**مقاله پژوهشی**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۲۱، اردیبهشت ۱۴۰۱، ۲۲۰-۲۰۷**

# ارزیابی تغییرات متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی: یک مطالعه آزمایشگاهی

**مینا نیک‌آسا[۱]، مهرداد نوروزی‌نیا[۲]، مجید فرش‌دوستی حق[۳]**

**دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۹/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۲/۰۵**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** فرآیندهای کنترلی در تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنوز به طور کامل شناخته نشده است. مکانیسم‌های اپی ژنتیک مخصوصاً متیلاسیون جزایر CpG در پروموتر ژن‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های کنترلی در تمایز سلول‌های بنیادی مطرح است. این‌که در فرآیند تمایز تنها متیلاسیون برخی از ژن‌های خاص تغییر می‌یابد یا متیلاسیون تام ژنوم دست‌خوش تغییرات می‌گردد، مورد بحث است. لذا در این تحقیق وضعیت متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی و هم‌چنین در تیمار با داروی زولدرونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش آزمایشگاهی پس از کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، القاء تمایز استئوبلاستی با استفاده از محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید صورت گرفت. استخراج DNA در هفته اول، دوم و سوم تمایز و هم‌چنین از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته صورت گرفت. وضعیت متیلاسیون تام ژنوم با استفاده از آنتی بادی بر علیه ۵-متیل سیتوزین ارزیابی شد. برای تحلیل داده از آزمون طرح اندازه‌گیری مکرر استفاده شد.

**یافته‌ها:** در طول تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی وضعیت متیلاسیون تام ژنوم تغییر پیدا نکرد (p=۰/۰۹۳). هم‌چنین تیمار با داروی زولدرونیک اسید بر روی متیلاسیون تام ژنوم تأثیر نداشت (p=۰/۰۵۷).

**نتیجه‌گیری:** تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از محیط تمایزی و نیز در تیمار با داروی زولدرونیک اسید، با تغییر متیلاسیون تام ژنوم همراه نیست. بنابراین فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست‌ها یک مسیر منحصر به فرد بوده و احتمالاً سایر مکانیسم‌های ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در کنترل آن ایفای نقش می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** استئوبلاست، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز، متیلاسیون تام ژنوم، زولدرونیک اسید

۱- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۲- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تلفن: ۳۳۳۶۴۶۶۵-۰۴۱، دورنگار: ۳۳۳۶۴۶۶۴-۰۴۱، پست الکترونیکی: m.farshdousti@gmail.com

## مقدمه

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ( Mesenchymal Stem Cells; MSCs) به استئوبلاست‌ها یک پروسه تکاملی به شدت کنترل شده‌ای می‌باشد که تعداد زیادی از عوامل بیرونی مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، مسیرهای پیام رسان و فاکتورهای رونویسی و غیره در آن دخالت دارند. فهم مکانیسم‌های دخیل در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست از بحث‌های مهمی در بیولوژی استخوان بوده و اهداف درمانی جدید را در درمان بیماری‌های استخوانی پیش روی محققیق قرار می‌دهد [۱].

تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها توسط فاکتورهای نسخه‌برداری زیادی شامل فاکتورهای نسخه‌برداری از خانواده پروتئین‌های مارپیچ-حلقه-مارپیچ (Helix-Loop-Helix)، پروتئین‌های انگشت روی (Zinc Finger)، پروتئین‌های قیچی لوسین (Lucine Zipper) و پروتئین‌های حاوی دومن Runt، و هم‌چنین پروتوانکوژن‌هایی همانند C-myc، C-jun و C-fos تحت کنترل و تنظیم است. قابلیت تمایز MSCs به رده‌های مختلف سلولی از جمله استئوبلاست به دلیل پتانسیل بیان ژن‌ها یا فاکتورهای نسخه‌برداری اختصاصی دخیل در تمایز می‌باشد. دو فاکتور نسخه‌برداری اختصاصی رده استئوبلاستیک شامل RUNX2 و OSTERIX (SP7) می‌باشد [۳-۲]. این فاکتورهای نسخه‌برداری ژن‌های اختصاصی استئوبلاستی شامل استئوکلسین، استئوپونتین، کلاژن تایپ IαI و سیالوپروتئین استخوانی (Bone Sialoprotein) را مورد رونویسی قرار می‌دهند. سایر فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در تمایز استئوبلاستی شامل TWIST1، ZBTB16، DLX5، MSX2، FRA1، DLX3، ATF4 و C/EBP هستند [۴]. نقش تغییرات متیلاسیون ناحیه پروموتوری اکثر این ژن‌ها و نیز الگوی بیان آن‌ها در تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد شناسایی قرار گرفته است و نشان دهنده تغییرات الگوی متیلاسیون ناحیه پروموتوری ژن‌های اختصاصی رده استئوبلاستی در طول تمایز اسئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد [۹-۵]. در عین حال اطلاعاتی که نشان دهنده تغییرات متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد می‌تواند اطلاعات تکمیل کننده‌ای را در این زمینه ارائه دهد.

زولدرونیک اسید یک آمینو بی فسفونات و مهارکننده قوی بازجذب استخوان و در عین حال فعال‌کننده استئوبلاست‌ها در استخوان سازی می‌باشد. از این دارو جهت پیشگیری از حوادث اسکلتی در بیمارانی که دچار بدخیمی‌های پیشرفته استخوانی شده‌اند و هم‌چنین در درمان برخی اختلالات استخوانی که با افزایش Turn over استخوان همراه‌اند مثل بیماری پاژه و استئوپروز استفاده می‌شود [۱۱-۱۰]. مکانیسم اصلی این دارو مهار استئوکلاست‌ها و در نتیجه مهار بازجذب کلسیم از استخوان‌ها است، اما در عین حال این دارو با تسریع در تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش تعداد و نیز فعالیت استئوبلاست‌ها

می‌گردد [۷] که مکانیسم ملکولی آن هنوز به خوبی شناخته نشده است.

مکانیسم اصلی برای تغییرات اپی ژنتیک DNA ژنومی، هیپرمتیلاسیون جزایر CpG در ژن‌های اختصاصی و هیپومتیلاسیون کلی DNA می‌باشد [۱۲]. پروسه متیلاسیون DNA شامل انتقال گروه متیل از S-آدنوزیل-L-متیونین توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز ( DNA Methyl Transferase; DNMT) بر روی کربن شماره ۵ سیتوزین می‌باشد. متیلاسیون DNA اختصاصی ناحیه ( Region Specific) عمدتاً در دی نوکلئوتیدهای CpG درون پروموتر یا اگزون اول ژن‌ها یافت می‌شود که یک مسیر مهم برای مهار نسخه‌برداری ژن است [۱۳].

آنالیز متیلاسیون تام ژنوم یک تصویر کلی از تغییرات متیلاسیون DNA در گستره ژنوم ارائه می‌دهد و هم‌چنین مقایسه مناسبی بین وضعیت متیلاسیون یک ژن و وضعیت متیلاسیون تام ژنوم ایجاد می‌کند. اهمیت بررسی تغییرات متیلاسیون تام ژنوم و مقایسه آن با متیلاسیون ژن‌های اختصاصی در این است که آیا وضعیت متیلاسیون ژن‌های اختصاصی متأثر از تغییرات متیلاسیون تام ژنوم هستند یا این‌که وضعیت متیلاسیون ژن‌ها، اختصاصی بوده و مربوط به پروسه تمایز سلول‌ها است؟ از طرف دیگر بررسی متیلاسیون تام ژنوم نشان می‌دهد که آیا وضعیت متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز تغییر می‌کند یا نه؟ [۱۴] با توجه به اهمیت پاسخ به این سؤالات، در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از محیط تمایزی استئوبلاستی و هم‌چنین در تیمار با داروی زولدرونیک اسید به سمت استئوبلاست‌ها تمایز داده شدند و تغییرات اپی‌ژنتیک به صورت تغییرات متیلاسیون تام ژنوم مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۹ با کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1398.242 در دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان از مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته تهران تهیه گردید. این سلول‌ها در مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته از نظر توانایی تمایز به رده‌های آدیپوژنیک، کندروژنیک و استئوژنیک مورد ارزیابی قرار گرفته و تأیید شده بودند. ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری قبلاً مورد تأیید قرار گرفته بود [۱۵]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با شمارش ۳۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر در فلاسک کشت سلول T۷۵ به همراه ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)-low glucose (Gibco) و ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنیسیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (مدل ۳۴۸۷، شرکت بهداد، ایران) با دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند [۱۶]. سلول‌های کشت داده شده بعد از رسیدن به تراکم ۷۰-۶۰ درصد با تریپسین جدا شده و تعدادی از سلول‌ها مجدداً پاساژ داده شده و تعداد دیگر

جهت القاء تمایز استئوبلاستیک و تیمار با داروی زولدرونیک اسید مورد استفاده قرار گرفتند.

تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ دوم 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 با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار، بتا گلیسرول فسفات با غلظت نهایی ۵ میلی مولار و آسکوربات-۲-فسفات با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. نمونه برداری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزنیافته (روز ۰) و سلول‌های استئوبلاستی تمایزیافته (هفته اول، دوم و سوم) صورت گرفت [۱۷].

ویال‌های حاوی ۴ میلی‌گرم پودر داروی زولدرونیک اسید از نمایندگی شرکت دارویی نوارتیس (Novartis pharma, Basel, Switzerland) در تهران تهیه گردید. این دارو در محیط کشت حل گردید. از غلظت نهایی ۵ میکرومولار زولدرونیک اسید در محیط کشت، جهت تیمار به مدت ۳ ساعت استفاده شد که اصطلاحاً تیمار ضربانی (Pulse Treatment) طبق مطالعات قبلی صورت گرفت. سپس محیط کشت تخلیه شده و با PBS شستشو داده شد. نهایتاً محیط تمایزی بر روی آن‌ها اضافه شد و به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. علاوه بر سلول‌های تیمارشده با زولدرونیک اسید، MSCs بدون تیمار به عنوان کنترل کشت داده شدند. نمونه برداری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز ۰) و سلول‌های استئوبلاستی تیمار شده در بازه زمانی هفته اول، دوم و سوم صورت گرفت [۱۸].

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد برای تأیید تمایز استئوبلاستی استفاده گردید. برای انجام این آزمایش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. گروهی از سلول‌ها با محیط تمایزی استئوبلاستی و گروهی با داروی زولدرونیک اسید تیمار شدند و گروهی هم به عنوان کنترل بدون تیمار کشت داده شدند. رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۲۱ کشت انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی در روز ۲۱، محیط کشت تخلیه شده و سلول‌ها با PBS شستشو شدند. فرمالدهید ۴۰ درصد جهت فیکساسیون استفاده شد و مجدد با PBS شستشو شدند. نهایتاً آلیزارین رد ۱ درصد اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با آب مقطر شستشو شده و وجود یا عدم وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم در زیر میکروسکوپ معکوس (مدل CKX53، شرک الیمپوس، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۹].

تعداد $۳-۴\times۱۰^{۶}$ سلول از هر فلاسک T75 جهت استخراج DNA ژنومی سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید (روز ۷، ۱۴ و ۲۱) و نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Roche طبق پروتکل مورد استفاده قرار گرفتند. کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد. مقدار DNA استخراج شده به واسطه جذب در طول

موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. خلوص DNA استخراج شده از طریق نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد [۲۰].

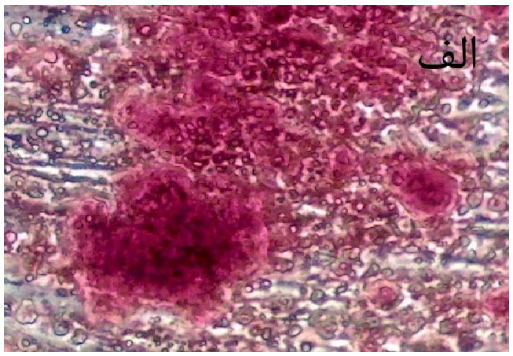
تغییرات متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تأثیر محیط تمایزی و هم‌چنین در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمارشده با داروی زولدرونیک اسید با استفاده از کیت Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit (Epigentek Group Inc., NY, USA) با استفاده از تکنیک الایزا به صورت Triplicate مورد سنجش قرار گرفت. اساس کیت، استفاده از آنتی بادی اختصاصی بر علیه ۵-متیل سیتوزین جهت ارزیابی متیلاسیون تام ژنوم می‌باشد. درصد متیلاسیون تام ژنوم با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود [۲۱]:

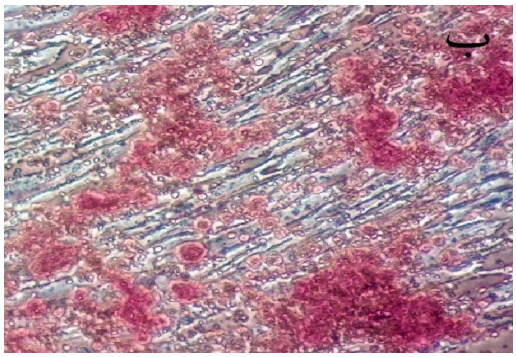
$$\text{Methylation \%} = \frac{\text{OD (Sample – Blank)/2}}{\text{OD (Positive Control – Blank)}} \times 100\%$$

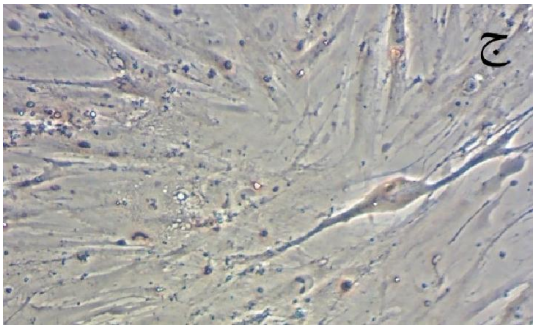
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تجزیه و تحلیل شد. به منظور رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹ استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk مورد ارزیابی قرار گرفت و تخطی از این پیش فرض دیده نشد ($p>۰/۰۵۰$). برای تحلیل داده از آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵۰ در نظر گرفته شد.

## نتایج

تأیید تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی به واسطه حضور رسوب قرمز رنگ توده‌های کلیسمی در این رنگ آمیزی می‌باشد. شکل ۱ (الف و ب) حضور رسوب قرمز رنگ توده‌های کلسیمی را نشان می‌دهد که تأییدی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست به ترتیب با استفاده از محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید می‌باشد. نمونه‌گیری جهت رنگ آمیزی آلیزارین رد در این سلول‌ها در روز ۲۱ تمایز تهیه شده است. شکل ۱. (ج) عدم حضور رسوب قرمز رنگ توده‌های کلسیمی را نشان می‌دهد که بیانگر عدم تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. نمونه‌گیری جهت رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در این سلول‌ها در روز صفر و قبل از القاء تمایز تهیه شده است.

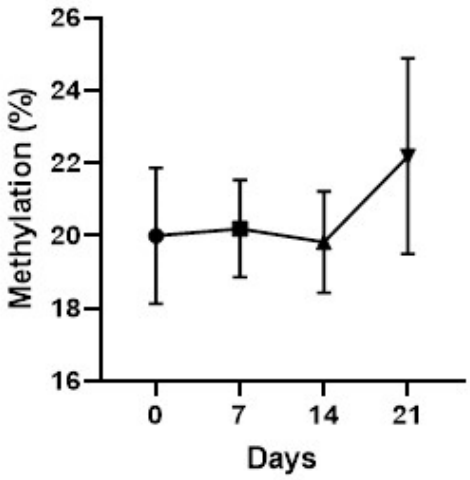


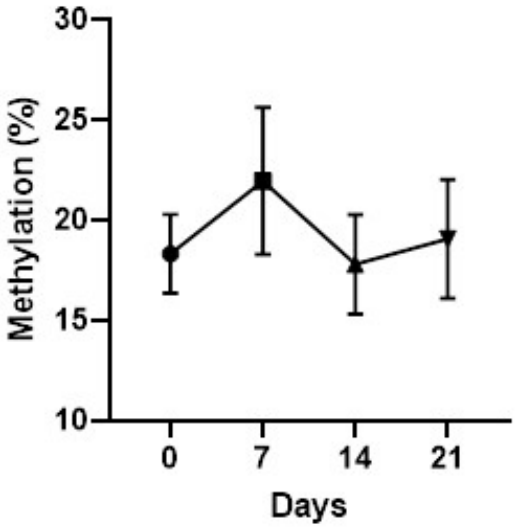

***شکل ۱- رنگ آمیزی آلیزارین رد. (الف) سلول‌های تمایزیافته استئوبلاستی تیمارشده با محیط تمایزی در روز ۲۱ تمایز. (ب) سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با زولدرونیک اسید در روز ۲۱ تمایز. (ج) سلول‌های بنیادی مزانشیمی.***

متیلاسیون تام ژنوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تمایز (روز ۰) و بعد از تمایز با محیط تمایزی (روز ۷، ۱۴ و ۲۱ تمایز) اندازه‌گیری شد. درصد متیلاسیون تام ژنوم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تمایز (روز ۰) ۱/۸۷±۲۰/۰۰ درصد و بعد از تمایز در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ به ترتیب ۱/۳۴±۲۰/۲۰ درصد، ۱/۴۰±۱۹/۸۳ درصد و ۲/۷۰±۲۲/۲۰ درصد بود. نمودار ۱ مقایسه متیلاسیون تام ژنوم در سلوهای بنیادی مزانشیمی قبل و بعد از تمایز با محیط تمایزی را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری بین درصد متیلاسیون تام ژنوم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تمایز (روز ۰) و بعد از تمایز (روز ۷، ۱۴ و ۲۱) مشاهده نشد (p=۰/۰۹۳).




***نمودار ۱. سنجش متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تمایز (روز ۰) ۱/۸۷±۲۰/۰۰ درصد و بعد از تمایز در روز ۷، ۱٤ و ۲۱ به ترتیب ۱/۳٤ ± ۲۰/۲۰ درصد، ۱/٤۰ ± ۱۹/۸۳ درصد و ۲/۷۰ ± ۲۲/۲۰ درصد. (p=۰/۰۹۳)***

متیلاسیون تام ژنوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تیمار (روز ۰) و بعد از تیمار با داروی زولدرونیک اسید (روز ۷، ۱۴ و ۲۱ تمایز) اندازه‌گیری شد. درصد متیلاسیون تام ژنوم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تیمار (روز ۰) ۱/۹۷±۱۸/۳۳ درصد و بعد از تیمار در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ به ترتیب ۳/۶۶±۲۱/۹۶ درصد، ۲/۴۷±۱۷/۸۰ درصد و ۲/۹۶±۱۹/۰۷ درصد بود. نمودار ۲ مقایسه متیلاسیون تام ژنوم در سلوهای بنیادی مزانشیمی قبل و بعد از تمایز در تیمار با داروی زولدرونیک اسید را نشان می دهد. اختلاف معنی داری بین درصد متیلاسیون تام ژنوم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از تیمار (روز ۰) و بعد از تیمار (روز ۷، ۱۴ و ۲۱) مشاهده نشد (p=۰/۰۵۷).




***نمودار ۲- سنجش متیلاسیون تام ژنوم در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با زولدرونیک اسید در سلول های بنیادی مزانشیمی قبل از تیمار (روز ۰) ۱/۹۷± ۱۸/۳۳ درصد و بعد از تیمار در روز ۷، ۱٤ و ۲۱ به ترتیب ۳/٦٦± ۲۱/۹٦ درصد، ۲/٤۷± ۱۷/۸۰ درصد و ۲/۹٦± ۱۹/۰۷ درصد. (p=۰/۰۵۷)***

## بحث

مکانیسم‌های اپی ژنتیک ساختار کروماتین را به نحوی تغییر می‌دهند که ژن‌ها در دسترس فاکتورهای نسخه‌برداری اختصاصی قرار گیرند و یا برعکس با تغییر ساختار کروماتین منجر به عدم دسترسی فاکتورهای نسخه‌برداری به ژن‌های هدف می‌شوند. بر این اساس می‌توانند بیان ژن‌ها را تحت کنترل داشته باشند. Barter و همکارانش در یک تحقیق نشان دادند که تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به کندروسیت‌ها با هیپومتیلاسیون DNA مخصوصاً در توالی‌های اختصاصی این مسیر همراه است [۲۲]. هم‌چنین Kang و همکارانش نشان دادند که بیان ژن‌های اختصاصی رده در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وضعیت هیپومتیلاسیون این ژن‌ها همراه است [۲۳].

نقش متیلاسیون تام ژنوم در پروسه‌های ژنتیکی خاص مثل غیر فعال سازی کروموزوم جنسی X و نقش بندی ژن (Gene Imprinting) به خوبی شناخته شده است [۲۴]. هم‌چنین وضعیت متیلاسیون تام ژنوم می‌تواند در تعیین سرنوشت سلولی و پروسه‌های مهم سلولی همانند تکثیر و تمایز و تکامل حایز اهمیت باشد. Ivanova و همکاران نشان دادند که متیلاسیون تام ژنوم در طول لانه‌گزینی رویانی تغییر می‌کند [۲۵]. این یافته نشان دهنده تغییرات متیلاسیون تام ژنوم در طول تکامل و تمایز می‌باشد. Maierhofer و همکاران با بررسی تأثیر اشعه ایکس بر روی متیلاسیون تام ژنوم در فیبروبلاست‌های انسانی نشان دادند

که تغییر معنی‌داری در متیلاسیون تام ژنوم در این فرآیند صورت نمی‌گیرد [۲۶]. Tsang و همکاران نشان دادند که متیلاسیون تام ژنوم در مراحل مختلف زندگی وابسته به سن و جنس می‌تواند متفاوت باشد. هم‌چنین این محققین نشان دادند که میزان متیلاسیون تام ژنوم در کودکان اوتیسم در مقایسه با کودکان سالم بیش‌تر است [۲۷]. در مراحل اولیه ترمیم شکستگی استخوان، متیلاسیون DNA به صورت هدف‌مند افزایش پیدا می‌کند که این امر ناشی از افزایش فعالیت آنزیم DNMT3B می‌باشد که در متیلاسیون اختصاصی DNA و عمدتاً در مسیر انتقال پیام Sonic Hedgehog (SHH) اثرگذار است [۲۸]. در تحقیق حاضر وضعیت متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از تکنیک الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که وضعیت متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تغییر پیدا نمی‌کند. هم‌چنین استفاده از داروی زولدرونیک اسید که نقش آن در تسریع تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته شده است [۷] تأثیری بر متیلاسیون تام ژنوم ندارد. در حالی‌که تحقیقات قبلی نویسندگان مقاله بر روی متیلاسیون اختصاصی ژن‌های دخیل در تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان‌دهنده تغییرات متیلاسیون در برخی از ژن‌ها می‌باشد [۹، ۵] هر چند متیلاسیون تام ژنوم تغییر نمی‌کند و یا تغییرات با تکنیک مورد استفاده قابل ارزیابی نیست.

Cao و همکارانش با استفاده از تکنولوژی میکروآرایه نشان دادند که سطح متیلاسیون ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بصورت افزایشی تغییر پیدا می‌کند به‌طوری‌که عناصر ژنومیکی متعدد در سطح متیلاسیون متوسط تا بالا قرار می‌گیرند و عناصر ژنومیکی تکراری در سطح متیلاسیون بالا قرار می‌گیرند [۲۹] لذا این تفاوت می‌تواند ناشی از تکنیک‌های متفاوت مورد استفاده در دو مطالعه باشد. به هر حال، نتایج متیلاسیون تام ژنوم در این تحقیق نشان می‌دهد که بین تغییرات متیلاسیون یک ژن در طول تمایز، با تغییرات متیلاسیون تام ژنوم ارتباطی وجود ندارد که این امر می‌تواند ناشی از عمکرد آنزیم‌های متیله‌کننده ژنوم با عملکرد اختصاصی مثل آنزیم DNMT3 باشد. بنابراین فرآیند نمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست‌ها یک مسیر منحصر به فرد بوده و احتمالاً سایر مکانیسم‌های ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در کنترل آن ایفای نقش می‌نماید. لذا تفاوت در یافته‌های این تحقیق در مورد متیلاسیون تام ژنوم با یافته های Cao و همکاران [۲۹] می‌تواند ناشی از استفاده تکنیک‌های متفاوت با حساسیت مختلف در شناسایی تغییرات سطح متیلاسیون تام ژنوم باشد که می‌تواند به عنوان محدودیت های مطالعه حاضر مطرح شود.

## نتیجه‌گیری

مکانیسم‌های اپی ژنتیک مخصوصاً متیلاسیون DNA نقش مهمی در فرآیند تمایز دارد. در این تحقیق مشخص شد که در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، متیلاسیون تام ژنوم تغییر نمی‌کند. هم‌چنین استفاده از داروی زولدرونیک اسید که با تسریع تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی همراه است، متیلاسیون تام ژنوم را تغییر نمی‌دهد. لذا تحقیقات بیش‌تر در این زمینه در درک بهتر مکانیسم‌های دخیل در تمایز استئوبلاستی ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و همکاری دانشگاه تربیت مدرس در انجام این تحقیق و از نمایندگی شرکت نوارتیس به دلیل تامین داروی زولدرونیک اسید و از مرکز تحقیقات سلولی ملکولی و سلول‌های بنیادی صارم و مرکز تحقیقات ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه و هم‌چنین از جناب آقای دکتر مرتضی قوجازاده به دلیل همکاری در آنالیز آماری داده‌ها نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

## References

[1] Thomas S, Jaganathan BG. Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells. *J Cell Commun Signal* 2022; 16(1): 47-61.

[2] Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(11): 696-711.

[3] Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong Y, Wang G. Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Front Cell Dev Biol* 2020; 15(8): 1575.

[4] Chan WC, Tan Z, To MK, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11): 5445.

[5] Marofi F, Vahedi G, Solali S, Alivand M, Salarinasab S, Zadi Heydarabad M, et al. Gene expression of TWIST1 and ZBTB16 is regulated by methylation modifications during the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2019; 234(5): 6230-43.

[6] Marofi F, Hassanzadeh A, Solali S, Vahedi G, Mousavi Ardehaie R, Salarinasab S, et al. Epigenetic mechanisms are behind the regulation of the key genes associated with the osteoblastic differentiation of the mesenchymal stem cells: the role of zoledronic acid on tuning the epigenetic changes. *J Cell Physiol* 2019; 234(9): 15108-22.

[7] Zhou Y, Li J, Zhou K, Liao X, Zhou X, Shen K. The methylation of Notch1 promoter mediates the osteogenesis differentiation in human aortic valve interstitial cells through Wnt/β-catenin signaling. *J Cell Physiol* 2019; 234(11): 20366-76.

[8] Rahimzadeh S, Rahbarghazi R, Aslani S, Rajabi H, Latifi Z, Hagh MF, et al. Promoter methylation and expression pattern of DLX3, ATF4, and FRA1 genes during osteoblastic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *BioImpacts* 2020; 10(4): 243-9.

[9] Mashhadikhan M, Kheiri H, Dehghanifard A. DNA methylation and gene expression of sFRP2, sFRP4, Dkk 1, and Wif1 during osteoblastic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Oral Biosci* 2020; 62(4): 349-56.

[10] Churilla BM, Perera S, Greenspan SL, Resnick NM, Kotlarczyk MP. Zoledronic acid and bone health in older adults with cognitive impairment. *Osteoporos Int* 2022; 33(1): 293-8.

[11] Jeon HL, Oh IS, Baek YH, Yang H, Park J, Hong S, et al. Zoledronic acid and skeletal-related events in patients with bone metastatic cancer or multiple myeloma. *J Bone Miner Metab* 2020; 38(2): 254-63.

[12] Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: in the right place at the right time. *Science* 2018; 361(6409): 1336-40.

[13] Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G. The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes* 2019; 10(2): 172-9.

[14] Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods* 2021; 1(187): 28-43.

[15] Mohajeri S, Hosseinkhani H, Ebrahimi NG, Nikfarjam L, Soleimani M, Kajbafzadeh AM. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cell on collagen sponge reinforced with polypropylene/polyethylene terephthalate blend fibers. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(12): 3821-30.

[16] Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A* 2018; 93(1): 19-31.

[17] Sordi MB, Curtarelli RB, da Silva IT, Fongaro G, Benfatti CA, de Souza Magini R, et al. Effect of dexamethasone as osteogenic supplementation in in vitro osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Mater Sci Mater Med* 2021; 32(1): 1-9.

[18] Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, et al. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for

osteogenic differentiation. *Bone* 2009; 44(5): 858-64.

[19] Kameswari S, Sangeetha S, Mohanraj KG. Alizarin red S-A procedure for staining bones. *Drug Invent Today* 2019; 12(5): 890-2.

[20] Dong L, Yoshizawa J, Li X. Nucleic acid isolation and quality control. *Biobanking* 2019; pages: 325-43. https;//doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_28.

[21] de Oliveira NF, de Castro Coêlho M, Viana Filho JM. ELISA analysis of global methylation levels. *Epigenetics Methods* 2020; 18: 83-92.

[22] Barter MJ, Bui C, Cheung K, Falk J, Gómez R, Skelton AJ, et al. DNA hypomethylation during MSC chondrogenesis occurs predominantly at enhancer regions. *Sci Rep* 2020; 10(1): 1-0.

[23] Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem* 2007; 102(1): 224-39.

[24] Bartolomei MS, Oakey RJ, Wutz A. Genomic imprinting: An epigenetic regulatory system. *PLoS Genet* 2020; 16(8): e1008970.

[25] Ivanova E, Canovas S, Garcia-Martínez, S, Romer R, Lopes JS, Rizos D, DNA methylation changes during preimplantation development reveal inter-species differences and reprogramming events at imprinted genes. *Clin Epigenet* 2020; 12(64): 1-18.

[26] Maierhofer A, Flunkert J, Dittrich M, Müller T, Schindler D, Nanda I, et al. Analysis of global DNA methylation

changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation. *PLoS ONE* 2017; 12(5): e0177442.

[27] Tsang SY, Ahmad T, Mat FWK, Zhao C, Xiao S, Xia K, et al. Variation of global DNA methylation levels with age and in autistic children. *Hum Genomics* 2016; 10(1): 1-6.

[28] Wang C, Shan S, Wang C, Wang J, Li J, Hu G, et al. Mechanical stimulation promote the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through epigenetic regulation of Sonic Hedgehog. *Exp Cell Re*s 2017; 352(2): 346-56.

[29] Cao Y, Yang H, Jin L, Du J, Fan Z. Genome-wide DNA methylation analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2018; https://doi.org/10.1155/2018/8238496

# Evaluation of Changes in Global DNA Methylation during Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: A Laboratory Study

**Mina Nikasa[۱], Mehrdad Noruzinia[۲], Majid Farshdousti Hagh[۳]**

**Received: 11/12/21 Sent for Revision: 04/01/22 Received Revised Manuscript: 24/04/22 Accepted: 25/04/22**

**Background and Objectives:** Control processes in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells are not yet fully understood. Epigenetic mechanisms, especially the methylation of CpG Islands in the promoter of genes, are considered as one of the most important control mechanisms in stem cell differentiation. In the process of differentiation, it is debated whether only the methylation of specific genes changes or the methylation of global DNA. Therefore, in the present study, the state of global DNA methylation was evaluated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells by differentiation medium and also in treatment by zoledronic acid.

**Materials and Methods:** In this laboratory study, after isolation and proliferation of mesenchymal stem cells, induction of osteoblastic differentiation was done using differentiating medium and zoledronic acid. DNA extraction was performed at differentiation weeks 1, 2, and 3 as well as from undifferentiated mesenchymal stem cells. Global DNA methylation status was assessed by antibodies against 5-methyl cytosine. Repeated measurement design test was used to analyze the data.

**Results:** Global DNA methylation status of the genome did not change during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells (p=0.093). Also, treatment with zoledronic acid had no effect on global DNA methylation (p=0.057).

**Conclusion:** Osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells by differentiation medium and also in treatment with zoledronic acid is not associated with altered global methylation of the genome. Therefore, the differentiation process of mesenchymal stem cells to osteoblasts is a unique pathway, and possibly other genetic and epigenetic mechanisms play a role in controlling it.

**Key words:** Osteoblast, Mesenchymal stem cells, Differentiation, Global DNA methylation, Zoledronic acid

**Funding:** This study was funded by Tabriz University of Medical Sciences.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences approved the study (IR.TBZMED.VCR.REC.1398.242).

**How to cite this article: Nikasa Mina, Noruzinia Mehrdad, Farshdousti Hagh Majid. Evaluation of Changes in Global DNA Methylation during Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: A Laboratory Study.** *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2022; 21 (02): 207-20. [Farsi]

*1- MSc, Dept. of Genetics, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran*
*2- Associate Prof., Dept. of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
*3- Associate Prof., Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, ORCID: 0000-0002-6594*
*(Corresponding Author) Tel: (041) 33364665, Fax: (041) 33364664, E-mail: m.farshdousti@gmail.com*