

ارتباط بین فعالیت تلومرازی و کینتیک رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۰ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۱ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵

زمینه و هدف: تلومراز با افزودن توالی تکراری به انتهای ۳ کروموزوم نقش بسیار مهمی در حفظ طول تلومر دارد. از طرف دیگر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی (hUC-MSCs) قابلیت تمایز به بیشتر رده‌های سلولی مانند سلول‌های عصبی و قلبی را داشته و دچار تغییرات بیولوژیکی در کشت طولانی مدت می‌شوند. از این رو انتخاب پاساژ سلولی مناسب می‌تواند در بررسی‌های تکثیر و تمایز سلولی بسیار مهم باشد. هدف از پژوهش کنونی بررسی ارتباط بین فعالیت آنزیم تلومراز در پاساژهای مختلف کشت hUC-MSCs بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از فروردین ۱۳۹۳ تا آذر ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل بر روی نمونه‌های بندناف نوزادان تازه متولد شده در بیمارستان علوی اردبیل انجام شد. قطعات کوچکی از بندناف در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ سرم جنین گاو کشت داده شدند. سپس، hUC-MSC حاصل از پاساژهای یک تا سه برای بررسی زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی (PDT) و استخراج پروتئین به روش CHAPS انتخاب شدند. در نهایت، فعالیت آنزیم تلومرازی آن‌ها در پاساژهای مختلف با استفاده از روش‌های (TRAP) Telomeric repeat amplification protocol و qRT-TRAP assay بررسی شد. **یافته‌ها:** PDT در پاساژهای یک تا سه به ترتیب $54/68 \pm 1/92$ ، $55/03 \pm 1/71$ و $69/41 \pm 2/54$ بود. میانگین فعالیت تلومرازی نیز به ترتیب $30/58 \pm 0/51$ ، $27/24 \pm 0/74$ و $32/13 \pm 0/75$ برآورد شد که افزایش معناداری را در پاساژ دوم نشان داد ($P=0/021$).

نتیجه‌گیری: با رسم منحنی رشد، تعیین PDT و سنجش فعالیت تلومرازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی مشخص شد که کشت طولانی مدت می‌تواند بر فرایند تکثیر سلولی و فعالیت تلومرازی تاثیر بگذارد.

کلمات کلیدی: منحنی رشد سلولی، فعالیت تلومرازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بند ناف انسان.

لیلا حسین‌زاده انور^۱سید سعید حسینی اصل^۲محسن سقا^{۳*}

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران.

۲- گروه ژنتیک، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۳- گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

* نویسنده مسئول: اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه

علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی

تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۰۵۲ E-mail: m.sagha@arums.ac.ir

مقدمه

مانند سلول‌های استخوانی، غضروف، چربی و عصبی. سلول‌های مزانشیمی علاوه بر بافت‌های بالغ و جنینی از بافت‌های خارج جنینی به روش غیر تهاجمی مانند جفت، غشا و مایع آمنیوتیک و ماتریکس بند ناف نیز قابل استخراج هستند.^۱

سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از ژله وارتون بند ناف انسان Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cell (WJ-MSCs) یکی از منابع سلول‌های بنیادی آسان و در دسترس است که از بافت همبند موکوییدی بند ناف انسان استخراج می‌شود.^۲ این سلول‌ها،

سلول‌های بنیادی به انواع مختلفی از سلول‌ها اطلاق می‌شود که غیر اختصاصی بوده و می‌تواند به انواع رده‌های سلولی زاینده تبدیل شوند و قابلیت خود نوسازی نیز داشته باشند. سلول‌های بنیادی به چهار نوع سلول‌های بنیادی همه‌توان، پرتوان، چندتوان و تک‌توان تقسیم شده‌اند. از بین این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نوع چندتوان بوده و انواع گوناگونی از سلول‌ها را به وجود می‌آورند،

فعالیت تلومرازی به سنجش میزان فعالیت آنزیم ریونوکلئوپروتئینی تحت عنوان تلومراز اطلاق شود که به صورت همودایمر از دو زیرواحد hTERT و hTR تشکیل شده است. بخش hTERT این آنزیم دارای فعالیت نسخه‌برداری معکوس بوده که با استفاده از زیرواحد hTR خود به‌عنوان الگو، تکرارهای ۶ نوکلئوتیدی TTAGGG را به انتهای ۳' تلومر افزوده و باعث حفظ طول تلومر در هر تقسیم سلولی می‌شود.^{۱۱}

استفاده از سلول‌های بنیادی همانند Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در پژوهش‌های سلولی و مولکولی پژوهش‌گران را مجبور می‌سازد تا داده‌ها و بینش خوبی از شرایط کشت و نحوه تکثیر و تمایز آن‌ها در کشت طولانی‌مدت خارج بدن داشته باشند و در این میان انتخاب پاساژ سلولی مناسب در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند در تصمیم‌گیری راجع به نحوه استفاده از این سلول‌ها تاثیر گذار باشد.^{۱۲} بنابراین مطالعه کنونی با هدف ارزیابی منحنی رشد سلول‌ها در پاساژهای مختلف و میزان بیان آنزیم تلومراز به‌عنوان یک شاخص مهم تکثیری در این پاساژها انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شد، نمونه بند ناف پس از زایمان با همکاری پرسنل بیمارستان علوی اردبیل و با رعایت شرایط اخلاق در پژوهش تهیه شده و در شرایط استریل در محلول نرمال سالین به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از ژله وارتون بند ناف انسان (WJ-MSCs) از نمونه‌های بند ناف به‌روش کشت قطعه بافت جداسازی شدند.^{۱۳} در ابتدا بند ناف به مدت ۳۰ ثانیه در معرض الکل ۷۰٪ قرار گرفته و به‌دنبال آن با (Gibco; 21600-051) Phosphate Buffered Saline (PBS) شستشو داده شد. قطعات بند ناف با استفاده از تیغ جراحی به‌صورت طولی برش داده شده و از ناحیه ژله وارتون آن تکه‌برداری شد و قطعاتی به ابعاد تقریبی ۳-۵ mm² به‌دست آمد. این قطعات بافتی، به فلاسک کشت سلولی T25 منتقل شده و ۳ ml از محیط کشت DMEM^{LG} (ATOCEL, ATCDL-891) حاوی FBS ۲۰٪ (Gibco, 10270-098) و Pen/Str/AmpB ۲٪

سلول‌های شبه میوفیبروبلاستی هستند که کلاژن نوع I، II و V را در دوران بارداری تولید می‌کنند. این کلاژن‌ها به ژله وارتون ویژگی انقباضی و کشسانی می‌دهند.^{۱۴} WJ-MSCs به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان مانند ایمنی‌زایی کم و مفید بودن در پیوندهای آلورژنیک و مهار رشد سرطان و نیز ترمیم بافتی مورد توجه بسیاری از پژوهش‌گران برای برنامه‌های سلول‌های درمانی قرار گرفته‌اند.^{۱۵-۱۶}

سلول‌های بدن در شرایطی به سر می‌برند که در تعامل با محیط اطراف خود اجازه رشد و تکثیر و نیز در صورت نیاز تمایز به آن‌ها داده می‌شود. کشت طولانی‌مدت در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن باعث می‌شود که کیفیت رشد و تکثیر سلول‌ها به‌طور کامل به شرایط محیط کشت اطراف آن‌ها وابسته شود. بنابراین بررسی و تعیین مشخصات رشد رده‌های سلولی یکی از کاربردی‌ترین آزمایش‌هایی است که برای هر رده سلولی انجام می‌گیرد. در این فرآیند، تعداد سلول‌های کشت داده شده اولیه و تعداد سلول‌های قابل برداشت در زمان‌های مختلف پس از شروع کشت طی روزهای متوالی یادداشت شده و بر این اساس منحنی رسم می‌شود که نشان‌دهنده کیفیت و کمیت تکثیر و رشد سلول‌هاست. به‌همین دلیل برای معرفی هر رده سلولی و نیز پیش از شروع به کار نیاز به دانستن مشخصات حاصل از رسم منحنی رشد است. منحنی رشد سلولی جهت ارزیابی ویژگی‌های رشد سلولی در سه فاز Lag (فاز سازش سلولی)، Log (فاز تکثیر تصاعدی سلول) و Plateau (فاز عدم تکثیر) صورت می‌گیرد. فاز Lag که می‌تواند چند ساعت تا چند روز به طول بیانجامد، زمان مورد نیاز برای یک سلول جهت ترمیم پس از تریسینه شدن، بازسازی اسکلت سلولی و ترشح ماتریکس خارج سلولی است که باعث تسهیل ارتباط بین سلول‌ها می‌شود. در مرحله بعدی، سلول وارد مرحله رشد نمایی می‌شود یعنی فاز لگاریتمی که در این حالت میزان جمعیت سلولی دو برابر می‌شود که تحت عنوان Population Doubling Time (PDT) شناخته می‌شود. در نهایت زمانی که جمعیت سلولی بسیار متراکم است و سوبسترای سلولی به‌طور کلی متابولیزه شده است، این سلول وارد فاز سکون می‌شود، مرحله‌ای که میزان رشد سلولی نزدیک صفر است.^{۱۷} بررسی‌های مختلف نشان داده است که ارتباط نزدیکی بین تکثیر سلولی و فعالیت تلومرازی وجود دارد، به‌طوری که می‌توان از فعالیت تلومرازی به‌عنوان یک شاخص تکثیری سلولی استفاده کرد.^{۱۸، ۱۹}

استفاده شد که در این فرمول Td زمان دو برابر شدن، T مدت زمانی که طول می‌کشد تا سلول تکثیر شود و N نشان‌دهنده تعداد سلول‌های شمارش شده می‌باشد.

جهت بررسی کیفی فعالیت تلومرایی به روش TRAP assay^{۱۴}، در ابتدا تعداد 5×10^4 hUC-MSCs از پاساژهای یک تا سه با استفاده از بافر لیز کننده CHAPS (Merck, 1.11662.001) لیز شده و پس از انکوبه شدن در دمای 4°C به مدت ۳۰ دقیقه و سانتریفیوژ با دور 13000 rpm در دمای 4°C غلظت پروتیین استخراجی تمام نمونه‌ها به روش بردفورد و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific; ND-2000C, UK) در طول موج 595 nm اندازه‌گیری شد. سپس حدود $1\ \mu\text{g}$ از پروتیین استخراج شده از هر پاساژ به همراه پرایمر TS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 30°C جهت تکثیر الگوهای شش جفت بازی مشابه انتهای تلومری توسط آنزیم تلومرایی احتمالی موجود در نمونه انکوبه شد. مرحله بعدی واکنش به همراه پرایمرهای ACX، NT و TSNT در دستگاه Master cycler S330 (Applied Biosystems, Foster. City, CA, USA) و 35°C چرخه شامل 30°C ثانیه در 94°C ، 30°C ثانیه در 52°C و 90°C ثانیه در 72°C انجام شد. توالی‌های تکراری شش تایی با طول‌های متفاوت توسط پرایمرهای TS و ACX تکثیر می‌شوند تا قابل ارزیابی باشند. پرایمرهای NT و TSNT نیز به‌عنوان کنترل مثبت، صحت انجام PCR را نمایش می‌دهند. در این روش آنزیم تلومراز غیر فعال شده hUC-MSCs با فعالیت مثبت تلومراز به‌عنوان کنترل منفی و از سلول‌های سرطانی معده AGS به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از انجام PCR، تمام نمونه‌ها بر روی ژل 1% پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

(ATOCEL, ATRB-010) به آن‌ها اضافه شد. پس از انتقال فلاسک‌های کشت سلولی به دخل انکوباتور CO_2 دار، به‌ازای هر سه تا چهار روز نیمی از محیط کشت تعویض شد. پس از حدود ۸-۶ روز جوانه‌های سلولی از پیرامون قطعات ژله وار تون خارج شده و تا رسیدن به تراکم بیش از 80% کشت سلولی ادامه یافت. پس از حدود ۱۴ تا ۱۶ روز سلول‌ها برای پاساژ دادن آماده شدند.

در طی کشت سلول‌ها به‌صورت یک الگوی رشد شامل فاز Lag یا تاخیری، فاز Log یا تکثیر و فاز Plateau یا سکون پیش می‌روند. در این مطالعه hUC-MSCs پاساژهای یک تا سه از لحاظ منحنی رشد مورد مقایسه قرار گرفتند. سلول‌های پاساژ یک، دو و سه (P1, P2, P3) پس از شستشو با محلول PBS تحت تاثیر آنزیم تریپسین از کف ظرف جدا شدند. پس از شمارش سلولی توسط لام نئوبار، جهت رسم منحنی رشد تعداد 1×10^3 hUC-MSCs پاساژهای یک تا سه در ظروف ۹۶ چاهکی به مدت ۱۲ روز در محیط DMEM^{LG} حاوی FBS 10% کشت داده شده و در طی این مدت محیط کشت سلولی هر سه روز یک‌بار تعویض گردید. سپس هر روز سلول‌های مربوط به تعداد ثابتی از چاهک‌ها جدا و پس از رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو توسط لام نئوبار شمارش شدند. این کار به‌طور مدام تا دوازده روز برای هر یک از پاساژهای یک تا سه به‌صورت تکرار سه‌تایی از بند ناف‌های مختلف صورت گرفت. در نهایت منحنی رشد سلولی جهت تعیین فاز تاخیری، لگاریتمی و خطی ترسیم شد.

جهت سنجش دو برابر شدگی جمعیت سلولی (PDT)، کمیتی که نشان‌دهنده تعداد دفعات دو برابر شدن یک سلول در یک دوره کشت می‌باشد، از داده‌های یک دوره کشت محدود و دانستن تعداد اولیه و تعداد سلول‌ها در انتهای دوره از فرمول ریاضی پترسون ($\text{Td} = \text{Tlg}2/\text{lg}(\text{Nt}/\text{N0})$)

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش TRAP-assay و qRT-TRAP assay

توالی (۵'→۳')	نوع پرایمر
5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'	TS
5'-GCGCGG(CTTACC) ₃ CTAAC-3'	ACX
5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'	NT
5'-AATCCGTCGAGCGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3'	TSNT

جهت تعیین منحنی رشد سلولی و تعیین مدت زمان مورد نیاز برای دو برابر شدن جمعیت hUC-MSCs، PDT این سلول‌ها به مدت ۱۲ روز در پاساژهای مختلف (از P₁ تا P₃) مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود hUC-MSCs پس از حدود سه روز قرار گرفتن در مرحله تاخیری شروع به تکثیر نموده و در فاصله روزهای سوم تا نهم از سرعت تکثیر زیادی برخوردار بودند. در این بررسی مشخص شد که آهنگ رشد سلول‌ها در پاساژهای یک و دو به مراتب از پاساژ سه بیشتر بود. همچنین یافته‌های به‌دست‌آمده از تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌ها (PDT) نشان داد که hUC-MSCs در پاساژ یک و دو به ترتیب بین محدوده ۵۴/۶۸±۱/۹۲ و ۵۵/۰۳±۱/۷۱ ساعت بود که این میزان در سلول‌های پاساژ سه به ۶۹/۴۱±۲/۵۴ افزایش یافت (شکل ۲).

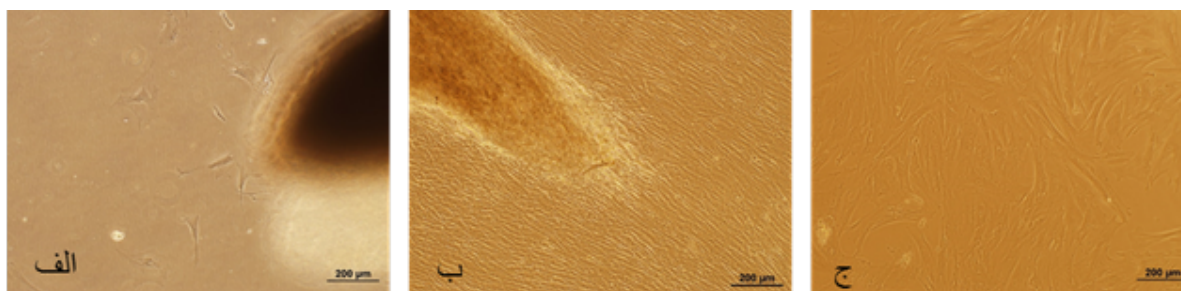
جهت بررسی کیفی فعالیت تلومرازی hUC-MSCs و تعیین فازی که بیشترین فعالیت تلومرازی را دارد از روش TRAP-assay استفاده شد. در این روش فعالیت تلومرازی به‌صورت باندهای مجزا مشاهده می‌شود، به‌طوری که افزایش فعالیت تلومرازی با افزایش تعداد باندها مشخص می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که فعالیت تلومرازی hUC-MSCs در پاساژهای یک تا سه از کشت سلولی تغییر چندانی صورت نگرفته است. در این بررسی کنترل منفی، آنزیم تلومراز غیر فعال شده بوده است. در این روش سلول‌های AGS به‌عنوان کنترل مثبت انتخاب شدند (شکل ۳).

بررسی کمی فعالیت تلومرازی در پاساژهای مختلف کشت سلولی

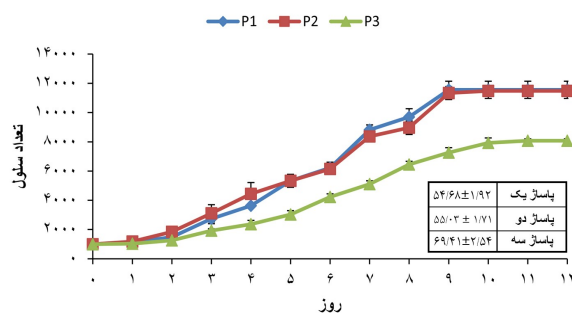
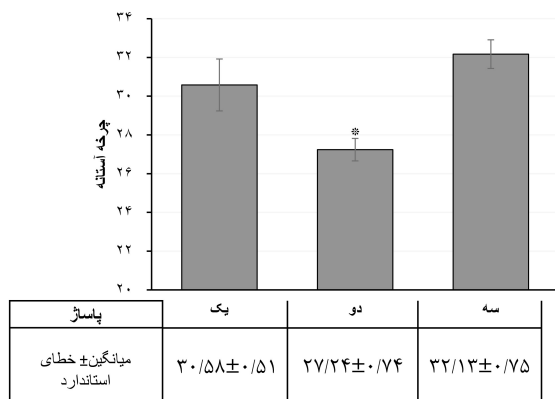
جهت بررسی کمی فعالیت تلومرازی، دستگاه ABI 7500 real-time PCR (Applied Biosystem; 4351104) استفاده شده و بر اساس پروتکل کیت سایبرگرین (UREx; E0401) انجام شد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در دو مرحله به‌صورت ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه در مرحله اول و ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ °C به مدت یک دقیقه برای ۴۰ سیکل متوالی در مرحله دوم انجام شد. جهت آنالیز تفاوت بین گروه‌ها در سه تکرار مستقل از هم از آزمون آماری One-way ANOVA با استفاده از SPSS software, version 22 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) استفاده شد و $P < 0.05$ به‌عنوان حداقل سطح معناداری در نظر گرفته شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارایه شد.

یافته‌ها

به‌دنبال جداسازی قطعات بافتی بند ناف و کشت اولیه در فلاسک، پس از شش تا هشت روز سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از ژله وارتون بند ناف انسان شروع به جدا شدن از اطراف این قطعات نموده و به کف فلاسک چسبیدند (شکل ۱-الف). در طی حدود ۱۴ تا ۱۶ روز، سلول‌ها کف فلاسک کشت را پر نموده و جهت پاساژ سلولی آماده شدند (شکل ۱-ب). این سلول‌ها تا پاساژ سه کشت داده شدند و مورفولوژی شبه فیروبلاستی داشتند (شکل ۱-ج).



شکل ۱: الف) کشت قطعه‌ای از ژله وارتون بند ناف (توده تیره‌رنگ) و شروع مهاجرت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آن پس از ۸-۶ روز کشت. ب) تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهاجرت‌یافته از توده بافتی اولیه در روزهای ۱۶-۱۴. ج) سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون با مورفولوژی شبه فیروبلاستی در پاساژ دوم (P2).



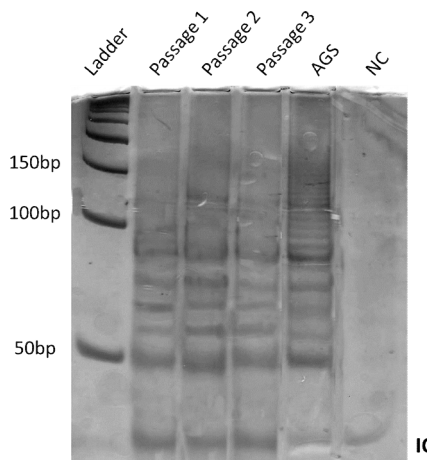
شکل ۲: منحنی رشد، میانگین و خطای استاندارد دو برابر شدن جمعیت سلولی hUC-MSCs در پاساژهای یک تا سه

شکل ۴: فعالیت تلومرازی hUC-MSCs در پاساژهای یک تا سه. مقدار چرخه آستانه پاساژ دو تفاوت معنادار را با سایر گروه‌ها نشان داد ($P < 0.05$).

نسبت به پاساژ دو این اختلاف معنادار بود ($P < 0.05$) ولی با پاساژ یک تفاوت معناداری را نشان نداد ($P > 0.05$) (شکل ۴).

بحث

بررسی‌های مختلف نشان داده است که با افزایش سن، تعداد و خواص عملکردی سلول‌های بنیادی به دلیل کاهش تدریجی در پتانسیل رشد تغییر می‌یابد. فاکتورهای تاثیرگذار در این فرایند شامل آسیب‌های DNA، کاهش فعالیت تلومرازی، کوتاهی طول تلومر و استرس اکسیداتیو می‌باشد.^{۱۶،۱۷} پژوهش‌های چند دهه اخیر در جهت درک پیری به بررسی تغییرات مرتبط با دو جایگاه سلولی یعنی تلومر و هستک پرداخته است، به طوری که کوتاهی تلومر می‌تواند به عنوان کاهش تدریجی قابلیت تکثیر یا پیری سلولی سلول‌های کشت شده به دلیل عدم توانایی DNA پلیمراز در همانندسازی کامل انتهای DNA خطی باشد.^{۱۷} بنابراین در اثر مشکل همانندسازی در انتهای کروموزوم در هر تقسیم سلولی از طول تلومر کاسته شده و در صورت نبود مکانیسمی برای جلوگیری از کوتاهی تدریجی تلومر، سلول وارد مرحله عدم فعالیت سلولی (Senescence) شده و موجب پدیده فیزیولوژیک پیری می‌شود. این پدیده در سلول‌های پیکری بدن به طور پیوسته مشاهده می‌شود و تلومر به عنوان ساعت بیولوژیکی عمل می‌کند ولی



شکل ۳: فعالیت تلومرازی در پاساژهای مختلف سلولی یک تا سه توسط TRAP- Assay، از سلول‌های رده سرطانی معده (AGS) به عنوان سلول‌های کنترل مثبت با فعالیت تلومرازی بالا استفاده شد. NC: Negative Control, IC: Internal Control

با روش Quantitative Real-Time PCR صورت گرفت که تکنیکی با حساسیت بالا در تعیین فعالیت تلومرازی محسوب می‌شود. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت تلومرازی سلول‌های پاساژ یک در چرخه آستانه $30/58 \pm 0/51$ قرار داشت که با افزایش پاساژ سلولی به پاساژ دوم چرخه آستانه فعالیت آنزیم تلومراز به طور معناداری به $27/24 \pm 0/74$ کاهش یافت ($P < 0.05$). بررسی کمی فعالیت این آنزیم در پاساژ سه مشخص نمود که چرخه آستانه این فعالیت به $32/13 \pm 0/75$ افزایش یافت که

سلول‌های بنیادی و سرطانی با داشتن آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی به نام تلومراز باعث افزایش طول تلومر خود می‌شوند.^{۱۸}

بررسی‌ها نشان داد که اختلاف معناداری در طول توالی تلومری انتهای کروموزوم سلول‌های بنیادی در مراحل مختلف تکثیر وجود دارد و فعالیت تلومرزی کاهش می‌یابد.^{۱۹} باز فعال شدن تلومراز در سلول‌های انسانی کشت شده منجر به افزایش نیمه عمر تکثیری این سلول‌ها می‌شود.^{۱۹} همچنین نقش مهمی در خود نوسازی سلول‌های بنیادی نیز دارد.^{۲۰} ارتباط بین کاهش رشد سلول‌های بنیادی در اثر فرایند پیری و کاهش فعالیت تلومرزی به روشنی مورد مطالعه قرار نگرفته است ولی ویژگی‌های اساسی مانند سطح فعالیت تلومرزی، زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی، تغییرات مورفولوژیکی و وضعیت چرخه سلولی به‌عنوان نشانگرهای عمومی در نظر گرفته شده‌اند.^{۲۱} به‌منظور بررسی اثر کشت طولانی‌مدت *In vitro* بر روی ویژگی‌های بیولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بند ناف انسان، در پژوهش کنونی به آنالیز زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی و فعالیت تلومرزی به‌عنوان شاخص مهم تکثیری و ارتباط بین این دو پرداخته شد.

زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی (PDT) سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژهای مختلف در میان گزارشات، مختلف و متفاوت بوده است. در حالت کلی، PDT در بیشتر گزارشات افزایش زمان تکثیر را با افزایش پاساژ سلولی در MSCs نشان داده است. در مطالعه کنونی، طی بررسی‌های صورت گرفته از PDT این سلول‌ها در پاساژهای یک تا سه افزایش مدت زمان تکثیر در پاساژهای بالاتر را نشان داد. این میزان در طی پاساژ سه از کشت سلولی به ۶۹/۴۱ ساعت افزایش یافته بود که در مقایسه با پاساژهای یک و دو این اختلاف معنادار بود.

در گزارش دیگری که PDT سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در طی ۲۰ پاساژ سلولی مورد بررسی قرار گرفت، به‌طور معناداری افزایش PDT را تا ۲۲۱ ساعت در پاساژهای آخر نشان داده است.^{۲۲} پژوهش‌گران عنوان کرده‌اند که پتانسیل رشد MSCs حد واسط بافت‌های بالغ و جنینی است.^{۲۳} در مطالعه دیگری پتانسیل رشد و تمایز MSCs‌های انسانی برگرفته از افراد جوان و پیر قدرت رشد و تمایز متفاوتی را نشان داده‌اند که این کاهش رشد می‌تواند ناشی از تفاوت در سن و طول تلومر کروموزوم‌ها و سطح

فعالیت تلومرزی باشد.^{۲۵}

سطح فعالیت تلومرزی در بیشتر سلول‌های بنیادی بالغ مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از مغز استخوان و ژله وارتون بند ناف پایین بوده و در گزارشات مختلف به یکسان بودن میزان فعالیت تلومرزی در این سلول‌ها با سلول‌های سوماتیک تمایز یافته اشاره شده است.^{۲۶} در مطالعه کنونی فعالیت تلومرزی hUC-MSCs در پاساژهای مختلف به دو صورت کمی qRT-TRAP assay و کیفی TRAP-assay مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش Real-Time PCR روشی حساس، قابل اطمینان و دقیق نسبت به روش معمولی TRAP assay بر پایه PCR بوده و کاهش فعالیت تلومرزی را به‌خوبی نشان می‌دهد. در گزارش دیگری به حساس بودن روش qRT-TRAP assay برای تعیین فعالیت تلومرزی سلول‌هایی مانند سلول‌های فیروبلاستی که سطح فعالیت تلومرزی آن‌ها بسیار کم است در مقایسه با روش TRAP-ELISA assay اشاره شده است.^{۲۷}

مطالعه کنونی به‌روش کیفی نشان داد که فعالیت تلومرزی WJ-MSCs در مقایسه با سلول‌های سرطانی AGS در سطح پایینی قرار دارد که می‌تواند نشانی از افزایش کنترل نشده فعالیت تلومرزی در این رده سلولی سرطانی باشد.^{۲۸} در میان گزارشات مختلف و بررسی انجام گرفته بر روی فعالیت تلومرزی سلول‌هایی مانند سلول‌های Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) پایین بودن میزان این فعالیت در این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های Hela و سلول‌های تلومراز مثبت 293T اشاره شده است.^{۲۹}

با بررسی سطح فعالیت تلومرزی hUC-MSCs در سه پاساژ مختلف P₁ تا P₃ به‌روش کیفی مشخص شد که کشت طولانی‌مدت بر فعالیت تلومرزی تاثیر چندانی ندارد. این حالت ممکن است به‌علت پایین بودن دقت و حساسیت این روش باشد در حالی که در روش کمی که با روش حساس qRT-TRAP assay آنالیز شد، در پاساژ دو کشت سلولی، فعالیت تلومرزی در چرخه آستانه ۲۷/۲۴ قرار داشت که بیشترین میزان فعالیت را در مقایسه با سایر پاساژها نشان داد. در گزارش دیگری بررسی فعالیت تلومرزی در کشت طولانی‌مدت BM-MSCs، کاهش تدریجی فعالیت تلومرزی را نشان داده شده بود.^{۳۱} کاهش فعالیت تلومرزی در طی کشت طولانی‌مدت به‌خوبی شناخته شده است^{۳۲} ولی به‌نظر می‌رسد که تاخیر در تکثیر ایجاد شده

فعالیت تلومرازی با استفاده از دو روش کیفی TRAP assay و کمی qRT-TRAP assay نشان داده شد که کشت طولانی مدت می‌تواند بر فرایند تکثیر سلولی و فعالیت تلومرازی تاثیر بگذارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که کاهش فعالیت تلومرازی مشاهده شده در این پژوهش با بررسی طول تلومر و همچنین میزان بیان ژن TERT در پاساژهای سلولی مختلف نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی با عنوان "تاثیر سلنو-آل-متیونین و سدیم سلنیت بر فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله و ارتون بند ناف انسان" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۲۲۰۰۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از بیمارستان‌های علوی و امام خمینی (ره) اردبیل و همکاری صمیمانه پرسنل محترم اتاق عمل این بیمارستان‌ها که در جمع‌آوری بند ناف نوزادان ما را یاری نمودند اعلام می‌دارند.

در کشت طولانی مدت ناشی از پیری سلولی باشد که همان‌طور که اشاره شده بود یکی از عوامل آن کاهش فعالیت تلومرازی به دلیل کاهش بیان ژن TERT به‌عنوان یک عامل کنترلی برای بیان این آنزیم می‌باشد، به‌طوری که میزان بیان این ژن در سلول‌های بنیادی به‌شدت کنترل می‌شود.^{۳۰} علاوه بر این همان‌طور که نشان داده شد میزان بیان آنزیم تلومراز در این سلول‌ها در سطح پایینی قرار دارد و این احتمال نیز وجود دارد که سطح آنزیم تلومراز جهت حفظ یکپارچگی طول تلومر سلول‌های بنیادی ناکافی باشد.^{۳۱} نکته قابل توجه اینکه در برخی از MSCs، مکانیسمی که باعث حفظ طول تلومر در غیاب فعالیت تلومرازی می‌شود به‌خوبی شناخته نشده است، ولی مطالعات نشان داده‌اند که مکانیسمی با عنوان Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) در این فرایند درگیر است که از انتهای تلومر یک DNA تک‌رشته‌ای به‌عنوان الگو برای انتهای تلومر دیگر استفاده نموده و باعث افزایش در توالی تلومریک می‌شود.^{۳۲} با توجه به نتایج حاصل از رسم منحنی رشد و تعیین PDT و سنجش

References

- Steinhoff G. Regenerative medicine: from protocol to patient. *J Stem Cells Regen Med* 2011;7(1):57-8.
- Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):11692-712.
- Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R. Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol* 2013;28(10):1235-44.
- Filiz AA, Rahime B, Keskin HL, Esra AK. Positive correlation between the quantity of Wharton's jelly in the umbilical cord and birth weight. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2011;50(1):33-6.
- Yoon H-H, Jung B-Y, Seo Y-K, Song K-Y, Park J-K. In vitro hepatic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell. *Process Biochem* 2010;45(12):1857-64.
- Semenov OV, Breyman C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly and their potential for cardio-vascular tissue engineering. *Open Tissue Eng Reg Med J* 2011;4(1):64-71.
- Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta* 2011;32 Suppl 4:S311-5.
- Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5th ed. New Jersey, NJ: John Wiley and Sons; 2005.
- Murillo-Ortiz B, Albarán-Tamayo F, López-Briones S, Martínez-Garza S, Benítez-Bribiesca L, Arenas-Aranda D. Increased telomere length and proliferative potential in peripheral blood mononuclear cells of adults of different ages stimulated with concanavalin A. *BMC Geriatr* 2013;13:99.
- Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 2012;4(8):691-704.
- Sandin S, Rhodes D. Telomerase structure. *Curr Opin Struct Biol* 2014; 25:104-10.
- Lian J, Lv S, Liu C, Liu Y, Wang S, Guo X, et al. Effects of serial passage on the characteristics and cardiac and neural differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2016;2016:9291013.
- Mohseni Kouchesfehiani H, Sarace F, Maleki M, Nikougofar M, Khatami M, Sagha M. Evaluation of surface markers and related genes of the human umbilical cord derived Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014;24(112):24-32. [Persian]
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(5193):2011-5.
- Yan LJ. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol* 2014;2C:165-9.
- Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol* 2013;13(5):376-89.
- DiLoreto R, Murphy CT. The cell biology of aging. *Mol Biol Cell* 2015;26(25):4524-31.
- Blagoev KB. Cell proliferation in the presence of telomerase. *PLoS One* 2009;4(2):e4622.
- Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett* 2010;584(17):3826-30.

20. Shatirishvili MK, Loladze G. Cord blood hematopoietic stem cell expansion: preclinical studies and clinical trials. *CellR4* 2014;2(5):e1209.
21. Hornsby PJ. Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol* 2007;42(7):575-81.
22. Lansdorp PM. Telomeres, stem cells, and hematology. *Blood* 2008;111(4):1759-66.
23. Jeon BG, Kwack DO, Rho GJ. Variation of telomerase activity and morphology in porcine mesenchymal stem cells and fibroblasts during prolonged in vitro culture. *Anim Biotech* 2011;22(4):197-210.
24. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64(2):278-94.
25. Stenderup K. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33(6):919-26.
26. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2002;8(6):901-10.
27. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003;17(6):1146-9.
28. Ceja-Rangel HA, Sanchez-Suarez P, Castellanos-Juarez E, Penaraja-Flores R, Arenas-Aranda DJ, Gariglio P, et al. Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines. *Tumour Biol* 2016; Apr 12.
29. Zhao YM, Li JY, Lan JP, Lai XY, Luo Y, Sun J, et al. Cell cycle dependent telomere regulation by telomerase in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369(4):1114-9.
30. Bischoff DS, Makhijani NS, Yamaguchi DT. Constitutive expression of human telomerase enhances the proliferation potential of human mesenchymal stem cells. *Biores Open Access* 2012;1(6):273-9.
31. Gutmajster E, Witecka J, Wyskida M, Koscinska-Marczewska J, Szwed M, Owczarz M, et al. Telomere length in elderly Caucasians weakly correlates with blood cell counts. *Sci World J* 2013;2013:153608.
32. Neumann AA, Watson CM, Noble JR, Pickett HA, Tam PP, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells. *Genes Dev* 2013;27(1):18-23.

Relationship between the telomerase activity and the growth kinetics of the human umbilical cord derived mesenchymal stem cells

Leila Hosseinzadeh Anvar
M.Sc.^{1,2}
Saeid Hosseini-Asl Ph.D.²
Mohsen Sagha Ph.D.^{3*}

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran.

2- Department of Genetics, Laboratory of Medical Genetics, Imam Khomeini's Hospital, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

3- Department of Anatomical Sciences and Pathology, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

* Corresponding author: Department of Anatomical Sciences and Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, University St., Ardabil, Iran.
Tel: +98 45 33510052
E-mail: m.sagha@arums.ac.ir

Abstract

Received: 10 Jan. 2016 Revised: 31 Jul. 2016 Accepted: 22 Sep. 2016 Available online: 26 Sep. 2016

Background: Telomerase as an enzyme with reverse transcriptase activity has an essential role in telomere maintenance by adding a telomere repeat sequence to the 3' end of chromosome and is important for regulating of many processes in embryonic development including cell proliferation and differentiation. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) with a self-renewal capacity are cells that can differentiate into various germ layer derivatives including neural cells and cardiomyocytes, and undergo biological changes during long-term cultivation. Hence, the passage number in which the cells expanded seems to be very important for proliferating and differentiating. This study was aimed at investigating the relationship between the telomerase activity and the growth rate of (hUC-MSCs) at different passages.

Methods: This experimental study was performed in Ardabil University of Medical Sciences, Iran, from March 2014 to December 2014. The umbilical cord samples were obtained from full-term neonate hospitalized in Alavi's Hospital in Ardabil under sterile conditions. The umbilical vessels were clear off and the small pieces of the umbilical cord were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS). Then, the hUC-MSCs were harvested from passage one to three to calculate the population doubling time (PDT) and extract proteins by using CHAPS lysis buffer. Finally, the telomerase activity of the cells at different passages was measured by telomeric repeat amplification protocol (TRAP) and qRT-TRAP assays.

Results: The hUC-MSCs population doubling time at passage from 1 to 3 were calculated as the average of 54.68 ± 1.92 , 55.03 ± 1.71 and 69.41 ± 2.54 hours, respectively, suggesting the higher cell passage number, the more extended PDT. The threshold cycles (CTs) for the telomerase activity also showed 30.58 ± 0.51 , 27.24 ± 0.74 and 32.13 ± 0.75 for the cell passage from one to three, respectively, representing the significant increasing in telomerase activity at passage two compared with the other passages ($P = 0.021$).

Conclusion: Analysis of the growth curve, PDT determination and measurement of telomerase activity of the human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells showed that the long-term cell culture can affect on the cell proliferation and the telomerase activity.

Keywords: cell growth curve, human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, telomerase activity.