

ارزیابی میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از مجاورت با سکر توم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن‌های *HIF-1α* و *Nrf2*

فاطمه سلطانی^۱، فاطمه امیری^۲، مریم خیراندیش^۳، مهشید محمدی‌پور^۴، محسن جلیلی^۵،
مهریار حبیبی رودکنار^۶، محمد علی جلیلی^۷

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، یک منبع سلولی ایده‌آل برای پیوند می‌باشند. اما استرس‌های مختلف در طول تکثیر آزمایشگاهی منجر به کاهش بقای سلولی آن‌ها پس از پیوند می‌شود. بنابراین به کارگیری راه کارهای عملی جهت افزایش میزان بقای آن‌ها در ریز محیط سرشار از استرس بسیار ضروری است. هدف این مطالعه، بررسی اثر سکر توم ترشحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با دو ژن *HIF-1α* و *Nrf2* بر بقای این سلول‌ها، تحت استرس‌های سلولی مختلف بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، پلاسمیدهای نو ترکیب *pcDNA3.1-HIF-1α* و *pcDNA3.1-Nrf2* به طور جداگانه و هم زمان به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف ترانسفکت شدند. ۷۲ ساعت بعد، بیان *HIF-1α* و *Nrf2* در سلول‌های دست‌ورزی شده به روش RT-PCR بررسی شد. گروه‌های سلولی مختلف با استرس اکسیداتیو، فقر سرمی و کمبود اکسیژن مواجه شدند. سکر توم سلول‌های ترانسفکت شده جمع‌آوری و تغلیظ شده و با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف مجاور شد. بقای سلول‌ها پس از اعمال شرایط استرس مشابه با روش WST-1 بررسی شد.

یافته‌ها

سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده، ژن‌های *HIF-1α* و *Nrf2* را بیان کردند. این سلول‌ها میزان بقای $(5/5 \pm 84/5 \%)$ بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل $(4/3 \pm 55/3 \%)$ نشان دادند. هم چنین بقای سلول‌های کشت داده شده با سکر توم پس از مواجهه با استرس‌های مختلف، $6/3 \pm 81/3 \%$ و بقای گروه کنترل $4/3 \pm 57/9 \%$ بود.

نتیجه‌گیری

سکر توم سلول‌های دست‌ورزی شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در برابر استرس اکسیداتیو، فقر سرمی و کمبود اکسیژن محافظت می‌کند.

کلمات کلیدی: محیط رویی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بقای سلولی

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۶

تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲

- ۱- کارشناس ارشد زیست فن‌آوری پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- PhD ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- دانشجوی PhD ژنتیک - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۵- دانشجوی دامپزشکی - دانشگاه آزاد اسلامی کرج - کرج - ایران
- ۶- PhD زیست فن‌آوری پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۷- مؤلف مسئول: PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

امروزه انواع مختلف سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌های ارثی و اکتسابی کاربرد دارند. پس از شناسایی گروه دیگری از سلول‌های بنیادی غیر خونساز یا همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی، امید به استفاده از این سلول‌ها در پیوند و ترمیم بافت‌های آسیب دیده افزایش پیدا کرد و گروه‌های مختلفی بر روی کاربرد بالینی این سلول‌ها کار کرده‌اند (۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) Mesenchymal Stem Cells، توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی را داشته، در آزمایشگاه به آسانی از بافت‌های مختلف جدا و تکثیر داده می‌شوند (۵-۲). این سلول‌ها دارای ویژگی‌های خاص مانند خصوصیت تعدیل ایمنی و توانایی مهاجرت و جایگزینی در محل آسیب دیده هستند (۹-۶). امروزه از این سلول‌ها به عنوان یک منبع سلولی ایده آل در زمینه سلول درمانی، ژن درمانی و نیز مهندسی بافت استفاده می‌شود.

با این وجود، آسیب‌های وارده به آن‌ها قبل و بعد از پیوند که در نتیجه عوامل آسیب‌رسان ریز محیط‌ها ایجاد می‌شوند، در مجموع باعث مرگ زودرس سلول‌های بنیادی مزانشیمی در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند شده و موجب کاهش کارایی سلول درمانی به پایین‌تر از حد انتظار می‌گردند (۱۰). از مهم‌ترین این عوامل آسیب‌رسان؛ کمبود اکسیژن، فقر غذایی و وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از واکنش‌های اکسیداسیون و احیا یا همان استرس اکسیداتیو می‌باشند (۱۱).

با توجه به مطالب ذکر شده، افزایش مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر شرایط استرس‌زا جهت افزایش کارایی پیوند این سلول‌ها، بسیار حیاتی است (۱۲). بدین منظور در مطالعه‌های مختلف، راه‌کارهای گوناگونی همانند پیش شرطی کردن و بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار گرفته شده‌اند (۱۴، ۱۳).

مطالعه‌های متعددی در زمینه افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها با ژن‌های محافظت‌کننده سلولی مختلف انجام شده است (۱۸-۱۵). از جمله ژن‌های محافظت‌کننده سلولی، دو ژن *Nrf2* یا NF-E2 Nuclear Factor-Erythroid

2 Related Factor (-) و *HIF-1α* Hypoxia Inducible Factor-1α) می‌باشند که به عنوان دو فاکتور رونویسی منجر به بیان مجموعه ژن‌هایی می‌گردند که افزایش مقاومت این سلول‌ها را مقابل شرایط استرس اکسیداتیو و کمبود اکسیژن به دنبال خواهد داشت (۲۰، ۱۹).

اما متأسفانه با وجود مؤثر بودن روش دست‌ورزی ژنتیکی در افزایش کارآمدی سلول‌ها در پیوند، استفاده از سلول دست‌ورزی شده در بالین، مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیست. از طرفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی ترشح سیتوکین‌ها و مولکول‌های فعال زیستی زیادی را دارا می‌باشند (۲۱). سکرئوم (Secretome) مجموعه‌ای از سیتوکین‌های تعدیل‌کننده ایمنی و درمانی مترشح از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است (۲۲). به نظر می‌رسد سکرئوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* و *HIF-1α*، حاوی مجموعه‌ای از پروتئین‌هایی باشد که می‌تواند در افزایش مقاومت سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو و شرایط کمبود اکسیژن مؤثر باشند، بدون دست‌ورزی مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نتایج قابل قبولی در افزایش بقای این سلول‌ها به دنبال داشته و گامی مؤثر جهت افزایش کارایی استفاده از این سلول‌ها در بالین محسوب شود.

از آن جا که سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاربردهای فراوانی در سلول درمانی دارند، بهبود درصد بقای آن‌ها با روش‌های مناسب مانند استفاده از مواد ترشحي خود این سلول‌ها می‌تواند نگرانی‌ها در زمینه استفاده از سایر روش‌های موجود در افزایش بقای آن‌ها مانند عدم ایمنی و سلامت و یا احتمال برانگیختن پاسخ ایمنی را کاهش دهد.

با توجه به مطالعه‌ها و مطالب ذکر شده و با این فرضیه که استفاده از سکرئوم سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1α* می‌تواند مشکل عدم امکان استفاده از سلول‌های دست‌ورزی شده در بالین را مرتفع سازد و از طرفی فقدان مطالعه مشابه در زمینه بررسی اثرات پاراکرین سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بقای این سلول‌ها، این مطالعه با هدف بررسی اثر سکرئوم ترشحي سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و

HIF-1α بر میزان بقای این سلول‌ها پس از القای استرس‌های سلولی مختلف (کمبود اکسیژن، فقر غذایی و استرس اکسیداتیو) طراحی و انجام شد. بدین ترتیب پس از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف در شرایط مناسب، محیط کشت رویی (سکرتموم) آن‌ها جمع‌آوری شده و با این سلول‌ها مجاور گردید. در نهایت میزان بقای سلول‌های کشت داده در مجاورت سکرتموم پس از مواجهه با شرایط استرس اکسیداتیو، کمبود اکسیژن و فقر سرمی نسبت به گروه کنترل ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف موجود در ذخیره سلولی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی-پژوهشی طب انتقال خون، که قبلاً مارکرهای سطحی و توانایی تمایز آن‌ها به سه رده چربی، استخوان و غضروف بررسی و تأیید شده بود، استفاده شد (۲۳). پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *Nrf2* (pcDNA3.1-Nrf2) و پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *HIF-1α* (pcDNA3.1-HIF-1α) نیز قبلاً با روش برش و اتصال آنزیمی تولید و با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی DNA تأیید شده بودند و باکتری اشرشیاکولی نوع DH5α دارای این پلاسمیدهای نوترکیب به صورت ذخیره (استوک) در مرکز تحقیقات موجود بود (۱۸، ۱۷).

آماده‌سازی و استخراج پلاسمیدهای نوترکیب:

باکتری‌های حاوی pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α از استوک خارج شده و در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک اختصاصی کانامایسین یا آمپی‌سیلین (شرکت اینویترورژن آمریکا) به صورت جداگانه به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک‌ردار (شرکت ایوی من استرالیا) کشت داده شدند. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت رُوش آلمان) و بر طبق روش کار کیت استخراج و کمیت آن‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ (شرکت‌های تک آمریکا) اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف از دمای ۸۰- یا تانک ازت خارج شده، پس از یخ‌زدایی با محیط DMEM-Low glucose حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین (هر سه ماده از شرکت اینویترورژن آمریکا) مخلوط شده و به ظروف کشت مناسب و استریل منتقل و در انکوباتور استاندارد کشت سلولی، کشت داده شدند. خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (شرکت نیکون ژاپن) بررسی شد. سپس تعداد ۳۰۰ هزار عدد از این سلول‌ها در چاهک‌های پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، از آن‌ها جهت انجام مراحل ترانسفکشن (ورود DNA پلاسمیدی به داخل سلول) استفاده شد.

ترانسفکشن پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

در این مطالعه از ماده لیپوزومی فیوژن اچ دی (شرکت رُوش آلمان) جهت وارد کردن pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف استفاده شد. نسبت‌های مناسب از فیوژن اچ دی با pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α به طور جداگانه و هم‌زمان با هر دوی آن‌ها مخلوط شده و به محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در چاهک‌های مختلف پلیت‌های ۶ خانه‌ای اضافه شد. پس از گذشت ۴-۵ ساعت، محیط کشت سلول‌ها تعویض شد.

تأیید بیان ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1α* به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR):

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، بیان *Nrf2* در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2 (که MSC-Nrf2 نامیده شدند)، بیان *HIF-1α* در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α (یا MSC-HIF-1α) و بیان هم‌زمان هر دو ژن در سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده (یا MSC-Nrf2-HIF) به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس بررسی شد. RNA گروه‌های سلولی مختلف با استفاده از

ایجاد شرایط گوناگون استرس سلولی بر گروه‌های سلولی مختلف:

به منظور بررسی تأثیر افزایش بیان *Nrf2* و *HIF-1α* به طور جداگانه و هم زمان و هم چنین سکرتوم به دست آمده از آن‌ها بر میزان بقای سلول‌ها، گروه‌های سلولی مختلف ترانسفکت شده و یا کشت داده شده، در مجاورت سکرتوم با شرایط استرس کمبود اکسیژن، فقر سرمی و استرس اکسیداتیو ناشی از اثر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مواجه شدند.

۱۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به طور جداگانه و سه تایی کشت داده شدند.

جهت اعمال استرس کمبود اکسیژن، سلول‌ها به مدت زمان‌های مختلف ۰، ۱/۵، ۳، ۶ و ۲۴ ساعت در انکوباتور مخصوص با اکسیژن پایین (هیپوکسی) و در غلظت ۱٪ اکسیژن و ۵٪ دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. جهت ایجاد استرس فقر سرمی، محیط کشت سلول‌ها خارج و به آن‌ها محیط کشت فاقد FBS اضافه و پلیت‌ها به مدت زمان‌های ۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلولی نگهداری شدند. به منظور ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سلول‌ها با غلظت‌های ۵-۰ میلی‌مولار H_2O_2 به مدت یک ساعت مواجه شدند.

تعیین درصد سلول‌های زنده و میزان بقای سلول‌ها پس از اعمال استرس‌های سلولی مختلف:

پس از ایجاد شرایط استرس، درصد سلول‌های زنده گروه‌های سلولی مختلف با روش تریپان‌بلو تخمین زده شد. به منظور تایید بیشتر و کمی سازی نتایج، میزان بقای سلول‌ها با روش WST-1 (Water Soluble Tetrazolium Salt، شرکت سیگمای آمریکا) نیز بررسی شد. WST-1 به نسبت ۱:۱۰ به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۳-۴ ساعت، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا خوان (شرکت مولتی اسکن بلژیک) خوانش و میزان بقای سلولی محاسبه گردید.

ماده ترایزول (شرکت اینویترژن آمریکا) استخراج شد. cDNA آن‌ها با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت بیونیر آمریکا) و بر اساس روش کار توصیفی کیت ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی دو ژن مورد نظر با استفاده از سایت NCBI طراحی شده، واکنش‌های PCR با استفاده از دوره‌های دمایی و زمانی مناسب ایجاد شده توسط دستگاه PCR (شرکت تاکارای ژاپن) انجام شد. محصولات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. باندهای ایجاد شده با دستگاه ترانس لومیناتور (شرکت تتروی انگلیس) مشاهده و تفسیر گردید.

جمع‌آوری و تغلیظ سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با هر دو پلاسמיד نوترکیب ذکر شده و به روش توصیف شده ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد محیط کشت آن‌ها با محیط کشت فاقد سرم تعویض شد و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لوله‌های دارای فیلتر ۵ کیلو دالتون (شرکت سارتنوریوس آلمان) و سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه تغلیظ شد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در مجاورت سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده:

۱۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی بندناف به طور سه تایی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای و در محیط DMEM-LG دارای ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. بعد از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شده و درصد‌های مختلف از سکرتوم سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با *Nrf2* و *HIF-1α* (MSC-HIF-Nrf2) به آن‌ها اضافه شد و به مدت یک شب در انکوباتور استاندارد کشت سلولی نگهداری شدند.

این گروه HIF-Nrf2-S- نامیده شدند. هم زمان گروه کنترل (S-MSC) نیز با سکرتوم به دست آمده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی به مدت یک شب مجاور شدند.

بررسی‌های آماری:

کلیه آزمایش‌ها به صورت سه تا پنج تایی ارزیابی شدند و نتایج به دست آمده و میزان بقای سلولی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (mean $\pm$ SD) مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های کمی با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS version ۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند و دامنه طبیعی سازی و اختلاف‌های معنادار با ارزش p کمتر از ۰/۰۵ گزارش شد.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف ظاهری دوکی شکل دارند:

پس از یخ‌زدایی و کشت سلول‌ها در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از نظر ریخت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های کشت داده شده از این نظر کاملاً مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده، ظاهری شبه فیبروبلاستی دارند و دوکی شکل هستند (شکل ۱).

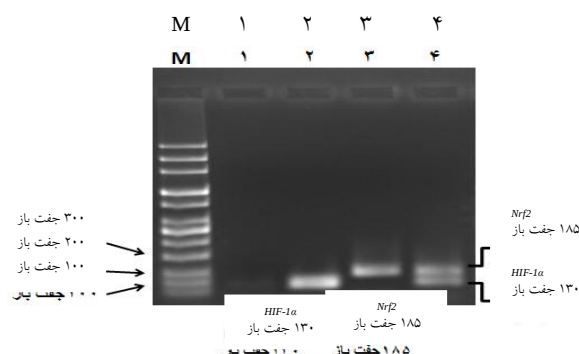


شکل ۱: خصوصیات ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف. سلول‌ها ظاهری دوکی و کشیده داشتند (بزرگ‌نمایی $\times 200$).

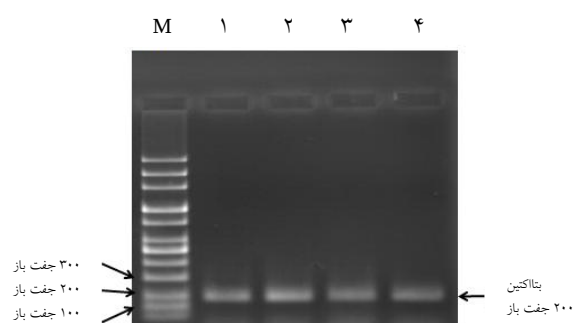
سلول‌های ترانسفکت شده، ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1 α* را بیان می‌کنند:

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها با pcDNA3.1-*Nrf2* و pcDNA3.1-*HIF-1 α* به طور جداگانه و هم زمان، بیان این ژن‌ها به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس در سلول‌ها بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده

می‌شود، سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-*Nrf2* که MSC-*Nrf2* نامیده شدند، ژن *Nrf2* را بیان کردند. با توجه به شکل ۲، بیان *HIF-1 α* در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-*HIF-1 α* نیز تایید شد.



شکل ۲: بررسی بیان ژن *HIF-1 α* و *Nrf2* در گروه‌های سلولی مختلف با روش PCR ترانس کریپتاز معکوس. M مارکر DNA، ردیف ۱: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד خالی، ردیف ۲: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד pcDNA3.1-*HIF-1 α* ، ردیف ۳: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד pcDNA3.1-*Nrf2* و ردیف ۴: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با پلاسמידهای pcDNA3.1-*HIF-1 α* و pcDNA3.1-*Nrf2*. سلول‌های بنیادی مزانشیمی هم زمان ترانسفکت شده، *HIF-1 α* و *Nrf2* را بیان کردند.



شکل ۳: بررسی بیان بتا‌اکتین در گروه‌های سلولی مختلف با روش PCR ترانس کریپتاز معکوس (کنترل داخلی). M مارکر DNA، ردیف ۱: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד خالی، ردیف ۲: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד pcDNA3.1-*HIF-1 α* ، ردیف ۳: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד pcDNA3.1-*Nrf2* و ردیف ۴: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با پلاسמידهای pcDNA3.1-*HIF-1 α* و pcDNA3.1-*Nrf2*. تمامی گروه‌ها ژن بتا‌اکتین را بیان کردند.

وجود دو باند با اندازه‌های مورد انتظار مؤید بیان هم‌زمان هر دو ژن در سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده (یا سلول‌های MSC-Nrf2-HIF) بود (شکل ۲). جهت کنترل مراحل آزمایش، بیان ژن بتا‌کتین نیز مورد بررسی قرار گرفت و همه گروه‌های مورد بررسی این ژن را به میزان مناسب بیان کردند (شکل ۳).

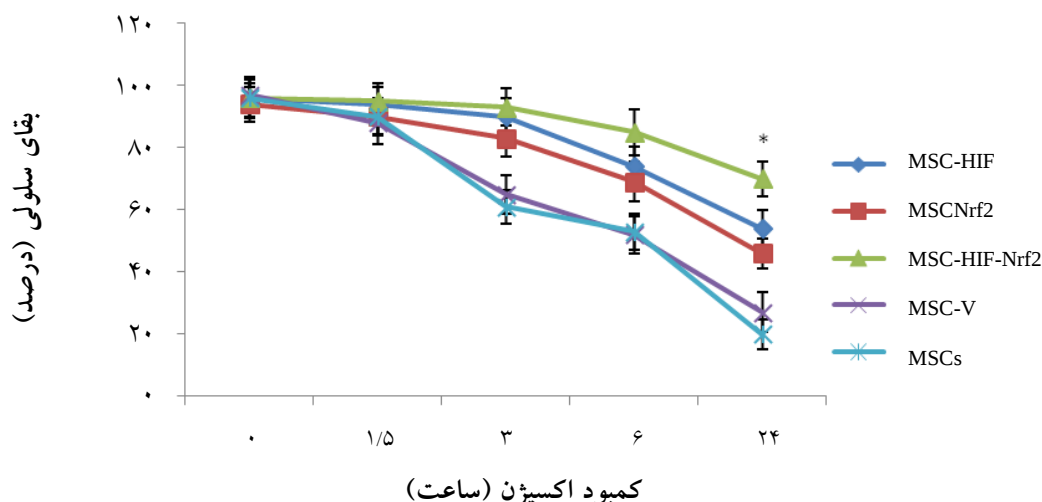
سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده در برابر استرس کمبود اکسیژن مقاوم‌تر هستند.

گروه‌های سلولی مختلف ترانسفکت شده در غلظت اکسیژن ۱٪ تنظیم شده با انکوباتور مخصوص هیپوکسی در مدت زمان‌های مختلف کشت داده شدند و میزان بقای آن‌ها با روش WST-1 ارزیابی شد (نمودار ۱). طبق نمودار ارائه شده، میزان بقای سلولی گروه‌های ترانسفکت شده با ژن‌های ذکر شده بیش از گروه کنترل (سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی) بود. و در بین گروه‌های ترانسفکت شده نیز، میزان بقای

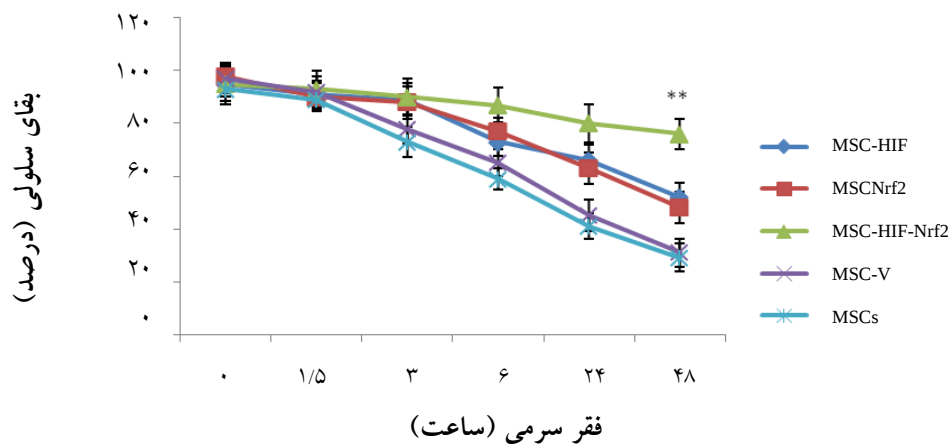
سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده بیش از سلول‌هایی بود که فقط یکی از ژن‌های *Nrf2* یا *HIF-1α* در آن‌ها افزایش بیان داده شده بود. به طوری که این اختلاف در زمان ۲۴ ساعت مواجهه با کمبود اکسیژن معنادار بود ($p < 0.05$) (نمودار ۱).

میزان بقای سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده پس از استرس فقر سرمی بیش از سایر گروه‌ها است:

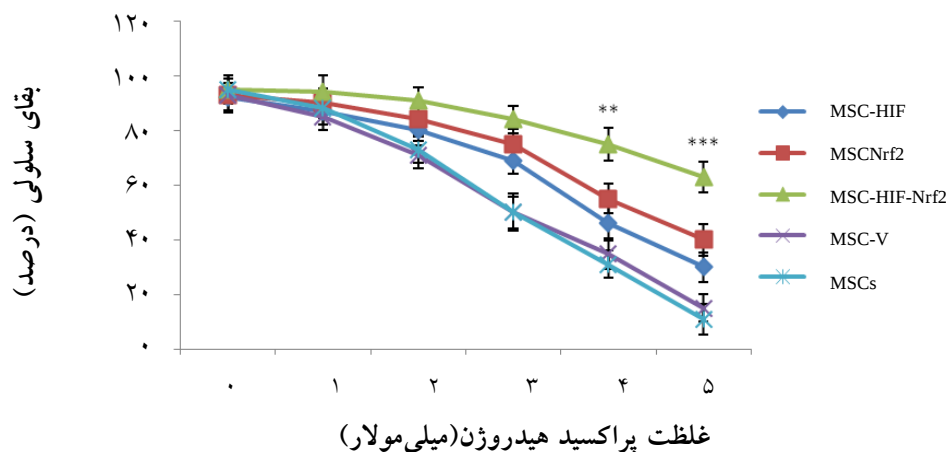
پس از کشت سلول‌ها در محیط فاقد سرم در زمان‌های مختلف، میزان بقای آن‌ها با روش WST-1 سنجیده شد (نمودار ۲). همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده در برابر استرس فقر سرمی مقاومت بیشتری داشته و میزان بقای آن‌ها با میزان بقای سلول‌هایی که فقط با یکی از پلاسمیدها ترانسفکت شده بودند در زمان ۴۸ ساعت، اختلاف معنادار داشت ($p < 0.01$) (نمودار ۲).



نمودار ۱: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف پس از مواجهه با استرس کمبود اکسیژن در زمان‌های متفاوت (۰، ۱/۵، ۳، ۶ و ۲۴ ساعت)، با روش WST-1: MSC-Nrf2. سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF، سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α، MSC-HIF-Nrf2، سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α و pcDNA3.1-Nrf2، MSC-V، سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی و MSCs: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی ($p < 0.05$). گروه هم‌زمان ترانسفکت شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بود.



نمودار ۲: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف پس از مواجهه با استرس فقر سرمی در زمان‌های متفاوت (۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، با روش WST-1. MSC-Nrf2: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1 α ، MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1 α و pcDNA3.1-Nrf2، MSC-V: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی و MSCs: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی ($p < 0.01$). گروه هم زمان ترانسفکت شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بود.



نمودار ۳: میزان بقای سلولی گروه‌های سلولی مختلف پس از مواجهه یک ساعته با غلظت‌های ۰-۵ میلی مولار H_2O_2 با روش WST-1. MSC-Nrf2: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1 α ، MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1 α و pcDNA3.1-Nrf2، MSC-V: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی و MSCs: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی ($p < 0.01$ و $p < 0.001$). گروه هم زمان ترانسفکت شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بود.

افزایش بیان هم زمان Nrf2 و HIF-1 α اثر حفاظتی بیشتری بر سلول‌ها در شرایط استرس اکسیداتیو دارد:

میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف تحت مطالعه پس از یک ساعت مواجهه با غلظت ۰-۵ میلی مولار

پراکسید هیدروژن بررسی شد (نمودار ۳). نتایج WST-1 که در نمودار ۳ ارائه شده است، نشان داد که افزایش بیان هم زمان این دو ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این سلول‌ها را در برابر استرس ناشی از H_2O_2 محافظت کرده

گروه کنترل با ارزش p کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار بود (نمودار ۴).

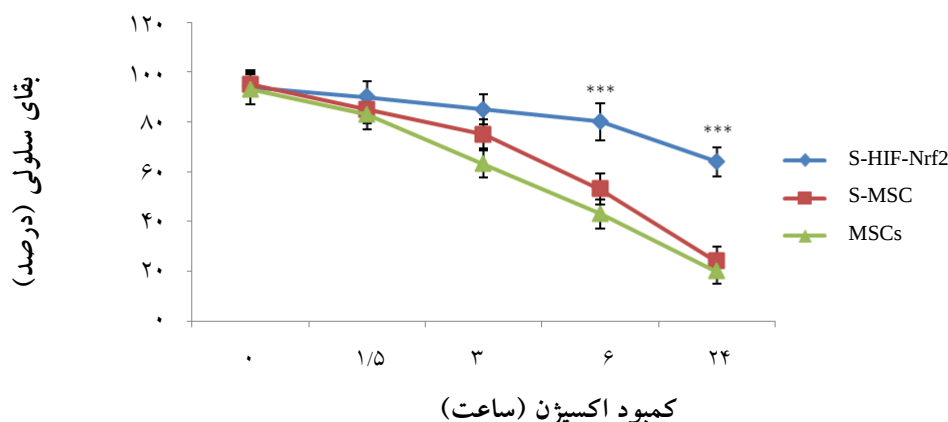
بر طبق اطلاعات ارائه شده در نمودار ۵، گروه سلولی S-HIF-Nrf2 که با سکرئوم سلول‌هایی که بیان هر دو ژن در آن‌ها افزایش بیان یافته بود مجاور شده‌اند، بیشترین مقاومت را در برابر استرس فقر سرمی داشته و میزان بقای آن‌ها نسبت به میزان بقای گروه سلولی S-MSC (سلول‌های مواجه شده با سکرئوم سلولی بدون دست‌ورزی ژنتیکی) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته، اختلاف معناداری را نشان داد (نمودار ۵). ارزش P محاسبه شده کمتر از ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ بود. با توجه به نمودار ۶، میزان بقای سلول‌های مواجه شده با سکرئوم سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده پس از اعمال استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن در غلظت‌های ۲ تا ۵ میلی مولار با گروه کنترل اختلاف معنادار داشت ($p < ۰/۰۰۱$ و $p < ۰/۰۱$).

جدول ۱ میانگین و انحراف معیار درصد بقای سلولی پنج گروه اصلی تحت مطالعه را پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو، کمبود اکسیژن و فقر سرمی ارائه می‌کند. با نگاهی به نتایج بدست آمده می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت سکرئوم ترشحی آن‌ها نیز باعث افزایش مقاومت این سلول‌ها در مقایسه با کنترل مناسب می‌شود.

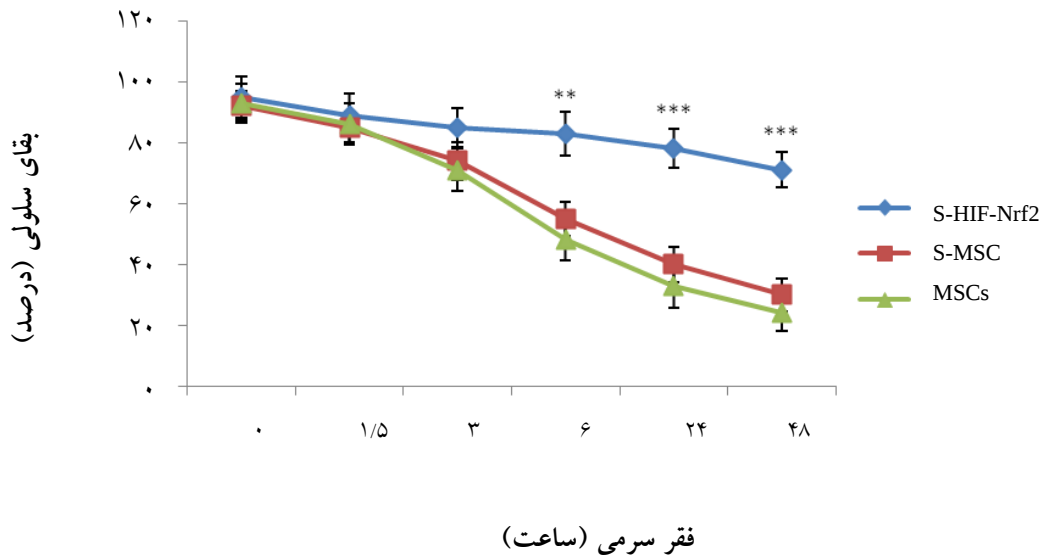
به طوری که اختلاف میزان بقای گروه سلولی هم‌زمان ترانسفکت شده با دیگر گروه‌ها در غلظت‌های ۴ و ۵ میلی مولار H_2O_2 با ارزش p کمتر از ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ معنادار بود (نمودار ۳).

سکرئوم سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده، اثرات محافظت سلولی مناسبی در شرایط استرس سلولی مختلف دارد:

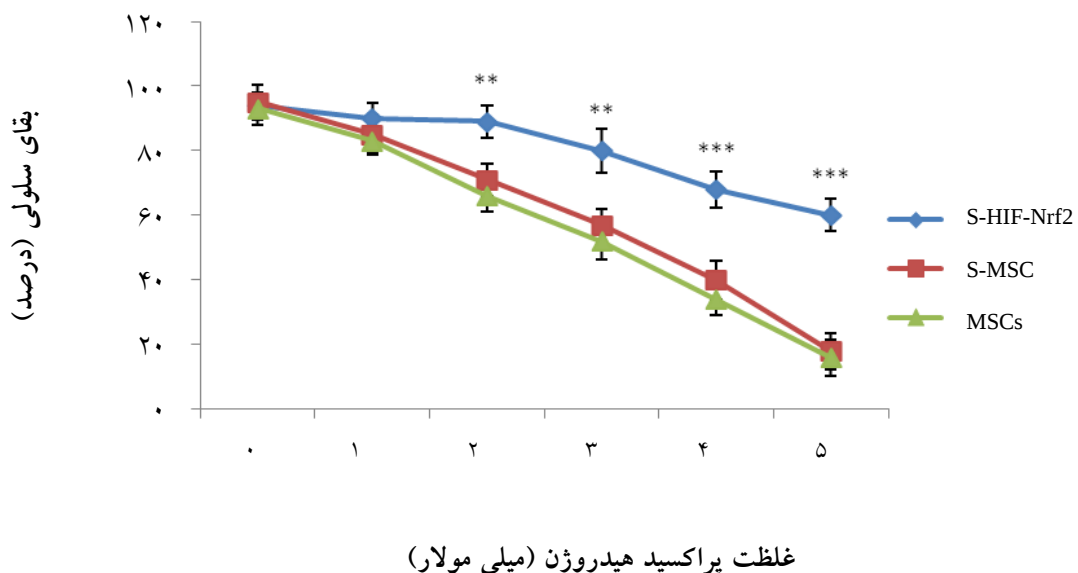
پس از جمع‌آوری و تغلیظ سکرئوم سلول‌های دست‌ورزی شده با دو ژن و سکرئوم سلول‌های بدون دست‌ورزی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش ذکر شده با این سکرئوم‌ها مواجه شده و سپس تحت شرایط استرس سلولی مشابه، کشت داده شدند. در نهایت میزان بقای سلولی آن‌ها با روش WST-1 سنجیده شد (نمودارهای ۴ تا ۶). با توجه به نمودار ۴، سلول‌های مجاور شده با سکرئوم سلول‌های هم‌زمان ترانسفکت شده با Nrf2 و HIF-1 α که S-HIF-Nrf2 نامیده شده بودند، نسبت به گروه کنترل خود یا سلول‌های مجاور شده با سکرئوم به دست آمده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی (S-MSC) مقاومت بیشتری در برابر استرس کمبود اکسیژن از خود نشان دادند. اختلاف میزان بقای آن‌ها پس از ۶ و ۲۴ ساعت مواجهه با کمبود اکسیژن با میزان بقای



نمودار ۴: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف مجاور شده با سکرئوم پس از مواجهه با استرس کمبود اکسیژن در زمان‌های مختلف (۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با روش WST-1. سلول‌های مجاور شده با سکرئوم S-HIF-Nrf2: سلول‌های مجاور شده با سکرئوم MSC-HIF-Nrf2، S-MSC: سلول‌های مجاور شده با سکرئوم سلولی بدون دست‌ورزی ژنتیکی و MSCs: سلول‌های بدون مجاورت با سکرئوم ($p < ۰/۰۰۱$). سلول‌های مجاور شده با سکرئوم دست‌ورزی شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بودند.



نمودار ۵: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف مجاور شده با سکریتوم پس از مواجهه با استرس فقر سرمی در زمان‌های مختلف (۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت). با روش WST-1. S-HIF-Nrf2: سلول‌های مجاور شده با سکریتوم MSC-HIF-Nrf2، S-MSC: سلول‌های مجاور شده با سکریتوم بدون سکریتوم سلولی بدون دست‌ورزی ژنتیکی و MSCs: سلول‌ها بدون مجاورت با سکریتوم ($p < 0/001$ و $p < 0/01$). سلول‌های مجاور شده با سکریتوم دست‌ورزی شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بودند.



نمودار ۶: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف مجاور شده با سکریتوم پس از مواجهه با غلظت‌های ۰-۵ میلی مولار H_2O_2 ، با روش WST-1. S-HIF-Nrf2: سلول‌های مجاور شده با سکریتوم MSC-HIF-Nrf2، S-MSC: سلول‌های مجاور شده با سکریتوم بدون دست‌ورزی ژنتیکی و MSCs: سلول‌ها بدون مجاورت با سکریتوم ($p < 0/001$ و $p < 0/01$). سلول‌های مجاور شده با سکریتوم دست‌ورزی شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بودند.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار درصد بقای سلولی در گروه‌های مختلف پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو، کمبود اکسیژن و فقر سرمی با روش WST-1. MSC-Nrf2: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1 α ، MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1 α و pcDNA3.1-Nrf2، S-HIF-Nrf2: سلول‌های مجاور شده با سکر توم MSC و MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های بنیادی مزانشیمی کنترل.

گروه سلولی	استرس اکسیداتیو	کمبود اکسیژن	فقر سرمی
MSC-Nrf2	$0.72/8 \pm 0.5/8$	$0.76/8 \pm 0.4/3$	$0.77/3 \pm 0.5/1$
MSC-HIF	$0.67/3 \pm 0.6$	$0.81/6 \pm 0.6/1$	$0.76/4 \pm 0.4/5$
MSC-HIF-Nrf2	$0.83/6 \pm 0.5/2$	$0.87/8 \pm 0.4/5$	$0.85/3 \pm 0.6/2$
S-HIF-Nrf2	$0.80 \pm 0.4/4$	$0.82/6 \pm 0.5/8$	$0.72/8 \pm 0.5$
MSC	$0.58/2 \pm 0.4/5$	0.64 ± 0.4	$0.72/8 \pm 0.5/8$

بحث

به دلیل خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی، استفاده از آن‌ها در مطالعه‌های بالینی و به خصوص پزشکی ترمیمی، مورد توجه قرار گرفته است (۵-۲). اما مهم‌ترین چالش بر سر راه استفاده از آن‌ها، بقای کم این سلول‌ها پس از تزریق است (۱۰). بنابراین مجهز کردن آن‌ها به ابزارهایی که باعث افزایش مقاومت سلولی می‌شوند، کمک کننده است. به نظر می‌رسد استفاده از اثرات ترشحی و محافظتی خود سلول‌های بنیادی مزانشیمی، راه‌کار مناسبی جهت رسیدن به این هدف باشد. در مطالعه اخیر جهت افزایش بیان دو ژن *HIF-1 α* و *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، از حامل پلاسمیدی و ماده فیوژن اچ دی استفاده شد. استفاده از حامل پلاسمیدی (به جای حامل ویروسی) نگرانی از واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی و یا جهش‌زایی را به همراه ندارد (۲۴). ماده لیپوزومی فیوژن اچ دی باعث افزایش درصد انتقال DNA به داخل سلول شده و بر روی تکثیر و تمایز سلولی اثر منفی ندارد (۲۵).

HIF-1 α و *Nrf2* از عوامل بسیار مهم در فرآیندهای حفاظت سلولی هستند که افزایش بیان آن‌ها اثر مضاعفی بر مقاومت سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف دارد (۱۹، ۲۰). سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با نمونه‌گیری آسان جداسازی می‌شوند و دارای قدرت تکثیر و خاصیت تعدیل ایمنی بیشتری هستند (۲۶). در این مطالعه میزان بقای سلولی پس از اعمال سه استرس کمبود

اکسیژن، فقر سرمی و استرس اکسیداتیو که باعث بیشترین مرگ سلول‌ها در شرایط آزمایشگاه و بالین می‌شوند، با روش WST-1 بررسی و افزایش داده شد (۱۱). WST-1 روشی آسان و دقیق با سمیت سلولی کمتر است (۲۷). نتایج WST-1 مبین افزایش میزان بقای سلولی در سلول‌های دست‌ورزی شده پس از اعمال شرایط استرس بود.

کیانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان *HIF-1 α* را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از حامل پلاسمیدی افزایش دادند و سپس سلول‌ها را با استرس‌های اکسیداتیو، فقر سرمی و کمبود اکسیژن مواجه کردند و این طور نتیجه گرفتند که با افزایش بیان این ژن، میزان بقای سلول‌ها در مواجهه با استرس‌های سلولی افزایش می‌یابد (۱۷). محمدزاده (۲۰۱۲) طی مطالعه‌ای نشان داد که افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث اثر حفاظتی قابل قبولی در برابر استرس‌های سلولی مشابه می‌شود. وی از حامل ویروسی در مطالعه خود استفاده کرده بود (۱۸). نتایج آن‌ها با مطالعه اخیر هم خوانی داشت. از طرفی در مطالعه اخیر افزایش بیان هم زمان *HIF-1 α* و *Nrf2* باعث هم‌افزایی اثرات محافظتی دو ژن شده و منجر به افزایش مقاومت سلولی در شرایط استرسی سخت‌تر شد.

در قسمتی از این مطالعه مجاور کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سکر توم سلول‌های دست‌ورزی شده نیز باعث افزایش مقاومت آن‌ها شد. استفاده از سکر توم و اثرات ترشحی سلول‌ها، نگرانی‌های ناشی از دست‌ورزی ژنتیکی

سلول‌ها و عدم امکان استفاده از آن در بالین را به همراه ندارد.

لی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با جمع‌آوری سکرئوم سلول‌های بنیادی دست ورزی شده با ژن GATA-4 و اعمال استرس کمبود اکسیژن نشان دادند که سلول‌های سیاهرگی مجاور شده با این سکرئوم، پس از پیوند دارای توان تمایزی و بقای بیشتری هستند (۲۸).

جنسکی و گروه وی (۲۰۰۶) چنین گزارش کردند که جمع‌آوری سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی که ژن Akt در آن‌ها افزایش بیان یافته، کشت سلول‌های قلبی در مجاورت این سکرئوم و اعمال شرایط کمبود اکسیژن باعث تسریع در فرآیند ترمیم عضله قلبی آسیب دیده می‌شود (۲۹). در این دو مطالعه از حامل‌های ویروسی جهت دست‌ورزی سلول‌ها استفاده شده بود. از طرفی میزان بقای سلول‌ها تنها پس از شرایط کمبود اکسیژن مورد بررسی قرار گرفته بود.

زانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با مجاورت محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های عضلانی قلب که در شرایط کمبود اکسیژن تیمار شده بودند، نشان دادند که اثر ترشحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی منجر به محافظت از سلول‌های عضله قلبی در برابر آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو نیز می‌گردد (۳۰). در این مطالعه نیز همانند مطالعه‌ی اخیر، سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بقای سلولی پس از مواجهه سلول‌ها با H_2O_2 شد.

به طور خلاصه در این تحقیق میزان بقا و مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر استرس‌های سلولی مختلف پس از افزایش بیان دو ژن مهم در فرآیندهای محافظت سلولی (*Nrf2* و *HIF-1α*) و هم چنین کشت این سلول‌ها در مجاورت سکرئوم به دست آمده از سلول‌های دست‌ورزی شده، افزایش داده شد.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان دو ژن *Nrf2* و *HIF-1α* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اثر مضاعفی بر میزان بقای آن‌ها دارد. سکرئوم سلول‌های دست‌ورزی شده با این دو ژن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در برابر استرس‌های کمبود اکسیژن، فقر سرمی و استرس اکسیداتیو محافظت کرده و نگرانی‌های ناشی از دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها و عدم امکان استفاده از آن در بالین را نیز از بین می‌برد. به نظر می‌رسد استفاده از سکرئوم، راه‌کاری مناسب و عملی در افزایش بقای سلول‌ها و امکان کاربرد بیشتر و مفیدتر آن‌ها در کارآزمایی‌های بالینی باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجویی خانم فاطمه سلطانی در مقطع کارشناسی ارشد و مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال ایران می‌باشد که از محل بودجه‌های پژوهشی این مرکز تامین اعتبار گردیده است.

References :

- 1- Friedenstien AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplantation 1974; 17(4): 331-40.
- 2- Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, *et al*. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovas Res 2005; 66(3): 543-51.
- 3- Li X, Zhang Y, Qi G. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells. Cytotechnology 2013; 65(3): 323-34.
- 4- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315-7.
- 5- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98(8): 2396-402.
- 6- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem

- cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815-22.
- 7- Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81(10): 1390-7.
 - 8- Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistran R, Müller S, Seifried E, *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006; 108(12): 3938-44.
 - 9- Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003; 101(8): 2999-3001.
 - 10- Lee KA, Shim W, Paik MJ, Lee SC, Shin JY, Ahn YH, *et al.* Analysis of changes in the viability and gene expression profiles of human mesenchymal stromal cells over time. *Cytotherapy* 2009; 11(6): 688-97.
 - 11- Wang JA, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, *et al.* Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29(1): 74-82.
 - 12- Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 567-81.
 - 13- Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, *et al.* Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thor Cardiovas Surg* 2008; 135(4): 799-808.
 - 14- Lu H, Li Y, Sheng Z, WANG Y. Preconditioning of stem cells for the treatment of myocardial infarction. *Chinese Med J* 2012; 125(2): 378-84.
 - 15- Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, *et al.* Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2118-27.
 - 16- Vanella L, Sodhi K, Kim DH, Puri N, Maheshwari M, Hinds TD, *et al.* Increased heme-oxygenase 1 expression in mesenchymal stem cell-derived adipocytes decreases differentiation and lipid accumulation via upregulation of the canonical Wnt signaling cascade. *Gene expre* 2013; 51(6): 35-41.
 - 17- Kiani AK, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. *HIF-1α* confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 2013; 44(3): 185-93.
 - 18- Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirzadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, *et al.* Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones* 2012; 17(5): 553-65.
 - 19- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89-116.
 - 20- Adams J, Difazio L, Rolandelli R, Lujan J, Haskó G, Csoka B, *et al.* *HIF-1*: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung* 2009; 96(1): 19-28.
 - 21- Kilroy EG, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, *et al.* Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007; 212(3): 702-7.
 - 22- Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5(2): 103-10.
 - 23- Amiri F, Halabian R, Salimian M, Shokrgozar MA, Soleimani M, Jahanian-Najafabadi A, *et al.* Induction of multipotency in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultivated under suspension conditions. *Cell Stress Chaperones* 2014; 19(5): 657-66.
 - 24- Phillips AJ. The challenge of gene therapy and DNA delivery. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(9): 1169-74.
 - 25- Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Güllkan H, Böcker W, *et al.* Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* 2005; 7(6): 718-28.
 - 26- Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, Ta M. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells Cloning* 2011; 4: 39-50.
 - 27- Kwang M K, Sang BL, Lee SH, Yong KL, Kyoung NK. Comparison of validity between WST-1 and MTT test in bioceramic materials. *Key Eng Mats* 2005; 284-286: 585-8.
 - 28- Li H, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, *et al.* Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(6): 1772-81.
 - 29- Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, *et al.* Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20(6): 661-9.
 - 30- Xiang MX, He AN, Wang JA, Gui C. Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10(8): 619-24.

Original Article

Cell survival evaluation of mesenchymal stem cells cultivated in the presense of secretome of *HIF-1 α /Nrf2*-engineered-MSc

Soltani F.¹, Amiri F.¹, Kheirandish M.¹, Mohammadipour M.¹, Jalili M.², Habibi Roudkenar M.¹, Jalili M.A.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Karaj Branch of Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Background and Objectives

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are the ideal cell source for transplantation. But different stresses during MSCs *in vitro* expansion lead to decreased survival rate after transplantation. Therefore, applying practical strategies to enhance their viability in stressful microenvironment is quite necessary. This study aimed to survey effects of *HIF-1 α -Nrf2*-engineered-MSCs secretome on MSCs survival under different stress conditions.

Materials and Methods

Recombinant pcDNA3.1-*Nrf2* and pcDNA3.1-*HIF-1 α* were transfected and co-transfected into umbilical cord MSCs (UC-MSCs) using FUGENE HD transfection reagent. After 72 hrs, expression of *Nrf2* and *HIF-1 α* were verified by RT-PCR. Different cell groups were exposed to hypoxic, serum deprived and oxidative stress conditions. The *HIF-1 α -Nrf2*-engineered-MSCs secretome was harvested and concentrated. Then, UC-MSCs were cultured in presence of this secretome and their viability was assayed using trypan blue exclusion dye and WST-1 flowing by induction of the same stress conditions.

Results

HIF-1 α -Nrf2-engineered-MSCs expressed *Nrf2* and *HIF-1 α* . *HIF-1 α -Nrf2*-engineered-MSCs indicated a higher survival rate ($84.5 \pm 5.5\%$) compared with the control group ($55.3 \pm 4\%$). Moreover, the survival rate of UC-MSCs cultured with *HIF-1 α -Nrf2*-engineered-MSCs secretome was $81.6 \pm 6\%$ and it was $57.9 \pm 4.3\%$ for the control group under the same stress conditions.

Conclusions

HIF-1 α -Nrf2-engineered-MSCs secretome protects MSCs against oxidative, serum deprived and hypoxic stress conditions.

Key words: Conditioned Medium, Mesenchymal Stem Cells, Cell Survival

Received: 28 Sep 2014

Accepted: 23 Jun 2015

Correspondence: Jalili MA., PhD of Medicinal Chemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052155; Fax: (+9821) 88601599

E-mail: m.jalili@ibto.ir