مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دوره ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴: ۲۰۵-۲۱۱

● مقاله تحقیقی کد مقاله: ۲۳

تأثیر غلظت ۱٪ اکسیژن بر بیان ژن Conexin ۴۳ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C57(BL/6)

حاجی نورمحمدی اشکان ۱
دکتر کدیور مهدی ۲*
کامیاب احمدرضا ۳
دکتر زرگان جمیل ۴

۱- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۲- دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتوپاستور ایران
۳- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، انستیتوپاستور ایران
۴- دکتری سم شناسی مولکولی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

* نشانی نویسنده مسؤول: بخش بیوشیمی، انیستیتو پاستور ایران، خیابان ۱۲ فروردین، میدان پاستور، تهران، ایران

تلفن: ۶۶۹۶۹۲۹۸-۰۲۱

نشانی الکترونیکی:
ashkan.genetics@gmail.com
kadivar@pasteur.ac.ir

چکیده

زمینه: غلظت اکسیژن یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در رشد و تمایز سلول‌های بنیادی می‌باشد و همچنین یکی از عوامل مؤثر بر بیان بسیاری از ژن‌ها می‌باشد که در این مطالعه اثر آن بر بیان ژن کانکسین۴۳ بررسی شد. کانکسین ۴۳ یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های اتصال سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بوده و همین طور نقش دو جانبه در تکثیر و تمایز این سلول ها دارد.

روش کار: سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C۵۷BL/۶ در محیط کشت DMEM در غلظت اکسیژن یک درصد کشت داده شدند. شرایط هیپوکسی در طی زمان های ۴،۸،۱۶،۲۴و۴۸ ساعت اعمال، سپس همه سلول‌ها به شرایط نورموکسی ۸ ساعته انتقال پیدا کردند. از سلول‌ها RNA تام استخراج و از آن cDNA ساخته شد و با تکنیک Real-Time PCR میزان بیان ژن کانکسین ۴۳ مورد بررسی وسه بار تکرار گردید.

یافته‌ها: با مقایسه روش سیکل‌های آستانه (ΔΔCT, Ratio=۲-ΔΔCT) و استانداردسازی آنالیزها، مشخص شد بیان ژن کانکسین ۴۳ در زمان های ۴،۸،۱۶،۲۴و۴۸ در شرایط هیپوکسی ۱٪ نسبت به شرایط نورموکسی به ترتیب (P>۰,۰۰۱) ۸,۶، (P>۰,۰۰۱) ۱,۰۰، ۰,۰۳ (P<۰.۰۱)، ۰,۱۴ (P>۰,۰۰۱)، ۲,۸۶ (P>۰,۰۰۱) برابر شد و همین طور این میزان در شرایط Hypoxia/Re-oxygenation به ترتیب ۳/۹ (P<۰,۰۱)، ۰/۵۹ (P<۰,۰۰۱)، ۳/۱۶ (P<۰,۱)، ۱,۳۱ (P>۰,۰۰۱) و ۴,۲۷ (P>۰,۰۰۱) برابر شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این یافته‌ها، غلظت اکسیژن و مدت زمان اعمال آن نقش اساسی در بیان ژن Connexin ۴۳ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C۵۷BL/۶ دارد. بنابراین بهینه‌سازی غلظت اکسیژن به منظور دست‌یابی به حداکثر بیان در این سلول‌ها ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: کانکسین ۴۳، بیان ژن، هیپوکسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۲۲ تاریخ اصلاح نهایی: ۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۲۳

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که در دوران جنینی و بزرگسالی در بافت‌های مختلف وجود دارند و توانایی تبدیل شدن به سلول‌های دیگر و درمان بیماری‌های مادر زادی و اکتسابی را دارا می‌باشند [۱]. این سلول‌ها، سلول‌های سوماتیک تمایز نیافته‌ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلول‌های بالغ و کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند [۲]. دسته‌ای از سلول‌های بنیادی، سلول‌های مزانشیمی می‌باشند که چند توان (Multiple) بوده و قابلیت تبدیل به رده‌های مختلف سلولی از جمله استخوان، چربی، غضروف و تاندون را دارا می‌باشد و در مهندسی بافت و سلول درمانی استفاده بسیار دارند [۳و۴]. این سلول‌ها به عنوان یکی از اصلی‌ترین و مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بوده، به طوری که در تمایز و خودتجدیدی در بیماری‌های استئوژنز، ترمیم هماتوپوئیتیک (Hematopoietic) و بازسازی استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرند [۵]. به دلیل همین توانایی‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells) کاندید مهمی برای سلول درمانی و ژن درمانی می‌باشند. یکی از مهم‌ترین عوامل تنظیم‌کننده ژن‌ها در طول رشد و نمو سلول‌های بنیادی غلظت اکسیژن می‌باشد [۶]. سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در شرایط In-vivo با فشار کم اکسیژن سازگار شده‌اند به طوری که خونی که در مغز استخوان وجود دارد در حدود ۷٪ اکسیژن دارد با این حال میزان اکسیژن در نواحی نزدیک به حفره‌های مغز استخوان تقریباً ۵٪ و در سطوح داخلی استخوان حدود ۱٪ اندازه‌گیری شده و MSCها در حد فاصل نواحی پیرامونی و حفره مرکزی مغز استخوان با عنوان ناحیه پری واسکولار قرار دارند [۷] در حالی که در شرایط آزمایشگاهی فشار اکسیژن معادل فشار جو و ۲۱٪ است. لذا انتقال سلول‌ها بر میزان کارآیی سلول‌ها تأثیر می‌گذارد [۸]. هنگامی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به محیط کشت منتقل می‌شوند، به دلیل تفاوت فاکتورهای مختلف از جمله فشار اکسیژن بیان برخی از ژن‌ها دچار تغییر می‌شوند [۹]. مطالعات گذشته نشان‌دهنده اثر هیپوکسی بر این سلول‌ها بوده که در مواردی تخریب و در مواردی بهبود سلول را در پی داشته است [۶]. معمولاً مهم‌ترین تنظیم‌کننده پاسخ سلول به کاهش فشار اکسیژن، فاکتور نسخه‌برداری موسوم به فاکتور القا شده توسط هیپوکسی (Hypoxia inducible factor, HIF) می‌باشد. اهمیت مسیر HIF از آن جایی مشخص می‌شود که این مسیر تقریباً در همه یوکاریوت‌های عالی وجود دارد. HIF با کنترل بیان ژن‌های خاص، ممکن است به حفظ هموستازی در فعالیت‌های سلولی کمک کند [۱۰]. اگر چه هیپوکسی معمولاً از سنتز mRNA جلوگیری می‌کند، لیکن نسخه‌برداری تعدادی از ژن‌ها از جمله HIF را تا حد زیادی افزایش می‌دهد [۱۱]. Connexin ۴۳ مهم‌ترین عضو از پروتئین‌های اتصال سلولی است که طیف وسیعی از بیان را در بافت و اندام‌های مهره‌داران از جمله انسان دارد [۱۲]. همین‌طور می‌تواند باعث تنظیم آپاپتوز شود. می‌توان گفت Connexin ۴۳ به خاطر Intracellular coupling می‌تواند یک پایه مهم سلول درمانی محسوب شود [۱۳]. با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی در زمینه‌های پزشکی و درمانی و نیز نقش اکسیژن به عنوان مهم‌ترین عامل محیطی تأثیرگذار بر عملکرد این سلول‌ها و همین طور عملکرد ژن Connexin ۴۳ در فیزیولوژی این سلول‌ها، در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر هیپوکسی بر میزان ژن مورد نظر در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C۵۷BL/۶ پرداخته شده است.

روش کار

کشت سلول‌ها:

سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق قبلاً در بخش بیوشیمی انیستیتو پاستور ایران جداسازی شده و در پاساژ چهارم مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت کشت سلول‌ها، از محیط Dulbecco,s Modified Eagle Medium (۱۷۵-۱۱۹۶۵:DMEM, Gibco,Cat No) غنی شده با FBS (Fetal Bovine Serum,Gibco, Cat No:۱۰۲۷۰) ۱۰٪ و نیز ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma,Pa ۳۳۳) استفاده شد. یک ویال از سلول‌های بنیادی منجمد را برداشته و بلافاصله بعد از ذوب شدن در انکوباتور ۳۷ درجه، محتویات آن را داخل فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته می‌شود. سپس سلول‌ها با دور g ۳۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریو فیوژ می‌شود تا اثرات سمی DMSO موجود در محیط انجماد حذف شود. پس از سانتریوفوژ، مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلولی با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط شد. در این مرحله میزان زنده بودن سلول‌ها با تریپان بلو سنجیده شد که بالای ۹۵٪ بود. نهایتاً سلول‌ها به داخل فلاسک کشت سلولی ۲۵ cm۲ حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل و

درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO۲ قرار گرفت. پس از رشد و تکثیر سلول‌ها به تعداد کافی، جهت اعمال شرایط هیپوکسی سلول‌ها به پلیت‌های ۶ خانه‌ای منتقل شدند. هنگامی که تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰ ٪ تا ۹۰٪ رسید، برای اعمال شرایط هیپوکسی مناسب استفاده شدند.

اعمال شرایط هیپوکسی:

برای ایجاد شرایط هیپوکسی ۱٪ از اتاقک (Chamber) ساخت شرکت (MIC) Billups-Rothenberg-۱۰۱ استفاده شد. این اتاقک دارای دو شیر ورودی و خروجی است. شیر ورودی به فشارسنج متصل می‌باشد. که شدت جریان گاز را نشان می‌دهد. فلومتر نیز دارای دو شیر است. که شیر ورودی آن به کپسول گاز (حاوی ۹۵٪ نیتروژن، ۵٪ دی اکسیدکربن و ۱٪ اکسیژن است) و شیر خروجی آن به اتاقک متصل است. جهت تأمین رطوبت مورد نیاز سلول‌ها ظرف آب استریل داخل اتاقک قرار داده شد. سپس شیر کپسول گاز باز شده، تا گاز از شیر ورودی با فشار ۱۵ لیتر در دقیقه، به مدت پنج دقیقه وارد اتاقک شود. پس از مدت زمان ذکر شده، همزمان با بستن شیر گاز، دو شیر اتاقک به کمک گیره‌های موجود، مسدود می‌شود سپس اتاقک درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌گیرد. در این آزمایش پس از ساعات مشخص شده (۴،۸،۱۶و۲۴ ساعت)، پلیت از اتاقک خارج شده و بلافاصله RNA تام نیمی از سلول‌های آن استخراج می‌گردد و نیمی دیگر از سلول‌ها به شرایط نورموکسی ۸ ساعته بازگردانده شدند.

استخراج RNA تام:

استخراج RNA تام توسط کیت سینا کلون((RNX- Plus Cat. No. : RN۷۷۱۳C, و طبق دستورالعمل این کیت انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا ۱ میلی‌لیتر (RNX (Plus به رسوب سلولی اضافه شد. پس از ۵ دقیقه مخلوط حاصل به ویال ۱/۵ سی‌سی منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه می‌شود. پس از مخلوط کردن، ویال در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌شود. سپس محتویات ویال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. مایع شفاف رویی دور ریخته شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب اضافه می‌شود و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰rpm سانتریوفیوژ می‌شود. سپس ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب DEPC به تیوب اضافه شد. نمونه حاصل پس از تعیین غلظت توسط دستگاه نانو دراپ جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز:cDNA

جهت سنتز cDNA از کیت AccuPower cycleScript RT Premix استفاده و مطابق دستورالعمل این کیت عمل شد. تیوب‌های واکنش در این کیت از پیش آماده است و هر تیوب حاوی آنزیم مقاوم به حرارت CycleScript Reverse Transcriptaseها، dNTP، پرایمر (هگزامرهای تصادفی و الیگومرهای داکسی تیمین)، بافر و پایدارکننده می‌باشد. پس از اضافه‌کردن یک میکروگرم RNA و رساندن حجم نهایی به یک ۲۰ میکرولیتر، مخلوط حاصل برای سنتز cDNA وارد چرخه دما-زمان در دستگاه ترموسایکلر می‌شود. برنامه دمایی دستگاه بدین شرح می‌باشد: ۱، ۲۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲، ۴۵، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. این ۳ مرحله ۱۲ بار تکرار می‌شوند. در آخر تیوب برای ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود. پس از سنتز cDNA غلظت توسط پیکو دراپ سنجیده شد.

طراحی پرایمرها:

توالی ژن Connexin ۴۳ به عنوان ژن‌های هدف و توالی ژن TATA Binding Protein (TBP) به عنوان ژن رفرنس از سایت اینترنتی http://www.ncbi-nlm.nih.gov اخذ و پرایمرهای مستقیم و معکوس توسط نرم‌افزارهای Gene Runner طراحی شدند (جدول۱).

جدول ۱- توالی‌ها و خصوصیات پرایمرهای طراحی شده و به کار رفته جهت Real Time PCR

ژن	جهت پرایمر	توالی پرایمر	Tm	درصد CG	طول
Connexin ۴۳	Fw	‘CCAAGGAGTTCCACCACTTTG3‘5	۵۸/۲	۵۲	۲۱
	Rv	‘AAAATGAAGAGCACCGACAGC3‘5	۵۸/۱	۴۸	۲۱
TBP	Fw	‘AAGGGAGAATCATGGACCAGAAC3‘5	۶۰/۶	۴۷/۸	۲۳
	Rv	‘GGTGTTCTGAATAGGCTGTGGAG3‘5	۵۹/۹	۵۲/۲	۲۳

Real time PCR:

۱۰ میکرولیتر Master Mix، ۲ میکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس، ۴ میکرولیتر cDNA، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه را با هم مخلوط کرده تا حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر برسد. مخلوط حاصل در دستگاه Real Time PCR، مدل Corbett ۶۰۰۰ با برنامه دمایی زیر قرار داده می‌شود (جدول ۲). منحنی‌های به دست آمده از تکثیر در رقتهای متوالی ژن CX۴۳ و TBP در Real time PCR در شکل ۱و۲ قابل مشاهده است. پس از واکنش تفاوت Ct ژن هدف به ژن رفرنس به صورت ΔCt برای هر نمونه محاسبه می‌شود. سپس برای هر مورد ΔΔCt – ۲ به دست می‌آید. در مرحله بعد نسبت اعداد حاصل به نرمال، براساس درصد محاسبه شد. به کمک نرم‌افزار آماری SPSS، نتایج داده‌ها به صورت SEM ± Mean گزارش شده و اختلاف میانگین گروه‌ها با آزمون آماری ANOVA یک طرفه به دست آمد. در مورد مقایسه دو گروه با هم از تست Post Hoc استفاده گردید. در همه موارد مقدار p کمتر از ۰/۰۵ (P<۰,۰۵) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

جدول ۲- برنامه دمایی – زمانی به کار رفته در Real Time PCR

مرحله	شرایط دما – زمان	تعداد تکرار	توضیحات
واسرشتگی اولیه	۹۵°C، ۱۵ ثانیه	۱	HotStart فعال شدن آنزیم
واسرشتگی	۹۵°C، ۵ ثانیه	۴۰	سیکل های تکثیر
اتصال / بسط پرایمر	۶۰°C، ۲۵ ثانیه		
تشکیل منحنی ذوب (تفکیک)	۹۵°C، ۱۵ ثانیه ۶۰°C، ۳۰ ثانیه ۹۵°C، ۱۵ ثانیه	۱	تشخیص پرایمر دایمر تشخیص تکثیر قطعه هدف

یافته‌ها

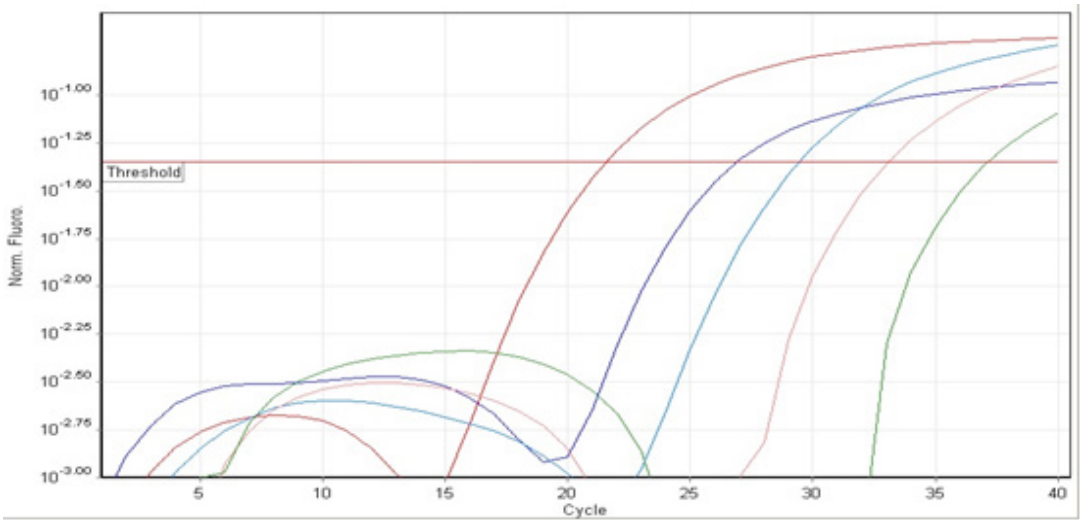
با مقایسه روش سیکل‌های آستانه (ΔΔCT–۲=ΔΔCT, Ratio) و استانداردسازی آنالیزها، مشخص شد بیان ژن کانکسین ۴۳ در شرایط هیپوکسی حاد ۱ درصد در ساعات ۴ (P<۰,۰۰۱)، ۸ (P<۰,۰۰۱) و ۴۸ (P<۰,۰۰۱) افزایش بیان و در ساعات ۲۴ (P<۰,۰۰۱) کاهش بیان نسبت به حالت نورموکسی و در ساعت ۱۶ (P<۰. ۰۵) تقریباً بیان یکسانی نسبت به حالت نورموکسی داشت. همچنین بیان این ژن در حالت Hypoxia/Re-oxygenation در ساعات ۴ (P<۰. ۰۱) ، ۱۶ (P<۰. ۰۵)، ۲۴ (P<۰,۰۰۱) و ۴۸ (P<۰,۰۰۱) نیز نسبت به حالت نرمال افزایش و در ساعت ۸ (P<۰,۰۰۱) کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۱)، در ضمن میزان بیان ژن در تمامی ساعات فوق در جدول شماره ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۳- میزان میانگین و انحراف معیار بیان ژن کانکسین ۴۳ در شرایط هیپوکسی در ساعات مختلف و Hypoxia/Re-oxygenation (به مدت ۸ ساعت) نسبت به شرایط نورموکسی

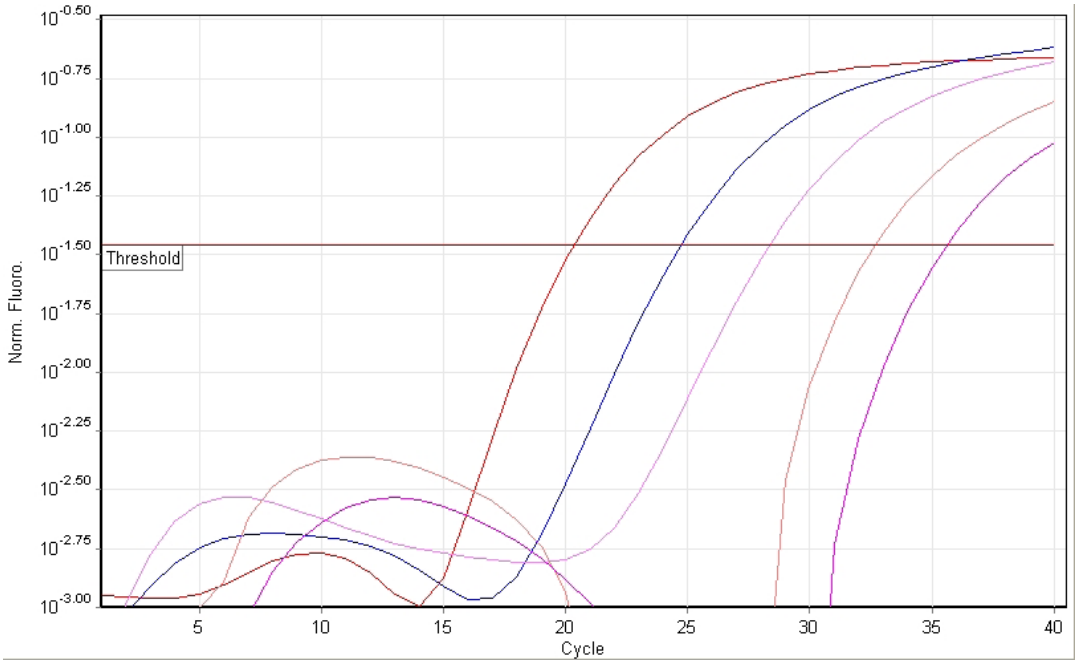
ساعات اعمال هیپوکسی	۴	۸	۱۶	۲۴	۴۸
هیپوکسی	۸,۶ (P<۰.۰۰۱)	۰,۰۳ (P<۰.۰۰۱)	۱,۰۰ (P<۰. ۱)	۰,۱۴ (P<۰.۰۰۱)	۲,۸۶ (P<۰.۰۰۱)
Hypoxia/Re-oxygenation	۳/۹ (P<۰.۰۱)	۰/۵۹ (P<۰.۰۰۱)	۳/۱۶ (P<۰.۱)	۱,۳۱ (P<۰.۰۰۱)	۴,۲۷ (P<۰.۰۰۱)

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، در شرایط هیپوکسی حاد ۱٪ بیان ژن Connexin ۴۳ در ساعات هیپوکسی به طور نامنظم افزایش و کاهش بیان را نشان داد. که بیشترین بیان در ۴ ساعت و کمترین بیان در ۸ ساعت است. اما تحت شرایط Hypoxia – Re-oxygenation میزان بیان ژن در ساعت ۴ ، ۱۶ و ۲۴ افزایش نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر دلیل انتخاب ژن Connexin

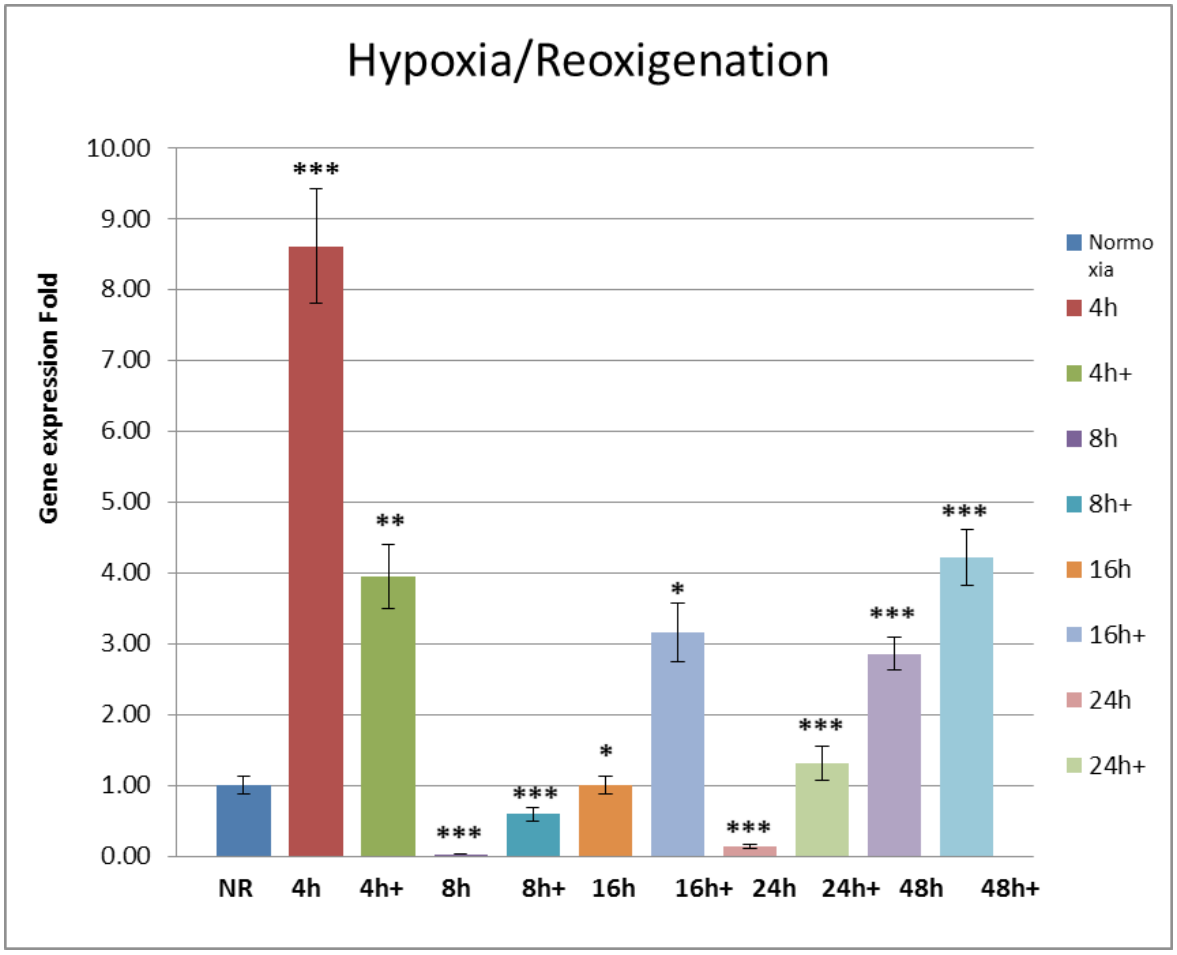


شکل ۱- منحنی‌های به دست آمده تکثیر در رقتهای متوالی ژن CX43 در Real time PCR



شکل ۲- منحنی‌های تکثیر در ژن TBP رقتهای متوالی

۴۳، نقش کلیدی این پروتئین در تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی است و با توجه به این موضوع هر چه این ژن بیشتر بیان شود میزان تمایز و تکثیر بیشتر خواهد شد، که این روند نامنظم بیان ژن در ساعات مختلف مربوط به مکانیسم‌های متابولیتی سلولی می‌باشد که هنوز شناخته شده نیست. با توجه به فشار کم اکسیژن در مغز استخوان در سطح درونی قشری استخوان (حدود ۱٪)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در شرایط In-vivo در معرض هیپوکسی قرار دارند و جابه‌جایی با محیط In-vitro باعث تغییر در بیان ژن می‌شود. به طوری که در چند دهه گذشته تحقیقات زیادی درباره اثر هیپوکسی بر بیان ژن‌ها صورت گرفته است [۶]. البته هدف اصلی این تحقیق بهینه کردن بیان ژن Connexin ۴۳ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌باشد. یافته‌های ما در مورد ژن Connexin ۴۳ در تطابق با مطالعه‌ای است که نشان داده بود بیان ژن Connexin ۴۳ در شرایط هیپوکسی به طور چشمگیری بالا می‌رود [۱۴]. در مطالعه‌ای دیگر که روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت و برای درمان سکته قلبی انجام شده بود در شرایط هیپوکسی کمتر از ۱٪ افزایش بیان پدیدار شده بود [۱۵]. همین‌طور در دیگر مطالعات



نمودار ۱- مقایسه بیان ژن کانکسین ۴۳ در گروه‌های هیپوکسی با گروه‌های Hypoxia/Re-oxygenation به کمک آزمون آماری ANOVA یکطرفه (h نشان‌دهنده ساعات هیپوکسی و $^{+}$h نشان‌دهنده ساعات Hypoxia/ Re-oxygenation می‌باشد)

انجام شده بیان ژن CX۴۳ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان در شرایط هیپوکسی به طور نامنظم متغیر بود به طوری که تا ۸ ساعت اعمال شرایط هیپوکسی افزایش بیان و تا ۴۸ ساعت کاهش بیان را نشان می‌دهد و در شرایط Hypoxia – Re-oxygenation نیز همین نتایج را در برداشته است [۱۶]. در مطالعه‌ای دیگر نیز اعمال شرایط هیپوکسی ۱٪ به سلول‌های کاردیومیست رت به مدت ۵ ساعت افزایش بیان Connexin ۴۳ را در پی داشت، که تقریباً با نتایج حاصله در ۴ ساعت هیپوکسی تحقیق حاضر مطابق بوده است. همچنین در مطالعه دیگری اثر هیپوکسی ۱٪ به مدت ۱۲ ساعت بر روی سلول‌های انتروسایت (enterocyte) انجام شده که کاهش بیان ژن Connexin ۴۳ را نشان می‌دهد [۱۷]. در تحقیق دیگری نیز با اعمال شرایط هیپوکسی بیان ژن‌های مرتبط با انژی و سوخت‌وساز بدن انسان از جمله GLUT-۱, LDH و PDK۱ را بالا برده است [۶].

به طور کلی در بررسی نتایج تأثیر اعمال هیپوکسی بر سلول‌ها باید عوامل مختلف درگیر در این شرایط را از جمله نوع سلول، میزان و شدت و نیز نوع هیپوکسی به کار رفته (مزمن، حاد) مورد بررسی قرار داد. نهایتاً به نظر می‌رسد تأثیر هیپوکسی بر بیان ژن به نوع سلول، شرایط محیط کشت، و مدت زمان کشت بسیار وابسته است. به طوری که تغییر در هر کدام از این عوامل می‌تواند باعث تفاوت‌های محسوسی در نتایج حاصله شود. از سوی دیگر ژن‌های مختلف نیز می‌توانند بر بیان یک ژن تأثیر داشته باشند که تفسیر یافته‌ها را پیچیده‌تر می‌کند. با توجه به مباحث مطروحه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که توجه به نقش اساسی اکسیژن، به منظور دستیابی به حداکثر بیان ژن Connexin ۴۳ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C۵۷BL/۶ قبل از انجام هر گونه به کارگیری آن در پژوهش‌ها، ضروری است.

تشکر و قدردانی:
این مطالعه در بخش بیو شیمی انیســتیتو پاستور ایران انجام شد. نویســندگان لازم می داننــد از هم کاری اعضــای محترم گروه بیوشیمی تشکر و قدر دانی کنند.

مراجع

1- 1- Eleni Antoniadou, et al. Placental stem cells. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology (2015).2015.08.014

2 . Gael Y, et al. Multipotential Mesenchymal Stem Cells Are Mobilized into Perpheral Blood by Hypoxia. STEM CELLS.2006;2202-2208.

3. Christine F, et al. Reduced oxygen tension attenuates ifferentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell. (2007), pp745–757.

4. Hung S-C, et al. Short-Term Exposure of Multipotent Stromal Cells to Low Oxygen Increases Their Expression of CX3CR1 and CXCR4 and Their Engraftment In Vivo. PLoS ONE (2007) 2(5): e416.

5. Trine F, et al. Induction of Adipocyte-Like Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cells by Hypoxia. STEMCELLS. 2004; 22:1346–1355.

6. L.B. Buravkova , et al. Mesenchymal stem cells and hypoxia:Where are we?.Mitochondrion 19 (2014) 105–112.

7. Fehrer C, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell (2007): 6:745-757.

8. Semenza Gl, et al. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol cell Biol. 1992;12:5447-5454.

9. Kawanami D, et al. kuppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1& expression and function in the endothelium. J Biological chemistry. 2009; 284: 20522-20530

10 . Bo Sun ,et al. Mechanism study for hypoxia induced differentiation of insulin producing cells from umbilical cord bloodderived mesenchymal stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 466 (2015) 444e449

11. Grayson WL, et al. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY. (2006) 207:331–339 .

12. Ajaz Ahmad Waza, Khurshid Andrabi, Mahboob Ul Hussain. Protein kinase C (PKC) mediated interaction between conexin43 (Cx43) and K+(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. Cellular Signalling. 2014; 26(9).

13. Deguo W, et al. Connexin43 promotes survival of mesenchymal stem cells in ischaemic heart. Cell Biol. Int. (2010) 34, 415–423.

14. Warren L. G, et al .Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications .358 (2007) 948–953

15. Deguo W, et al. Connexin43 promotes survival of mesenchymal stem cells in ischaemic heart.Cell Biology International. 2010; 34(4):415-23.

16. M Kadivar, et al. Effects of %1 acute hypoxia on gene expression of CXCR4 in human bone marrow derived mesenchymal stem cells. Koomesh. 2012, 13 (3): 382-390.

17. Agust´ın D. et al. Regulation of astrocyte gap junctions by hypoxia–Re-oxygenation. Brain Research Reviews 32 _2000. 250–258.