

بررسی تغییر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و ماتریکس متالو پروتئیناز محیط روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و چربی در شرایط کشت

لیلا میرزائیان^۱ (M.Sc)، محمد تقی قربانیان^{۲*} (Ph.D)، تقی لشکرلو کی^۳ (Ph.D)، مریم حاجی قاسم کاشانی^۲ (Ph.D)، رادا دهقان^۳ (M.Sc)

۱- دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی

۲- دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه سلولی و مولکولی و پژوهشکده علوم زیستی،

۳- دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه تکوین سلولی

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به دلیل توانایی تکثیر، تمایز و ترمیم بالا در سلول درمانی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند. یکی از مشکلات در مسیر کشت سلول‌های بنیادی قبل از استفاده درمانی، ظهور علائم پیری سلول در شرایط کشت است. تغییرات پیری با کاهش ظرفیت تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و تغییرات پروتئین‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) همراه است. هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه ظرفیت تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسیددسموتاز (SOD) و گلوکوتایون پراکسیداز (GPx) و MMP-۲ در محیط روی سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BMSCs) و بافت چربی (ADSCs) موش صحرایی است. مواد و روش‌ها: BMSCs و ADSCs به ترتیب از بافت‌های مغز استخوان‌های فمور و تیبیا و چربی زیرجلدی جدا شدند. سلول‌ها در محیط α -MEM غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) تا ۷ پاساژ متوالی کشت شدند. بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و MMP در محیط رویی فاقد سرم به ترتیب با روش‌های سنجش آنزیمی و زایموگرافی صورت گرفت.

یافته‌ها: BMSCs و ADSCs از لحاظ فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx به‌طور تقریباً یکسان، به ترتیب در پاساژهای ۵ و ۶-۴ بیش‌ترین فعالیت را نشان دادند. هم‌چنین، از لحاظ فعالیت MMP، پاساژ چهارم مناسب‌ترین پاساژ است. از طرفی دیگر، سنجش MDA و LDH سلامت غشا در این سلول‌ها را نشان داد. نتیجه‌گیری: بافت چربی دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بالایی است. هم‌چنین پاساژهای ۶-۴ زمانی است که ظرفیت تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و MMP در BMSCs و ADSCs در بالاترین سطح خود قرار دارند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، ماتریکس متالوپروتئیناز، پیری سلولی

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) به دلیل توانایی تکثیر و تمایز بالا در پزشکی ترمیمی و سلول درمانی نقش به‌سزایی دارند [۱]. دسترسی آسان و کشت سریع آن‌ها اهمیت زیادی دارد

[۲]. نگاه‌داری سلول‌ها در شرایط *in vitro* و کشت‌های متوالی موجب کاهش تکثیر، تغییر مورفولوژی و تمایز، بروز پیری و در ادامه مرگ سلولی خواهد شد [۳]. BMSCs در بسیاری از ویژگی‌ها با MSCهای استخراج شده از سایر منابع بافتی

با افزایش بیان ۱، ۲، ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۲، ۱۴-MMP و کاهش بیان ۱، ۲، ۳، ۴-TIMP هم‌راه است. تغییر در بیان MMPها باعث افزایش تخریب، تجمع و رسوب مولکول‌های ECM و توقف تکثیر سلولی و پیری می‌شود [۱۴]. روش‌های آزمایشگاهی و شرایط کشت در انواع سلول‌ها منجر به تولید انواع پیری در سلول می‌شوند [۱۵]. با افزایش سن بیان زن‌ها در طولانی مدت تغییر پیدا می‌کند و این امر باعث پیری می‌شود [۱۶]. از طرفی، بیان آنتی‌اکسیدانت‌هایک فرآیند دفاعی در برابر افزایش MMPها، تخریب سلول و پیری می‌باشد. با بررسی میزان بیان این فاکتورها در *in vitro* می‌توان مقایسه‌ای بین دو نوع سلول انجام داد. از این‌رو هدف از این مطالعه ارزیابی و مقایسه بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و MMP توسط BMSCs و ADSCs و این‌که در کدام پاساژ سلولی مطلوب‌ترین ظرفیت وجود دارد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلولی MSCs از مغز استخوان، از مغز استخوان‌های فمور و تیبیا [۱۷، ۱۸]، و بافت چربی زیر پوست موش صحرایی بالغ نژاد ویستار استخراج شد. BMSCs بر اساس روش (Azizi, Stokes, Augelli, DiGirolamo, & Prockop, 1998) و ADSCs پس از هضم مکانیکی و هضم آنزیمی توسط کلاژناز ۲٪ (۱۷۱۰۰-۰۱۷) (Gibco)، استخراج شدند [۳] BMSCs و ADSCs پس از استخراج در محیط α -MEM (Gibco) غنی‌شده با ده درصد سرم (Fetal bovine serum) (Gibco) پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک درصد در فلاسک (Falcon) 25cm^2 کشت داده شده و به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، و $5\% \text{CO}_2$ انتقال داده شد. پس از ۷۲ ساعت با تعویض محیط، سلول‌های شناور از سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا گردیدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ تا ۹۰٪، به کمک تریسین 0.25% به هم‌راه EDTA 0.2% (Merck) سلول‌ها از کف فلاسک جدا و با تراکم 5×10^5 subculture تهیه شد. ارزیابی حیات سلولی به روش هموسایتومتر انجام شد (پنج بار تکرار).

مشابه می‌باشند اما در فنوتیپ، تکثیر و نیز ظرفیت تمایزیشان با یک‌دیگر تفاوت‌هایی دارند [۴]. گزارشات متعددی وجود دارد که در شرایط کشت سلولیکسان، پاسخ BMSCs و ADSCs مشابه نیست. کنترل و نگه‌داری سلول در مرحله تکثیر با قابلیت گسترش و عدم تمایز در پاساژهای متوالییکی از نیازهای کشت سلول است. نوع سلول انتخابی، روش استخراج و جداسازی، سن و گونه حیوانی در پدیده پیری سلول موثر هستند [۵]. در شرایط *in vitro* علی‌رغم خودتکثیری زیاد در MSCs، کشت طولانی مدت آن‌ها منجر به کاهش توانایی تکثیر و تمایز، کاهش تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی، افزایش تعداد سلول‌های پهن و بزرگ، افزایش تشکیل هتروکروماتین غیرطبیعی، افزایش سوپراکسیدهای آندوژن، توقف در چرخه سلول و بروز پیری و تغییر عمل‌کرد سلول می‌شود [۶]. به عنوان مثال MSCs انسان حدود ۵۰-۴۰ بار تکثیر شده و سپس متوقف می‌شود [۷]. همچنین توانایی تمایزی MSCهای موش در پاساژهای انتهایی تغییر می‌یابد [۸]. عوامل خارجی شامل سن و گونه جانور، تراکم سلول‌ها در کشت اولیه، ترکیبات محیط و نوع سرم [۹] و عوامل داخلی شامل طول تلوومراز، استرس اکسیداتیو [۱۰]، بیان غیرطبیعی MMP، تغییر در توالی DNA و تغییر در بیان ژن‌های p16، p21 و p53 که باعث پیری سلول و عدم استفاده از این سلول‌ها در مقاصد درمانی می‌شوند [۱۱]. استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین اکسیدانت‌ها و آنتی‌اکسیدانت‌ها و در حضور حدواسط‌های واکنش‌گر اکسیژن ایجاد می‌شود که می‌تواند باعث پراکسیداسیون پروتئین‌ها، DNA، چربی و غشاهای سلولی و در نتیجه موجب آسیب‌های اکسیداتیو در سلول شود و بسیاری از وظایف سلول را معیوب کند [۱۲]. MMPها در شرایط طبیعی به مقدار ناچیز در بافت‌ها وجود دارند و برهم‌کنش سلول-سلول و سلول-ماتریکس را در MSCs تنظیم می‌کنند. MMPها با اثر بر روی ساختار ECM، فاکتورهای رشد و سیستم‌های پیام‌رسانی متعاقباً بر روی ترمیم، رشد، تمایز، مورفولوژی، تکثیر، مهاجرت و آپوپتوز سلولی تأثیر می‌گذارند [۱۳]. پیری

اسپکتروفوتومتر، با کاهش جذب NADH در طول موج ۳۴۰ nm و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین می‌شود [۲۲].

سنجش مالون دی‌آلدئید. محیط واکنش شامل سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱/۸٪، اسید استیک ۲۰٪ (PH=۳/۵)، بیکربنات سدیم ۱ مولار، تیوباربیتوریک اسید ۱/۸٪ و MDA ۱۲۵ میکرومولار است. TBARS به صورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. MDA با Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) برهم‌کنش دارد و باعث تغییر رنگ در محیط می‌شود. با سنجش تغییرات رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۳۲ nm می‌توان به میزان پراکسیداسیون غشا پی برد. برای رسم منحنی استاندارد از tetramethoxypropane ۱،۱،۳،۳ (مالون دی‌آلدئید) استفاده شد [۲۳].

ژلاتین زایموگرافی. مواد واکنش شامل آمونیوم پرسولفات ۱۰۰ mg/ml، SDS ۱۰٪، ژلاتین ۱ mg/ml، آکریل آمید ۲۹٪ بیس‌اکریل آمید ۸٪، تمد، بافر تریس (۱/۵M pH:۸/۸)، بافر تریس (۰/۵ M pH:۶/۸)، Running buffer، Sample buffer، Renaturing buffer، Developing buffer، محلول رنگ‌آمیزی، محلول رنگ‌بری و Protein Ladder می‌باشد. ژل Resolving در ۵ درصد و ژل Stacking ۵٪ تهیه شد. ۳ میکرولیتر نمونه به هم‌راه sample buffer (حجمی برابر نمونه) بر روی ژل لود شد. الکتروفورز پروتئین در ولتاژ ۲۰۰ ولت، جریان ۷۰۰ میلی‌آمپر، دمای ۴ درجه و به مدت ۱ ساعت انجام شد. سپس ژل در محلول‌های Renaturing و Developing قرار گرفت. پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری تصویربرداری از ژل با استفاده از دستگاه UVIdoc انجام شد و دانسیته باند با نرم‌افزار Image بررسی شد [۲۴].

آنالیز آماری. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS, version 16 انجام گرفت. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون

سنجش پروتئین به روش لوری. ابتدا محلول لوری که شامل ترکیب سه محلول A, B, C با نسبت ۱:۱:۱۰۰ می‌باشد آماده شد. منحنی استاندارد تهیه گردید. سنجش نمونه‌های مورد نظر انجام شد. میزان پروتئین نمونه با استفاده از معادله منحنی استاندارد محاسبه شد. مقدار کل پروتئین (بر حسب mg/l) در محیط رویی سلول‌ها محاسبه شد. جذب در طول موج ۷۵۰ nm ثبت شد [۱۹].

سنجش آنزیمی

فعالیت سوپراکسید دسموتاز. ابتدا مواد واکنش به ترتیب بافر تریس EDTA-۵۰ میلی‌مولار (=۸ EDTA (Triplex) (PH ۸/۰ مولار)، متیونین (۱۴/۳ میلی‌مولار، NBT ۸۲/۵ میکرومولار) و ریوفلاوین (۲/۲ میکرومولار) آماده گردید. فعالیت SOD با احیا فتوشیمیایی NBT (Nitroblue Tetrazolium) در طول موج ۶۵۰ nm اندازه‌گیری شد. از طرفی واکنش تاریکی به عنوان بلانک استفاده شد. همچنین، واکنش روشنایی انجام شد و یک واحد SOD (U) به عنوان مقداری از آنزیم که ۵۰٪ مانع از احیاء NBT تحت شرایط سنجش می‌شود، تعیین شد [۲۰].

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز. مواد واکنش شامل گلوتاتیون احیا (۲۰ میلی‌مولار)، آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (۰/۱۵ u/ml)، سدیم آزید (۴۰ میلی‌مولار)، تترابوتیل هیدروپراکسید (۵۰ میلی‌مولار، NADPH (۱۰ میلی‌مولار) و بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار) می‌باشد. فعالیت GPx با استفاده از tert-butyl hydroperoxide به عنوان سوبسترا و مصرف NADPH در طول موج ۳۴۰ nm، ۲ دقیقه و ۳۷ °C اندازه‌گیری شد. بنابراین یک واحد GPx به عنوان یک میکرومول از NADPH مصرف شده در دقیقه تعریف می‌شود و فعالیت اختصاصی به شکل تغییرات جذب بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد [۲۱].

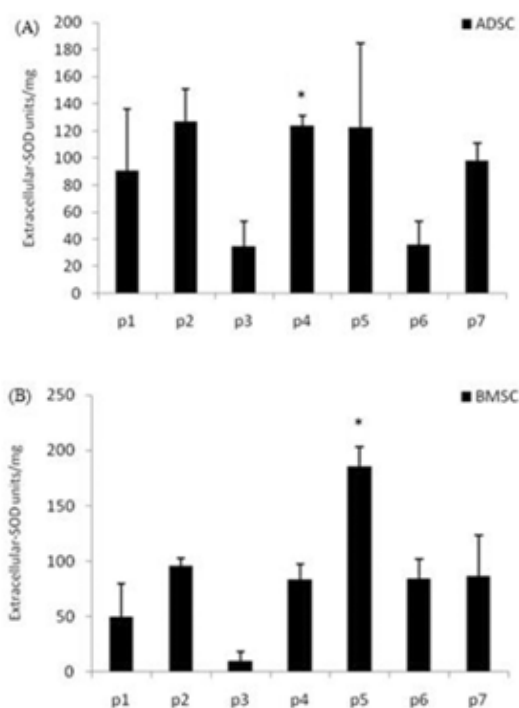
فعالیت لاکتات دهیدروژناز. مخلوط واکنش شامل بافر Tris Hcl (۰/۲ مولار) (PH=۷/۳)، پیرووات سدیم (۳۰ میلی‌مولار) و NADH (۶/۶ میلی‌مولار) آماده شد. شدت فعالیت LDH با استفاده از دستگاه میکروپلیت

تکمیلی Tukey انجام شد. مرز استنتاج آماری نتایج $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. نهایتاً هیستوگرام‌های مربوطه با Excell ترسیم گردید.

نتایج

ویژگی مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت‌های مغز استخوان و چربی. MSCها به ظرف کشت چسبیده و به سرعت تکثیر شدند. این سلول‌ها معمولاً به سه شکل: کروی و کوچک، دوکی و شبه فیبروبلاستی و پهن در محیط نمایان شدند (شکل ۱). سلول‌های با ظاهر شبه فیبروبلاستی در ADSCs مشهودتر بوده اما در پاساژهای بالاتر سلول‌ها با سیتوپلاسم پهن افزایش یافتند. ظهور سلول‌های با مورفولوژی پهن با کاهش سرعت تکثیر سلول‌ها مرتبط بود. ارزیابی میزان حیات سلولی نشان داد، که تقریباً ۹۵٪ از سلول‌های هر دو گروه در پاساژهای مختلف زنده بودند. پیش از این نشان داده شد ADSCs نسبت به BMSCs دارای سرعت رشد، ظرفیت بقا و قابلیت تکثیری بیشتری است. همچنین، هویت این دو نوع سلول بنیادی با دو نشانگر اختصاصی CD90 و CD71 و تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی نشان داده شده است [۲۵].

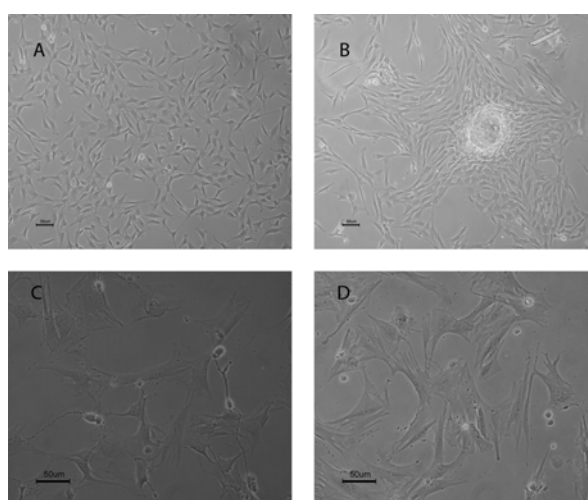
سنجش آنزیمی. آنزیم سوپراکسیددسموتاز خارج سلولی بیان آنزیم SOD در محیط رویی سلول‌های BMSCs و ADSCs در پاساژ ۷-۱ مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به فعالیت SOD در ADSCs، کاهش معنی‌داری در پاساژهای ۳ و ۶ نسبت به سایر پاساژها مشاهده شد (شکل ۲، A). در BMSCs افزایش بیان در پاساژ ۵ نسبت به پاساژ ۱ و ۳ معنی‌دار بود (شکل ۲، B).



شکل ۲. نمودار ستونی بیان SOD در کشت متوالی ADSCs (A) و BMSCs (B). با توجه به نمودار، فعالیت SOD در گروه ADSCs، کاهش معنی‌داری در پاساژهای ۳ و ۶ نسبت به سایر پاساژها مشاهده شد، اما در گروه BMSCs، معنی‌دار بودن افزایش بیان SOD بین پاساژ ۵ با ۱ و ۳ قابل مشاهده است. ($P \leq 0.05$).

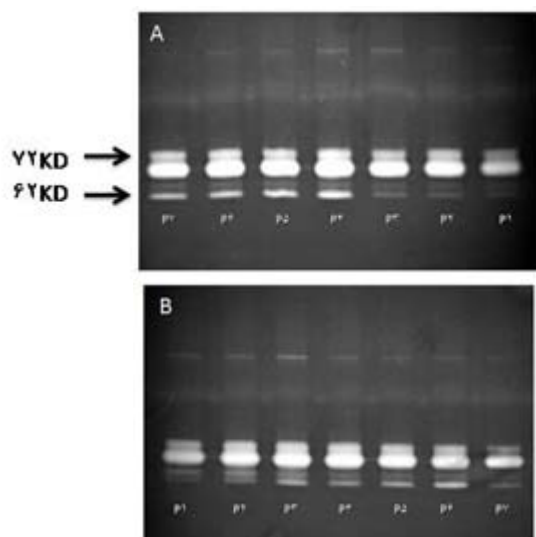
آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز

با توجه به شکل ۳، در BMSCs افزایش بیان GPX در پاساژ ۶ نسبت به سایر پاساژها به غیر از پاساژ ۴ دیده می‌شود (شکل ۳، B). در ADSCs نیز معنی‌داری افزایش بیان GPX در پاساژهای ۷-۴ نسبت به پاساژهای ۲ و ۳ نشان داده شد (شکل ۳، A). بنابراین، BMSCs در پاساژ ۶ و



شکل ۱. تصویر فازکنتراست BMSCs (A و C) و ADSCs (B و D). مورفولوژی دوکی با زوائد سیتوپلاسمی باریک و کشیده، اشکال گرد سلولی در پاساژ دوم و در تصویر (B) توده‌های زیادی قابل مشاهده است. شکل‌های C و D به ترتیب سلول‌های با مورفولوژی پهن BMSCs و ADSCs در پاساژ هفتم را نشان می‌دهند.

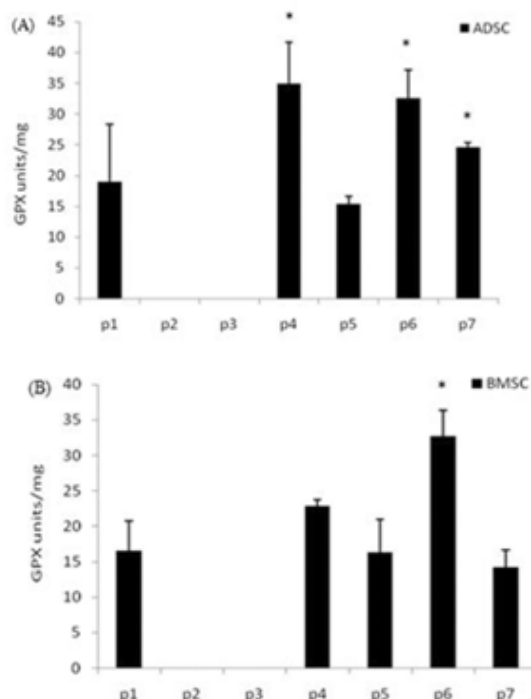
بررسی قرار گرفت. MMP-۲ با فعالیت خورندگی و هضم ژلاتین شناسایی شد (شکل ۴). MMP بر اساس وزن مولکولی خود در طول ژل مهاجرت کرده و با استفاده از ladder، وزن مولکولی نمونه تعیین شد. فعالیت MMP-۲ در قسمت مربوط به وزن مولکولی ۷۲ kDa (غیرفعال) مشاهده شد. باند دیگری با شدت ضعیف تر و وزن مولکولی ۶۲ kDa که شکل فعال آنزیم است قابل مشاهده بود (شکل ۴).



شکل ۴. ژلاتین زایموگرافی با ۳ میکرولیتر محیط حاوی نمونه. بیان ۲- MMP بصورت فعال (۶۲KD) و غیرفعال (۷۲ KD) در (A) BMSCs و (B) ADSCs در پاساژهای ۱-۷. ($P \leq 0.05$).

آنالیز دانسیته باند ناشی از فعالیت MMP-۲ در BMSCs نشان داد که شکل غیرفعال آنزیم در تمام پاساژها تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۵، A) اما در شکل فعال آنزیم بین پاساژها تفاوت معنی دار دیده شد (شکل ۵، B). شکل غیرفعال آنزیم در تمام پاساژها تقریباً به یک میزان تولید شده اما تبدیل شدن به شکل فعال آن در پاساژهای متفاوت متغیر است. در مقابل، بررسی‌ها در ADSCs حاکی از این بود که به همان نسبت که تولید شکل غیرفعال آنزیم در پاساژهای مختلف تغییر پیدا کرد، شکل فعال نیز تغییر یافت (شکل ۵، B). فعالیت ژلاتیناز در هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. در مجموع بیان MMP-۲ در ADSCs و BMSCs در پاساژ ۴ بیشترین مقدار را نشان می‌دهد ($P \leq 0.05$).

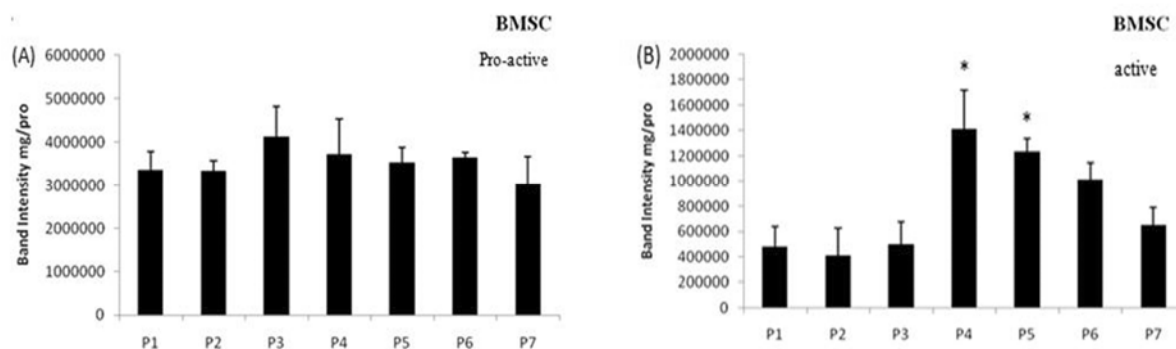
ADSCs در پاساژ ۷-۴ دارای بیشترین فعالیت GPx بودند ($P \leq 0.05$).



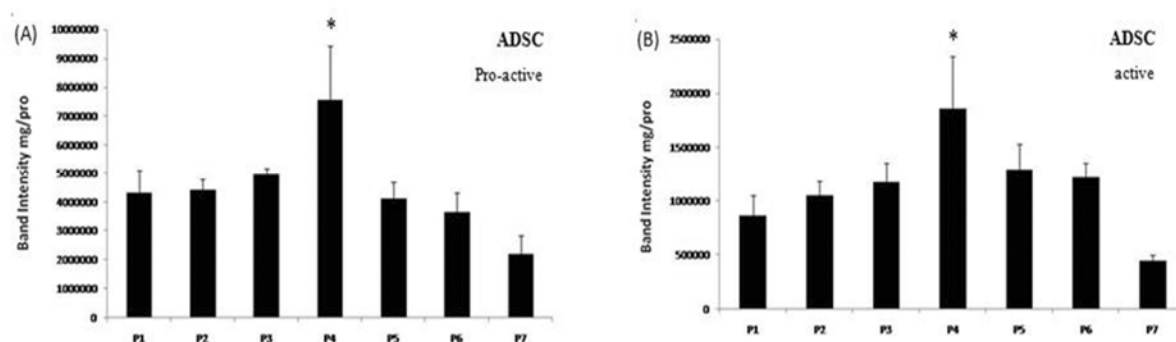
شکل ۳. نمودار ستونی بیان GPx در کشت متوالی ADSCs (A) و BMSCs (B). در ADSCs افزایش میزان GPx در پاساژ ۴، ۶ و ۷ نسبت به پاساژهای ۲ و ۳ معنی دار است. در BMSCs افزایش بیان GPx در پاساژ ۶ نسبت به سایر پاساژها به غیر از پاساژ ۴ معنی دار است. ($P \leq 0.05$).

بررسی آنزیم لاکتات دهیدروژناز و فاکتور مالون دآلدئید آنزیم‌های SOD و GPx به دو نوع داخل و خارج سلولی دسته‌بندی می‌شوند، که این مطالعه آنزیم‌های ترشح شده خارج سلولی را اندازه‌گیری نمود. فقدان آنزیم LDH در محیط رویی حاکی از سلامت غشا سلول است. هم‌چنین آزمایش دیگری که سلامت غشا سلول‌ها در پاساژهای مختلف را به اثبات می‌رساند، فقدان فاکتور MDA در محیط رویی و محلول لیز سلول بود. بنابراین می‌توان با اطمینان بیان داشت که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بررسی شده خارج سلولی بوده‌اند. زایموگرافی

در این مطالعه، ارتباط بین بیان MMP و پیری سلول در BMSCs و ADSCs و اثرات پیری روی تخریب ECM توسط MMP-۲ (ژلاتیناز A) در محیط رویی پاساژهای ۱-۷ مورد



شکل ۵. مشاهده شدت باند MMP-۲ در BMSCs (شکل غیرفعال (A) و فعال (B)). در شکل غیرفعال تفاوت معنی‌داری در شدت باند در بین پاساژهای مختلف مشاهده نمی‌شود. در شکل فعال، افزایش شدت باند MMP-۲ در پاساژهای چهارم و پنجم نسبت به پاساژهای ۱ و ۲ معنی‌دار است ($P \leq 0.05$).



شکل ۶. مشاهده شدت باند MMP-۲ در ADSCs (شکل غیرفعال (A) و فعال (B)). افزایش شدت باند در شکل فعال و غیرفعال، در پاساژ چهارم نسبت به سایر پاساژها افزایش شدت باند نسبت به پاساژ هفتم معنی‌دار است ($P \leq 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

نشانه‌های خاصی بر سطح سلول‌های خود بیان می‌کنند. از طرفی طی پاساژهای متوالی بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و MMP در آن‌ها تغییر پیدا می‌کند. در واقع هدف از تحقیق حاضر سنجش و ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی، تولید و ترشح MMP توسط BMSCs و ADSCs است. نتایج بررسی مورفولوژیکی تحقیق حاضر نشان داد که در هر دو گروه سلولی در پاساژهای پایین سلول‌هایی با مورفولوژی دوکی و کوچک هم‌راه با توده‌های زایا مشاهده می‌شوند (شکل A, B) اما در پاساژهای بالا به تدریج ظاهر سلول‌ها به سمت مورفولوژی پهن پیش رفته و توده‌های زایا ناپدید می‌شوند (شکل C, D). یکی از عواملی که باعث تغییر در فعالیت تکثیر و مورفولوژی سلول‌ها در پاساژهای متوالی می‌شود عدم تعادل بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت [۲۸] و MMPها است. به‌طوری که Nelson و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند ۳-

به منظور ترمیم اغلب بافت‌ها، روش سلول‌درمانی مورد توجه علم پزشکی ترمیمی است [۲۶]. در این شیوه‌یکی از مهم‌ترین نکات این است که از کدام نوع سلول، در چه شرایطی و در چه مرحله‌ای از کشت، برای پیوند استفاده شود. از جمله ویژگی‌های یک سلول بنیادی ایده‌آل دسترسی به تعداد زیاد سلول، سهولت استخراج با کم‌ترین درد و آسیب بافتی، برخورداری از قابلیت تکثیر و تمایز بالا و امکان پیوند اتورنیک و یا آلورنیک بدون نگرانی از رد پیوند برای درمان است [۲۷]. گفته شده که بافت‌های مغز استخوان و چربی غنی‌ترین منابع قابل دسترس از سلول‌های بنیادی هستند. BMSCs و ADSCs دوکی شکل و شبه فیروپلاستی هستند. این سلول‌ها از نظر توانایی تمایزی مولتی‌پوتنت بوده و

قابل مشاهده است. Stefan L. Marklund (۱۹۹۰) در *in vitro* نشان داد SOD_2 به وسیله تعداد کمی از سلول‌ها ترشح می‌شود [۳۴]. بنابراین ممکن است یکی از دلایل عدم تعادل، ترشح آنزیم‌ها به وسیله تعداد کمی از سلول‌ها باشد و همین امر منجر به پیری سلول‌ها حتی در پاساژهای پایین می‌شود. از این رو هدف از تحقیق حاضر، یافتن مناسب‌ترین زمان استفاده از سلول‌های بنیادی، از لحاظ بیان آنتی‌اکسیدانتی است. به طور کلی نتایج سنجش آنزیمی این تحقیق نشان داد که بیش‌ترین فعالیت SOD در پاساژ پنجم و GPx در پاساژ ششم می‌باشد (شکل ۲ و ۳). شاید یکی از دلایل این روند، مناسب‌تر بودن شرایط فعالیت سلولی در محدوده پاساژهای ذکر شده باشد. بنابراین مناسب‌ترین زمان به منظور استفاده از این سلول‌ها برای مقاصد درمانی محدوده این پاساژها می‌باشد. با توجه به یافته‌های قبلی مبنی بر پیری سلول همراه با پراکسیداسیون و آسیب غشا، افزایش رادیکال‌های آزاد و افزایش MDA در محیط رویی و هم‌چنین داخل سلول، برای اطمینان از سلامت غشا سلول و هم‌چنین حضور یا عدم حضور رادیکال‌های آزاد در داخل سلول و محیط رویی در پاساژهای ذکر شده، میزان آنزیم LDH و تغییر در تولید فاکتور MDA در محیط رویی و هم‌چنین داخل سلول بررسی شد. بنابراین بررسی آنزیم‌ها در شرایط غشا سالم سلولی و مربوط به محیط خارج سلولی می‌باشند. در مطالعات قبلی هم‌راه با پیری سلول در *in vitro* تغییر بیان $MMP-2$ مشاهده شده است. از آنجایی که اثرات پیری بر ترشح $MMP-2$ در $BMSCs$ و $ADSCs$ ناشناخته مانده است مطالعه حاضر بر تغییر بیان و فعالیت $MMP-2$ ترشح شده از این سلول‌ها هم‌راه با کشت متوالی متمرکز شده است. زایموگرافی، اشکال فعال و غیرفعال $MMP-2$ را نشان داده است (شکل ۴). Zeng و همکاران (۱۹۹۴) با مطالعه روی فیبروبلاست‌ها تغییری در فعالیت پروتئین $MMP-2$ گزارش نکردند [۳۵]. در پژوهش حاضر، در مورد $BMSCs$ ، شکل غیرفعال آنزیم در تمام پاساژها تفاوت معنی‌داری ندارد اما در شکل فعال آنزیم تفاوت چشم‌گیر دیده شد (نمودار ۵، A و B). بنابراین آنزیم

MMP با افزایش بیان ROS در سلول‌های اپی‌تلیال پستان باعث تغییر اسکلت سلول و تبدیل مورفولوژی دوکی شکل به سلول‌هایی پهن می‌شود سپس این سلول‌ها از سلول‌های مجاور و غشا پایه خود جدا شده که نشان‌دهنده نقش MMP در فرآیند مهاجرت و لانه‌گزینی سلولی می‌باشد [۲۹]. محققین معتقدند که $ADSCs$ به سادگی کشت شده و نسبت به $BMSCs$ ها سریع‌تر تکثیر می‌شوند [۳۰]. در پژوهش قبلی نیز، قابلیت خودتکثیری بیش‌تر $ADSCs$ نسبت به $BMSCs$ در پاساژهای دوم و سوم گزارش شد. هم‌چنین افزایش توانایی تکثیر $ADSCs$ نسبت به $BMSCs$ با استفاده از روش‌های MTT و $BrdU$ مشاهده شد. با محاسبه زمان دو برابر شدن سلول‌ها، کاهش توانایی تکثیر در پاساژهای انتهایی را نشان داد [۲۰]. Bonab و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند هم‌راه با افزایش سن تغییرات فیزیولوژی، عمل‌کردی و مولکولی ایجاد می‌شود، هم‌چنین توانایی تکثیر سلول‌های پیر کاهش پیدا می‌کند [۳۱]. در پژوهش قبلی، برای اطمینان از درجه خلوص $MSCs$ در هر دو نوع سلول، از نشانگرهای $CD90$ و $CD71$ استفاده شد و از طرفی قابلیت تمایز آن‌ها به سلول‌های استخوان و چربی در شرایط تمایزی نمایان شد [۲۰]. هم‌زمان با تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، و آسیب اکسیدانتیو در سلول، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت فعال شده و در سلامت سلول تلاش می‌کنند. از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی که در تعدیل فعالیت رادیکال‌های آزاد نقش دارند SOD و GPx می‌باشند که فعالیت آن‌ها به هم‌دیگر وابسته است [۳۲]. فاکتورها و شرایط خاص در آزمایشگاه باعث سنتز این آنزیم بیش‌تر از حالت استاندارد می‌شود. طی کشت متوالی در اثر تجمع H_2O_2 نسبت آنزیم‌های SOD به GPx تغییر پیدا می‌کند. رادیکال‌های هیدروکسیل افزایش پیدا کرده و ROS باعث آسیب به ماکرومولکول‌های داخل سلول می‌شود. در نتیجه مورفولوژی پیری و کاهش تکثیر در سلول‌های بنیادی قابل مشاهده است [۳۳]. در مطالعه‌ی حاضر نیز با توجه به شکل ۲ و ۳، عدم تعادل بین تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی نسبت به هم‌دیگر

فاکتورهای نوروتروفیک و یا ترمیم عصب می‌باشد. به‌طوری که Ghorbanian و همکاران (۲۰۱۰) اظهار کردند BMSCs در پاساژ پنجم، به سلول‌های عصبی بیان‌کننده نوروفیلانها، سیناپسین و ژن‌های عصبی از جمله BDNF, NGF, NT3 و همکاران (۲۰۱۰) بیان فاکتورهای نوروتروفیک در BMSCs در پاساژ پنجم را مشاهده کردند [۳۸]. Yan Jin و همکاران (۲۰۱۰) اظهار کردند که مناسب‌ترین پاساژ برای بررسی بیان فاکتورهای نوروتروفیک در MSCs و ترمیم عصب، پاساژ پنجم می‌باشد [۳۹]. همان‌طور که مشاهده شد، بیان SOD در این پاساژ بالاترین میزان را دارد. در مقاله‌ای دیگر، Colazzo و همکاران (۲۰۱۱) سلول‌ها را در پاساژهای ۳-۶ مورد استفاده قرار دادند [۴۰].

BMSCs و ADSCs از لحاظ فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx به‌طور تقریباً یکسان، در پاساژهای ۴ تا ۶ بیش‌ترین فعالیت را نشان دادند. هم‌چنین، از لحاظ فعالیت MMP، پاساژ چهارم مناسب‌ترین پاساژ است. از طرفی دیگر، سنجش MDA و LDH سلامت غشا در این سلول‌ها را نشان داد. بنابراین پاساژ چهارم از نظر ظرفیت مقابله در برابر آسیب‌های استرس اکسیداتیو و قابلیت مهاجرت و لانه‌گزینی در وضعیت مطلوب‌تری قرار دارد. هم‌چنین ADSCs دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بالاتری است.

تشکر و قدردانی

از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان که هزینه و امکانات آزمایشگاهی این پژوهش را فراهم نمودند سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

- [1] Friedenstain AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 1982; 10: 217-227.
- [2] Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315: 3598-3610.

در سلول‌ها تولید شده ولی تبدیل آن‌ها به شکل فعال در پاساژهای مختلف، متغیر است. در حالی‌که بررسی‌ها در ADSCs نشان‌دهنده این است که به همان نسبت که تولید شکل غیرفعال آنزیم در پاساژهای مختلف تغییر پیدا می‌کند شکل فعال نیز تغییر می‌یابد (نمودار ۴، A و B). از آن‌جایی برای کشت این نوع سلول‌ها، به‌طور معمول از انکوباتور CO₂ استفاده می‌گردد، میزان اکسیژن با نوسان همراه است. این عامل می‌تواند، موجب برهم خوردن تعادل آنتی‌اکسیدانت‌ها گردد که نتیجه آن در رفتار سلول‌ها پدیدار می‌شود. بنابراین نسبت گازهای O₂ به CO₂ در سلامت و طول عمر سلول یک عامل تعیین‌کننده است. به‌طوری که Fischer و همکاران (۱۹۹۴) تأثیر غلظت‌های مختلف O₂ بر تکثیر سلول‌های جنینی و بر فعالیت SOD، GPx و Cat مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که کاهش میزان O₂ باعث افزایش تکثیر سلول در محیط کشت می‌شود [۳۶]. بیانیک آنزیم آنتی‌اکسیدانتی مثل SOD نیاز سلول به محافظت در برابر استرس را تامین می‌کنند و لزوماً به دنبال افزایش SOD نیازی به افزایش GPx نیست. افزایش معنی‌دار SOD و به دنبال آن افزایش MMP در همان گروه نشان‌دهنده این است که پاساژ ۵ از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی (یعنی مقابله با استرس و آسیب سلولی) و نیز قابلیت مهاجرت و لانه‌گزینی سلولی برای پیوند به دلیل افزایش MMP در وضعیت مطلوب و هماهنگ قرار دارد. از نگاه دیگر، با توجه به نمودارهای (۲،۱) و (۴،۳) مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و MMP در پاساژهای میانی (۴-۶) به‌طور تقریبی بالاترین میزان را دارد و با توجه به نقش MMPs در مهاجرت، تغییرپذیری و لانه‌گزینی سلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در سلامت سلول به نظر می‌رسد اگر سلول‌ها را بر مبنای فعالیت خوب آنتی‌اکسیدانتی مورد بررسی قرار گیرد و یا تولید MMPs را به عنوان یک مزیت برای سلول در نظر گرفته شود، پاساژهای ذکر شده بهترین شرایط را نشان داده‌اند. از طرفی مقالات زیادی نشان می‌دهد که محدوده‌ی این پاساژها زمان مناسبی برای استفاده از MSCs در تمایز به سلول‌های عصبی و بیان

- [23] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek* 2004; 57: 453-455.
- [24] Fico A, Pagliarlunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11: 823-831.
- [25] Taghi GM, Ghasem Kashani Maryam H, Taghi L, Leili H, Leyla M. Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. *Cell Biol Int* 2012; 36: 1239-1249.
- [26] McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Wrage PC, Keefe EW, Botterman BR, et al. Autologous transplants of adipose-derived adult stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2008; 210: 14-29.
- [27] Bunnell BA, Flaate M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008; 45: 115-120.
- [28] Higuchia A, Chuanga CW, Ling QD, Huange SC, Wange LM, Chena H, et al. Differentiation ability of adipose-derived stem cells separated from adipose tissue by a membrane filtration method. *J Memb Sci* 2011; 366: 286-294.
- [29] Nelson CM, Khauv D, Bissell MJ, Radisky DC. Change in cell Shape is required for matrix metalloproteinase-induced epithelial mesenchymal transition of mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 2008; 105: 25-33.
- [30] van Dijk A, Niessen HW, Zandieh Doulabi B, Visser FC, van Milligen FJ. Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res* 2008; 334: 457-467.
- [31] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006; 10: 1-14.
- [32] Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, Kim KJ, Choi JS, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci* 2008; 49: 133-142.
- [33] de-Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35: 1281-1298.
- [34] Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J* 1990; 266: 213-219.
- [35] Zeng G, Millis AJ. Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage cultures of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1996; 222: 150-156.
- [36] Lincdenau A, Fischer B. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. *Theriogenology* 1994; 41: 889-898.
- [37] Ghorbanian MT, Tarihi T, Mesbah-Namin SA, Fathollahi Y. Selegiline is an efficient and potent inducer for bone marrow stromal cell differentiation into neuronal phenotype. *Neurol Res* 2010; 32: 185-193.
- [38] Altarihi T, Abrari K, Ghorbanian MT, Haji-Ghasem-Kashani M. In vitro expression of BDNF, BDNF, NGF, NT3 NT4/5 genes in selegiline induced bone marrow stromal cells. *Yakhteh* 2010; 4: 400-407.
- [39] Zhang Y, Luo H, Zhang Z, Lu Y, Huang X, Yang L, et al. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2010; 31: 5312-5324.
- [40] Colazzo F, Sarathchandra P, Smolenski RT, Chester AH, Tseng YT, Czernuszka JT, et al. Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: implications for heart valve tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32: 119-127.
- [3] McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Wrage PC, Keefe EW, et al. Autologous transplants of adipose-derived adult stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2008; 210: 14-29.
- [4] Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, et al. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008; 135: 551-558.
- [5] Gala K, Burdziska A, Idziak M, Makula J, Paczek L. Characterization of bone marrow derived rat mesenchymal stem cells depending on donor age. *Cell Biol Int* 2011; 35: 1055-1062.
- [6] D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115-1122.
- [7] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33: 919-926.
- [8] Liu L, DiGirolamo CM, Navarro PA, Blasco MA, Keefe DL. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2004; 294: 1-8.
- [9] Ksiazek K. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res* 2009; 12: 105-116.
- [10] Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 2003; 33: 492-496.
- [11] Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1491-1499.
- [12] Phelan JP, Austad SN. Natural selection, dietary restriction, and extended longevity. *Growth Dev Aging* 1989; 53: 4-6.
- [13] Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 290-308.
- [14] Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 195-202.
- [15] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006; 5: 91-116.
- [16] Bellantuono I, Keith WN. Stem cell ageing: does it happen and can we intervene? *Expert Rev Mol Med* 2007; 9: 1-20.
- [17] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908-3913.
- [18] Ferreira A. Abnormal synaps formation in agrin-depleted hippocampal neurons. *J Cell Sci* 1999; 112: 4729-4738.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [20] Becana M, Aparicio-Tejo P, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M. Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of medicago sativa. *Plant Physiol* 1986; 82: 1169-1171.
- [21] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 325-333.
- [22] Brooks GA. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. *Med Sci Sports Exerc* 1985; 17: 22-34.

Examination of antioxidant enzymes and matrix metalloproteinases in conditional medium of bone marrow mesenchymal stem cells and adipose-derived stem cells in vitro

Leyla Mirzaeiyan (M.Sc)¹, Mohammad-Taghi Ghorbanian (Ph.D)^{*2}, Taghi Lashkarbolouki (Ph.D)², Maryam Haji-Ghasem-Kashani (Ph.D)², Rada Dehghan (M.Sc)³

1 - Dept. of Histology and Embryology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

2 - Dept. of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran

3 - School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

(Received: 10 Jun 2013; Accepted: 19 Sep 2013)

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) have an important role in cell therapy due to those high proliferation, differentiation and cell regeneration capacity. Advent signs of Replicative Cellular Senescence (R.C.S) in culture condition are one of the problems in stem cells culture pathway before treatment. R.C.S is associated with reducing the capacity of antioxidant enzymes and matrix metalloproteinase (MMPs) proteins changes. The aim of this study was to reinvestigate and compare the production capacity of antioxidant superoxidismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes and matrix metalloproteinases (MMP-2) in conditional medium of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs).

Materials and Methods: BMSCs and ADSCs were respectively isolated from the tibia and femur bones and subcutaneous adipose tissues. These cells were cultured for alternative 7 passages in α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Evaluation of antioxidant and MMP activity in the conditional medium without serum was respectively assayed by enzymatic assay and zymography.

Results: Two types of cells studied almost identical have most activity in the expression of SOD and GPx, respectively, in 5 and 4-6 passages. Also, demonstrated MMP activity is highest in the fourth passage. On the other hand, in these cells, membrane health reported with measurement of MDA and LDH.

Conclusion: Adipose tissue has a population of stem cells with high capacity of antioxidant. Also, BMSCs and ADSCs are at highest level of antioxidant and MMP expression capacity in 4-6 passages.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Antioxidant enzymes, Matrix metalloproteinases, Replicative Cellular Senescence

* Corresponding author: Fax: +98 232 5247146; Tel +98 232 5244176
ghorbanian@du.ac.ir

How to cite this article:

Mirzaeiyan L, Ghorbanian M, Lashkarbolouki T, Haji-Ghasem-Kashani M, Dehghan R. Examination of antioxidant enzymes and matrix metalloproteinases in conditional medium of bone marrow mesenchymal stem cells and adipose-derived stem cells in vitro. *koomesh*. 2014; 15 (3) :350-358

URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1601-2&slc_lang=fa&sid=1