). نتایج مطالعه ما با مطالعات انجام‌شده درزمینه ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی همخوانی‌دارد.

همچنین یافته‌های پژوهش حاضر، بیانگر آن است که نتایج حاصل از سنجش میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی در دو گروه، تفاوتی معنادار ندارد. با وجود مطالعات انجام‌شده روی میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی(۲۹)، تاکنون مطالعه‌ای روی مقایسه میزان ترشح نیتریک اکساید توسط این دسته از سلول‌ها در بارداری نرمال و پراکلامپسی انجام‌نشده‌است.

در چندین مطالعه، میزان نیتریک اکساید در سرم یا پلاسمای زنان باردار نرمال و مبتلا به پراکلامپسی بررسی‌شده‌است. در برخی مطالعات، میزان این مدیاتور در زنان پراکلامپتیک نسبت‌به بارداران سالم، افزایش (۲۰)، در برخی کاهش‌یافته‌است (۲۱) و در برخی بدون تغییر (۲۲) مانده‌است. *کوکر*[3] و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کرده‌اند که کاهش سطح سرمی نیتریک اکساید در زنان پراکلامپتیک می‌تواند ناشی از کاهش افینیتی eNOS به کوفاکتور خود، افزایش تولید، آنیون سوپراکسید و افزایش استرس اکسیداتیو باشد (۲۱). در شرایط نرمال آنیون سوپراکسید توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز متابولیزه‌می‌شود. در پراکلامپسی، به موازات افزایش آنیون سوپراکسید، میزان آنزیم‌های آنتی-اکسیدان کاهش‌می‌یابد؛ بنابراین، آنیون سوپراکسید با نیتریک اکساید واکنش‌می‌دهد و آنیون پراکسی نیتریت تولیدمی‌شود؛ درنتیجه، افزایش آنیون سوپراکسید سبب افزایش آنیون پراکسی نیتریت و کاهش نیتریک اکساید در دسترس می‌شود. کاهش نیتریک اکساید، سبب اختلال در عملکرد اندوتلیال، انقباض عروق و کاهش تهاجم تروفوبلاستی می‌شود(۳۰).

درمقابل در سال ۲۰۰۰، *شامش*[4] و همکاران در مطالعه خود گزارش‌کرده‌اند که افزایش سطح سرمی نیتریک اکساید در زنان پراکلامپتیک می‌تواند نشان‌دهنده نقش جبرانی/حفاظتی این مدیاتور در حفظ جریان خون مادری- جنینی و کاهش چسبندگی پلاکت‌ها باشد (۲۰).

لازم به توضیح است که از محدودیت‌ها و مشکلات این پژوهش می‌توان به نمونه‌گیری دشوار به علت زایمان پیش از موعد و اورژانسی افراد مبتلا به پراکلامپسی و همچنین دیررشدبودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی و احتمال بالای آلودگی آنها اشاره‌کرد.

در مطالعه حاضر، این انتظار وجودداشت که در شرایط پراکلامپتیک، با توجه به غلبه سایتوکاین‌های التهابی، شاهد افزایش عملکرد ایمونوساپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشیم و میزان ترشح نیتریک اکساید به‌عنوان مهم‌ترین عامل در این فرایند افزایش‌یابد ولی برخلاف انتظار، نتایج حاصل، تغییری معنادار در میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنان پراکلامپتیک نسبت‌به گروه کنترل نشان‌نداد.

در کل از یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه-گرفت که به‌احتمال، نیتریک اکساید ترشح‌شده توسط

[1] - Rolfo
[2] - Wagner
[3] - Kukor
[4] - Shaamash

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در تغییرهای سطح سرمی این فاکتور و همچنین در پاتولوژی پراکلامپسی نقشی معنی‌دار ندارد؛ البته برای تأیید این موضوع، لازم است که میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت‌هایی دیگر، مانند پرزهای کوریونیک جفت در دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی نیز بررسی‌شود و همچنین این مطالعه روی تعدادی بیشتر نیز آزمایش‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد است که با حمایت مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی انجام‌شده‌است.

منابع

1. Stennett AK, Khalil RA. Neurovascular mechanisms of hypertension in pregnancy. Curr Neurovasc Res. 2006;3(2):131–148.
2. Cerdeira AS, Karumanchi SA. Angiogenic factors in preeclampsia and related disorders. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(11).
3. Allahyari El, Rahimi Foroushani A, Zeraati H, Mohammad K, Taghizadeh Z. A predictive model for the diagnosis of preeclampsia. J Reprod Infertil. 2010; 10(4): 261.
4. Lorquet S, Pequeux C, Munaut C, Foidart JM. Aetiology and physiopathology of preeclampsia and related forms. Acta Clin Belg. 2010;65(4):237-41.
5. Stennett AK, Khalil RA. Neurovascular mechanisms of hypertension in pregnancy. Curr Neurovasc Res. 2006;3(2):131–148.
6. Gilberth E, Smith J. Manual of high risk pregnancy & delivery. 3rd ed. NewYork: Mosby;2003: 362.
7. Schaaps JP, Tsatsaris V, Goffin F. Shunting the intervillous space: new concepts in human uteroplacental vascularization. Am J Obstet Gynecol. 2005; 192: 323-332.
8. Mustafa R, Ahmed S, Gupta A, Venuto RC. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. J Pregnancy. 2012; 105918.
9. Rolfo A, Giuffrida D, Nuzzo AM, Pierobon D, Cardaropoli S, Piccoli E, et al. Pro-inflammatory profile of preeclamptic placental mesenchymal stromal cells: new insights into the etiopathogenesis of preeclampsia. PloS One. 2013;8(3): 59403.
10. Semenov OV, Koestenbauer S, Riegel M, Zech N, Zimmermann R, Zisch AH, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. Am J Obstet Gynecol. 2010;202(2):193-13.
11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cellbased therapies. Tissue Eng. 2001; 70(2): 211-28.
12. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells. 2004; 22(4): 625-34.
13. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med. 2004; 200(2): 123-35.
14. Zvaifler NJ, Adams ML. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res. 2000; 2: 477–488.
15. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. Stem Cells. 2004; 22(5): 649-58.
16. Lee JM, Jung J, Lee HJ, Jeong SJ, Cho KJ, Hwang SG, et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. Int Immunopharmacol. 2012;13(2):219-24.
17. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell. 2008;2(2):141-50.
18. Schiessl B, Strasburger C, Bidlingmaier M, Mylonas I, Jeschke U, Kainer F, et al.
Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic guanosinemonophosphate in
intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. Arch Gynecol Obstet. 2006;274(3):150–154.
19. Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. Circ Res. 2000;87:406–411.
20. Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhlouf AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, EL-dien HM.
Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre eclampsia and eclampsia. Int J Gynaecol Obstet. 2000;68(3):207-14.
21. Kukor Z, Valent S.[Nitric oxide and preeclampsia]. Orv Hetil. 2010;151(52):2125-35.
22. Diejomaoh FM, Omu AE, Al-Busiri N, Taher S, Al-Othman S, Fatinikun T, et al.
Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. Arch Gynecol Obstet. 2004;269(4):237-43.
23. Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. Am J Physiol. 1999;277(2 Pt 2): 848-54.
24. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. .2008;45(2):115-20.
25. Miranda KM, Espey MG, Wink DA .A rapid, simple spectrophotometric method for

www.SID.ir

Archive of SID

simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide.2001; 5: 62–71.
26. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. PLoS One. 2010; 5(12): 4247.
27. Mansouri R, Akbari F, Vodjgani M, Mahboudi F, Kalantar F, Mirahmadian M. Serum cytokines profiles in Iranian patients with preeclampsia. Iran J Immunol. 2007;4(3):179-85.
28. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol. 2005;33(11):1402-16.
29. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood. 2007;109(1):228-34.
30. Groesch KA, Torry RJ, Wilber AC, Abrams R, Bieniarz A, Guilbert LJ, et al. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. Placenta. 2011;32(12):926-31.

www.SID.ir

Archive of SID

Daneshvar

Medicine

Comparison of nitric oxide secretion by human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in healthy pregnant women and those with preeclampsia

Ensie Sadat Mirsharif[1], Sakine Moaied Mohseni[2*], Eisa Salehi[3], Seyed Mahmoud Hashemi[4], Tooba Ghazanfari[5]

1. M.Sc of Immunology - Shahed University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor - Obstetrics and Gynecology Department and Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor - Immunology Department, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Ph.D of Immunology - Stem Cell Biology Department, Bonyakhteh Technology Research Center, Tehran, Iran.
5. Professor - Immunology Department, Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: smmohseni@yahoo.com

Background and Objective: Preeclampsia is one of the most common complications during pregnancy that occurs after 20th weeks of pregnancy in women with normal blood pressure. The pathophysiology of this disease is unknown. Due to changes in serum level of nitric oxide in women with preeclampsia and also the important role of mesenchymal stem cells in the secretion of nitric oxide as an immunoregulator, in this study, we aimed to evaluate the level of nitric oxide in secretions of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in women with normal pregnancy and patients with preeclampsia.

Materials and Methods: Subcutaneous adipose tissue of 10 preeclamptic patients and 10 healthy pregnant women was collected during cesarean operation. After isolation and proliferation of mesenchymal stem cells, capablity of their differentiation and their immunophenotyping charactetistics were assessed. Then, their release of nitric oxide was evaluated using Griess method.

Results: Stem cells isolated from adipose tissue in both groups differentiated into osteocyte and adipocytes. Flow-cytometric analysis showed the expression of the markers CD90, CD73 CD44 and CD105 and lack of expression of the markers CD-14, CD34, CD45 and HLA-DR in both groups. No significant change was observed for the level of nitric oxide secretion in both groups.

Conclusion: The present results suggest that nitric oxide secreted by mesenchymal stem cells do not have a significant contribution in variation of serum level of this factor and possibly do not play a role in the pathology of preeclampsia. However, such study with a higher sample size is suggested.

Keywords: Nitric oxide, Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Preeclampsia.

Scientific-Research Journal of Shahed University Twenteeth Year, No.105 June- July, 2013

Received: 2013/7/6
Last revised: 2013/9/2
Accepted: 2013/9/3

www.SID.ir