

دانشور پزشکی

مقایسه میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در زنان باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی نویسندگان: انسیه سادات میرشریف^۱، سکینه موید محسنی^{۲*}، عیسی صالحی^۳، سید محمود هاشمی^۴، طویی غضنفری^۵

- ۱- دانش آموخته 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
 - ۴- دکترای ایمونولوژی، گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، تهران، ایران
 - ۵- استاد گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
- * نویسنده مسئول: سکینه موید محسنی
E-mail: smmohseni@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: پراکلامپسی یکی از عوارض شایع دوران بارداری است که بعد از هفته بیستم بارداری در زنان با فشار خون طبیعی بروز می‌کند؛ 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 به عنوان تنظیم‌کننده ایمنی، در این پژوهش برآن شدیم تا سطح نیتریک اکساید را در ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در دو گروه باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی بسنجیم.

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

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

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن است که به احتمال، نیتریک اکساید ترشح شده 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 آزمایش شود.

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

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

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

مقدمه

اختلال‌های فشار خون در دوران بارداری، اختلال‌هایی شایع هستند که همراه با خون‌ریزی و عفونت، یکی از سه علت اصلی مرگ‌ومیر زنان باردار در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. به افزایش فشار خون همراه با دفع پروتئین در ادرار، «پراکلامپسی» اطلاق می‌شود (۱). پراکلامپسی، یکی از عوارض شایع دوران بارداری است که بعد از هفته بیستم بارداری در زنان با فشار خون طبیعی بروز می‌کند؛ میزان شیوع این بیماری ۳ تا ۸ درصد است (۲)؛ در مطالعه‌ای میزان شیوع آن در ایران ۶/۴ درصد تخمین زده شده است (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 منجر می‌شود (۷-۴).

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

اغلب مطالعات انجام شده از آن حکایت دارند که سلول‌های تروفوبلاست، مسئول تغییرهای ایجاد شده در پراکلامپسی هستند؛ درحالی‌که جفت انسان، ارگانی هتروژن بوده، شامل جمعیت‌های سلولی مختلف مانند سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های پروژنیاتور، میوفیبروبلاست و سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که همگی در حفظ عملکرد جفت نقش دارند. به‌تازگی در مطالعه‌ای نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از جفت، با ترشح فاکتورهای پاراکرین بر رگزایی و با فعالیت‌های ضدالتهابی و ضد-فیبروتیک خود در حفاظت در مقابل آسیب ایسکمیک نقش دارند (۹)؛ بنابراین، این احتمال وجود دارد که اختلال در فعالیت‌های ضدالتهابی و پروآنژیوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاتوژنز پراکلامپسی

نقش داشته باشد.

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 (۱۴) نیز جدا شده‌اند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی، از لحاظ مورفولوژی و بیان مارکرهای سطحی، مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان و جفت بوده، از لحاظ رفتار سلولی در محیط کشت و قدرت تمایزی به سلول‌های استخوان، غضروف و چربی با یکدیگر تفاوتی ندارند (۱۵ و ۱۶)؛ از مزیت‌های جداسازی این دسته از سلول‌ها از بافت چربی نسبت به 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 ایمنوساپرسیو هستند؛ یکی از مهم‌ترین 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 عمل می‌کند. در حاملگی نرمال، تغییرهای قلبی-عروقی مانند افزایش ضربان قلب، برون‌ده قلبی، حجم خون سبب افزایش تولید نیتریک اکساید (NO) می‌شود (۱۸ و ۱۹). 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

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی

جداسازی و کشت سلول‌های بافت چربی مشابه روش بونل^۲ و همکارانش (۲۴) 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 به منظور هضم در کلاژناز ۰/۰۷۵ درصد (GIBCO)، در انکوباتور مرطوب ۳۷°C و ۵ co2 درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند؛ سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. 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 قرار داده شده و هر ۲۴ ساعت یکبار از لحاظ مورفولوژی و روند رشد بررسی شدند.

فلاسک‌ها هر ۳ تا ۴ روز یکبار به مدت دو هفته تعویض محیط شدند؛ سپس پاساژ اول صورت گرفت، به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از ۰/۲۵٪ Trypsin (Sigma) از کف ظروف کشت کنده شده، اثر آنزیم با محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد و ۱ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین ختنی شد؛ سپس سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم مناسب برای بار دوم پاساژ داده شدند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت و استئوسیت

پس از پاساژ دوم و تهیه سوسپانسیون سلولی، در پلیت‌های ۲۴ خانه، توانایی تمایز به استخوان و چربی بررسی شد. پس از گذشت ۳ تا ۴ روز و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، محیط اختصاصی تمایز به چربی و استخوان جایگزین شد. لازم به توضیح است که محیط‌های اختصاصی تمایزی از شرکت بن‌یاخته خریداری-

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 ارزیابی کنیم. 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 قرار گرفتند، نمونه‌گیری شد. 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 ۱۴۰ میلی‌متر جیوه و وجود پروتئین در ادرار در حد ۳۰۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ 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^۱، 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) تأمین شدند. نمونه‌های بافت چربی در ظروف استریل دردار که حاوی بافر-phosphate (buffered saline) همراه با ۵ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (Sigma) بودند، به آزمایشگاه منتقل شدند.

² - Bunnell

¹ - Hemolysis elevated liver enzymes low platelet count

سنجش نیتریک اکساید (NO)

پس از پاساژ دوم و تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد ۱۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی، شمارش و در پلیت‌های ۲۴ خانه ریخته‌شد. پس از گذشت ۳ تا ۵ روز و تکثیر آنها، سوپرناتانت سلول‌ها جمع‌آوری و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سنجش NO با استفاده از روش Griess، با سنجش نیتريت در محیط کشت ارزیابی شد که اساس این روش رنگ‌سنجی، تشکیل رنگ از دی‌آزوتاسیون به کمک نیتريت 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 برداشته شد 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 ترکیب شد و توسط دستگاه قرائتگر الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با سنجش طول موج غلظت‌های مختلف معرف NO (NaNO₂) محاسبه شد و با توجه به منحنی رسم شده، غلظت نیتريت نمونه‌ها محاسبه شد.

یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک و بالینی گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است؛ همان‌طور که در این جدول نشان داده شده است، هیچ تفاوت معناداری میان متغیرهای سن مادر و نمایه توده بدن در دو گروه زنان باردار سالم و مبتلا به پراکلامپسی وجود نداشت؛ در مقابل، تفاوت آماری معنی‌داری، میان سن بارداری در هنگام زایمان، فشار خون سیستمیک، فشار خون دیاستولیک و وزن نوزاد در هنگام تولد میان دو گروه وجود داشت.

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 و 50 μg/ml اسکوربات ۲ فسفات است. هر ۳ تا ۴ روز یک‌بار محیط‌ها تعویض شدند. پس از گذشت حدود ۱۴ تا ۲۱ روز، محیط‌های تمایزی تخلیه شدند و پس از تثبیت با محلول پارافرمالدهید، شستشوداده شدند. با اضافه کردن محلول Oil Red-O به چاهک‌های مربوط به تمایز به چربی، واکوئل‌های لیپیدی خنثی و با اضافه کردن محلول Alizarin Red 1% به چاهک‌های مربوط به تمایز به استخوان، رسوب کلسیم فسفات در زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

بررسی‌های فلوسیتومتری

پس از پاساژ دوم و تهیه سوسپانسیون سلولی، حجمی مناسب از آن که حاوی ۱×۱۰^۶ سلول بود داخل لوله‌های فلوسایتومتری ریخته شد و با مقادیری مناسب از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با فلوئورسین ایزوتیوسیانیات (FITC) ضد مارکرهای CD-45، CD-105 و CD-34 و نیز آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با فیکواریترین (PE) ضد مارکرهای CD-44 و CD-73، HLA و CD-14، DR، CD-90 در دمای ۴° در تاریکی به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. تمامی مونوکلونال آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت BD Pharmingen خریداری شدند. در مرحله بعد، سلول‌ها با PBS شستشو و سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده فرمالین اضافه شدند و بررسی‌های ایمونوفلورسانس با استفاده از دستگاه و بررسی‌های ایمونوفلورسانس با استفاده از دستگاه (Becton Dickinson) FACSCalibur انجام و یافته‌ها با نرم‌افزار Cyflogic (CyFlo Ltd.) آنالیز شدند.

جدول ۱. مقایسه پارامترهای دموگرافیک و مامایی در دو گروه مورد مطالعه

متغیر	باردار 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

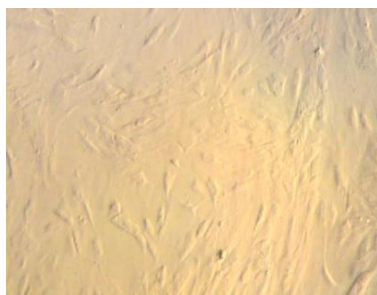
میانگین ± انحراف معیار، مقایسه بر مبنای آزمون تی و Man-witney انجام گرفته است. * مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار است.

مورفولوژی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی

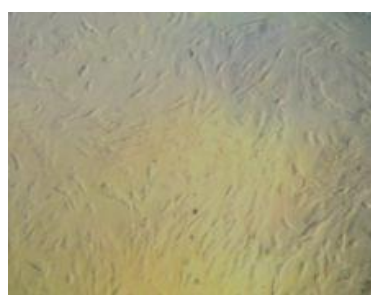
بعد از هضم آنزیماتیک بافت چربی و کشت آن، پس از دو هفته تک‌لایه‌ای از سلول‌های به‌طور عمده کشیده فیبروبلاستی تشکیل شد؛ این جداسازی براساس خاصیت چسبندگی سلول‌های مزانشیمی به ظروف کشت، صورت-

گرفت. در پاساژهای بعدی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی خالص‌تر شدند و از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی شکل) شباهت یافتند. نتایج مشاهدات مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس، در شکل ۱ آمده است.

A



B

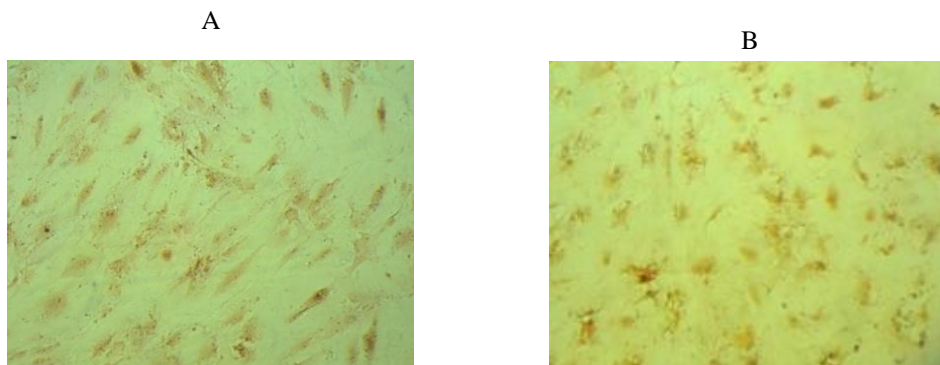


شکل ۱. مورفولوژی دوکی شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در پاساژ دوم در نمای میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی $\times 100$ (A: باردار سالم و B: باردار مبتلا به پراکلامپسی)

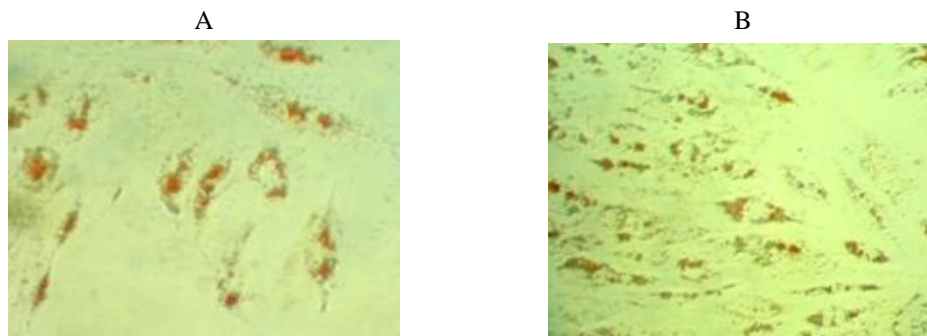
تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی به استخوان و چربی

سلول‌های پاساژ دوم به مدت ۱۴ تا ۲۱ روز در محیط‌های اختصاصی تمایز به استخوان و چربی قرار گرفتند و به‌طور چند روز در میان با میکروسکوپ فاز کنتراست مورد مشاهده قرار گرفتند؛ 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 ندول مانند ایجاد و در چاهک‌های مربوط به تمایز به چربی، واکوئل‌های لیپیدی تشکیل شد. در پایان این دوره، تمایز سلولی به ترتیب با روش رنگ‌آمیزی آلزارین در (شکل ۲) و Oil red o (شکل ۳) ارزیابی شدند.



شکل ۲. نمای میکروسکوپ نوری تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در پاساژ دوم به استخوان (استئوسیت) با رنگ آمیزی آلیزارین رد با بزرگ‌نمایی $\times 100$ (A: باردار سالم و B: باردار مبتلا به پراکلامپسی)



شکل ۳. نمای میکروسکوپ نوری تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در پاساژ دوم به چربی (آدیپوسیت) با رنگ آمیزی Oil red O با بزرگ‌نمایی $\times 100$ (A: باردار سالم و B: باردار مبتلا به پراکلامپسی)

ایمونوفلوروسانس سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی، 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،

ایمونوفلوروسانس 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،

جدول ۲. بررسی برخی آنتی‌ژن‌های سطح سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده 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

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

پس از پاساژ دوم، تعدادی مشخص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شدند. بعد از گذشت ۳ تا ۵ روز و تکثیر سلول‌ها، سوپرناتانت سلول‌ها جمع‌آوری شدند و سنجش NO با استفاده از روش Griess، با بررسی نیتریت در محیط کشت ارزیابی شد. نتایج

سنجش میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده 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 وجود ندارد (جدول ۳).

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

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

این مقایسه بر مبنای آزمون تی انجام گرفته است. مقدار $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار است.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شوند که در فراخوانی سلول‌های ایمنی، شامل سلول‌های T، B و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به نزدیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش دارند؛ 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 شیف‌ت می‌شوند، اما در پراکلامپسی این تغییر دیده نمی‌شود (۲۷)؛ بنابراین سطح سایتوکاین‌های التهابی در سرم مادر افزایش می‌یابد؛ در واقع، شرایط برای فعال‌سازی مقدماتی عملکرد ایمونوساپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهیاست.

در مطالعه حاضر، بررسی‌های تمایزی *in vitro* روی سلول‌های دو گروه مورد مطالعه، توانایی تمایز آنها را به استئوسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها نشان داد و تفاوتی در ویژگی‌های تمایزی آنها دیده نشد؛ همچنین بیان مارکرهایی مانند CD44، CD73، CD90، CD105 و عدم بیان مارکرهایی مانند CD14، CD34، CD45 و HLA-DR توسط فلوسایتومتری ارزیابی شد و تفاوتی یافت نشد.

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 جلب کرده‌اند. 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 نیتروزنی مشتق شده از آن، می‌توانند با بسیاری از آنزیم‌ها، کانال‌های یونی و رسپتورها واکنش-دهند. از آنجاکه نیتریک اکساید، بسیار ناپایدار است، تنها به شکل موضعی عمل می‌کند. توانایی ایمونوساپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی ذاتی نیست و توسط سایتوکاین‌های التهابی، $\text{IFN-}\gamma$ به همراه $\text{IL-1}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ یا $\text{TNF-}\alpha$ القامی‌شود. این سایتوکاین‌ها سبب افزایش بیان iNOS و کموکاین‌هایی مانند CXCL-9 و CXCL-10 در

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 متابولیزه می‌شود. در پراکلامپسی، به موازات افزایش آنیون سوپراکسید، میزان آنزیم‌های آنتی-اکسیدان کاهش می‌یابد؛ بنابراین، آنیون سوپراکسید با نیتریک اکساید واکنش می‌دهد و آنیون پراکسی نیتريت تولید می‌شود؛ در نتیجه، افزایش آنیون سوپراکسید سبب افزایش آنیون پراکسی نیتريت و کاهش نیتریک اکساید در دسترس می‌شود. کاهش نیتریک اکساید، سبب اختلال در عملکرد اندوتلیال، انقباض عروق و کاهش تهاجم تروفوبلاستی می‌شود (۳۰).

در مقابل در سال ۲۰۰۰، شامش^۴ و همکاران در مطالعه خود گزارش کرده‌اند 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 دیررشد بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی و احتمال بالای آلودگی آنها اشاره کرد.

در مطالعه حاضر، این انتظار وجود داشت 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 افزایش یابد ولی برخلاف انتظار، نتایج حاصل، تغییری معنادار در میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنان پراکلامپتیک نسبت به گروه کنترل نشان‌نداد.

در کل از یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گرفت که به احتمال، نیتریک اکساید ترشح شده توسط

رولفو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرزهای کوریونیک جفت در دو گروه بارداری سالم و مبتلا به پراکلامپسی نشان دادند که این سلول‌ها در هر دو گروه، از لحاظ بیان مارکرهایی مانند CD105, CD166, CD73, CD90 مثبت و از لحاظ بیان مارکرهایی مانند CD14, CD31, CD45, CD20, CD326, CD133, CD34, HLAII, CD14 منفی هستند (۹). واگنر^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۵، با مقایسه ویژگی‌های ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان، بافت چربی و خون بند ناف، نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هر سه منبع، از لحاظ بیان مارکرهایی مانند CD34, CD36, CD38, CD10, CD14, CD24, CD31, CD133, CD117, CD49d, CD45, CD133, CD117, CD133, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD90, CD90 مارکرهایی مانند CD105, CD166, HLA-ABC مثبت هستند (۲۸). نتایج مطالعه ما با مطالعات انجام شده در زمینه ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی همخوانی دارد.

همچنین یافته‌های پژوهش حاضر، بیانگر آن است که نتایج حاصل از سنجش میزان ترشح نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در دو گروه، تفاوتی معنادار ندارد. با وجود مطالعات انجام شده 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 انجام نشده است.

در چندین مطالعه، میزان نیتریک اکساید در سرم یا پلاسمای زنان بارداری نرمال و مبتلا به پراکلامپسی بررسی شده است. در برخی مطالعات، میزان این مدیاتور در زنان پراکلامپتیک نسبت به بارداری سالم، افزایش (۲۰)، در برخی کاهش یافته است (۲۱) و در برخی بدون تغییر (۲۲) مانده است. کوکر^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۰

¹ - Rolfo

² - Wagner

³ - Kukor

⁴ - Shaamash

تعدادی بیشتر نیز آزمایش شود.

تشکر و قدردانی

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

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. New York: 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, Makhlof 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, Flaatt 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

- 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.

Daneshvar

Medicine

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

Received: 2013/7/6

Last revised: 2013/9/2

Accepted: 2013/9/3

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

Ensie Sadat Mirsharif¹, Sakine Moaied Mohseni^{2*}, Eisa Salehi³, Seyed Mahmoud Hashemi⁴, Tooba Ghazanfari⁵

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, capability of their differentiation and their immunophenotyping characteristics 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.