

ارزیابی اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده با سکرئوم حاصل از سلول‌های بنیادی دست‌ورزی شده با *Nrf2* بر روی آسیب حاد کلیوی در موش صحرایی

فاطمه ژاله^۱، فاطمه امیری^۲، مژگان دهقان هراتی^۳، مهریار حبیبی رودکنار^۴، محمد علی جلیلی^۵

چکیده

سابقه و هدف

کاهش شدید بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند، از چالش‌های اساسی استفاده از این سلول‌ها است. در این مطالعه با هدف افزایش بقای این سلول‌ها پس از پیوند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی نشده تحت تیمار با سکرئوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* قرار گرفتند. سپس اثرات درمانی این سلول‌ها در مدل حیوانی آسیب حاد کلیوی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1-Nrf2* به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ترانسفکت شد و سکرئوم سلول‌ها جمع‌آوری گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سکرئوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* کشت داده شدند. سلول‌های مجاور شده با سکرئوم، به موش‌های صحرایی (گروه ۱۰ تایی) دچار آسیب حاد کلیوی تزریق شد و اثر درمانی این سلول‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

۱۴ روز پس از درمان، کاهش BUN در گروهی که تزریق سلول‌های کشت داده شده در سکرئوم داشتند ($48 \pm 3/5$ mg/dL) نسبت به گروهی که سلول‌های طبیعی دریافت کرده بودند ($100 \pm 9/9$ mg/dL) تفاوت معناداری داشت ($p < 0/001$). تعداد کست ($0/26$) مشاهده شده در مقاطع بافتی این گروه نیز کمتر از گروه دریافت‌کننده سلول‌های طبیعی ($0/51$) بود.

نتیجه‌گیری

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سکرئوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2*، اثرات ترمیمی این سلول‌ها را در بهبود آسیب حاد کلیوی افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آسیب حاد کلیوی، کاندیشن مدیوم

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۴

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- کارشناسی ارشد زیست فن‌آوری پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- PhD زیست فن‌آوری پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۵- مؤلف مسئول: PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی:

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells) گروهی از سلول‌های کلونی‌زا و چند توان هستند که می‌توانند به رده‌های مختلف سلولی از جمله استخوان، چربی، غضروف و سلول‌های عضله قلبی و اسکلتی تمایز یابند (۱-۳). این سلول‌ها در انجام روش سلول درمانی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارند (۴-۶).

یکی از مشکلات عمده در استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کاهش بقای سلول‌ها به دنبال پیوند می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد یافتن راهکاری جهت افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند حائز اهمیت باشد (۷، ۸).

دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با عوامل محافظت‌کننده سلولی از راه‌کارهای مؤثر در جهت افزایش بقای آن‌ها است. از این عوامل محافظت‌کننده سلولی می‌توان (Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) Related Factor 2 [NF-E2-Related Factor 2] را نام برد. *Nrf2* نقش مهمی در حفاظت علیه استرس‌های اکسیداتیو، آسیب‌های سلولی ناشی از مواد شیمیایی، حفاظت از تشکیل سرطان و ترمیم زخم دارد (۹، ۱۰). تقویت ویژگی ضد آپوپتوز و ضد اکسیداتیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دنبال آلودگی با آدنو ویروس‌های محتوی ژن *Nrf2* می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های محافظت سلول‌های پیوندی در برابر مرگ سلولی به کار رود (۱۱).

اما دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها با هدف استفاده در درمان در مرحله بالینی مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی و سازمان‌های معتبری هم چون سازمان غذا و داروی آمریکا نیست.

مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های مزانشیمی، بسیاری از فاکتورهای رشد، سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را به محیط ترشح می‌کنند که این مواد فعال زیستی ترشح شده ضمن افزایش بقای این سلول‌ها می‌توانند باعث افزایش اثرات ترمیم بافتی آن‌ها شوند (۱۲-۱۵).

بیماری‌های کلیوی مانند آسیب حاد کلیوی (Acute kidney injury: AKI)، به عنوان یکی از مشکلات تهدیدکننده سلامت جامعه مطرح می‌باشند. در حالی که

روش‌های درمانی موجود (دیالیز و پیوند کلیه) تنها باعث افزایش طول عمر بیمار شده و علاوه بر هزینه‌های بالای درمان، موفقیت آن‌ها مستلزم مراقبت مستمر پزشکی می‌باشد (۱۶). بنابراین در این مطالعه به منظور مرتفع نمودن مشکل ممانعت استفاده از سلول‌های بنیادی دست‌ورزی شده در سطح بالینی و با هدف افزایش بقای این سلول‌ها پس از پیوند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی نشده تحت تیمار با سکرتم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* قرار گرفتند. پس از کشت این سلول‌ها در مجاورت سکرتم به منظور افزایش مقاومت سلولی در برابر شرایط نامناسب محیطی، این سلول‌ها به موش‌های صحرایی مدل آسیب حاد کلیوی تزریق شدند و اثرات درمانی آن‌ها در روزهای مختلف ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان موجود در ذخیره سلولی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و 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 (۱۱). پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *Nrf2* (pcDNA3.1-*Nrf2*) که با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی DNA تأیید شده بود، به صورت ذخیره (Stock) در باکتری اشرشیاکولی نوع DH5α در مرکز تحقیقات مذکور موجود بود (۱۱).

آماده‌سازی و استخراج پلاسمید نو ترکیب:

باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1-*Nrf2* از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج شد. به اندازه یک لوپ از این باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی یک درصد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار (شرکت ایوی من استرالیا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پلاسمیدها با استفاده از کیت اختصاصی استخراج پلاسمید (شرکت رُوش آلمان) و بر اساس روش کار توصیفی کیت، استخراج شدند. سپس غلظت پلاسمیدهای استخراج شده و کیفیت آن‌ها با

استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ (شرکت های تک آمریکا) ارزیابی شد.

آماده سازی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان:

سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از دمای ۸۰- درجه سانتی گراد یا تانک ازت خارج شده، پس از یخ زدایی با محیط کشت سلولی DMEM-Low glucose حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک استرپتومایسین و آمپی سیلین (هر سه ماده از شرکت اینویترژن آمریکا) مخلوط شدند. مخلوط حاصل به ظروف کشت مناسب و استریل منتقل و در انکوباتور استاندارد کشت سلولی کشت داده شدند. سپس تعداد ۲۰۰ هزار عدد از این سلول ها در هر چاهک پلیت ۶ خانه ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول ها به کف پلیت، از آن ها جهت انجام مراحل ترانسفکشن (ورود DNA پلاسمیدی به داخل سلول) استفاده شد.

ترانسفکشن پلاسمیدهای نو ترکیب به داخل سلول های بنیادی مزانشیمی:

در این مطالعه از ماده فیوژن اچ دی (شرکت رُوش آلمان) جهت وارد کردن pcDNA3.1-Nrf2 به درون سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان استفاده شد. نسبت های مناسب از فیوژن اچ دی با pcDNA3.1-Nrf2، (۴ به ۱، ۶ به ۲ و ۵ به ۱/۵) مخلوط شده و پس از گذشت ۰/۵ ساعت به محیط کشت سلول های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در چاهک های مختلف پلیت های ۶ خانه ای اضافه شد. پس از گذشت ۴-۵ ساعت، محیط کشت سلول ها با استفاده از محیط کشت سلولی DMEM-Low glucose حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک استرپتومایسین و آمپی سیلین تازه تعویض شد.

تأیید بیان ژن های Nrf2 به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR) و وسترن بلات:

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن بیان Nrf2 در سلول های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2 (که MSC-Nrf2 نامیده

شدند) به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس (Reverse transcriptase-PCR) و وسترن بلات بررسی شد. RNA سلول های MSC-Nrf2 و سلول های بنیادی مزانشیمی دست ورزی نشده (MSC) به عنوان گروه کنترل با استفاده از ماده ترایزول (شرکت اینویترژن آمریکا) و طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. cDNA آن ها با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت بیونیر آمریکا) و بر اساس روش کار توصیفی کیت ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی ژن Nrf2 با استفاده از سایت NCBI طراحی و بلاست شدند. توالی آغازگرهای طراحی شده بدین شرح بود: آغازگر جلو برنده: 5'GTT GGC AGA TCC ACT GGT TTC TG3 و آغازگر معکوس: 5' GCG ACG GAA AGA GTA TGA GCT GG 3'.

واکنش های PCR با استفاده از دوره های دمایی و زمانی مناسب ایجاد شده توسط دستگاه PCR (شرکت تاکارای ژاپن) و همانند مطالعه های قبلی انجام شد (۱۵، ۱۱). 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. هم چنین جهت تأیید بیان پروتئین Nrf2 در سطح پروتئین از روش وسترن بلات استفاده شد. بدین منظور ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، لیزات سلولی سلول های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب pcDNA3.1-Nrf2 با استفاده از بافر لیزکننده M (شرکت رُوش آلمان) تهیه شد. لیزات سلول های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت نشده نیز به عنوان گروه کنترل تهیه گردید. به منظور جدا کردن پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی، ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد (SDS-page). به دنبال الکتروفورز، نمونه ها به غشاء PVDF منتقل شده و با استفاده از آنتی بادی اولیه خرگوشی علیه پروتئین Nrf2 انسانی (شرکت ابکم انگلیس) و آنتی بادی ثانویه پلی کلونال بز بر علیه خرگوش متصل شده به آنزیم پراکسیداز (شرکت سل سیگنالینگ)، بیان پروتئین Nrf2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

جمع‌آوری و تغلیظ سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با پلاسمید نو ترکیب ذکر شده و به روش توصیف شده ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد محیط کشت آن‌ها با محیط کشت دارای ۱٪ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین فاقد سرم تعویض شد و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لوله‌های دارای فیلتر ۳ کیلودالتون (شرکت سارتوریوس آلمان) و سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه تغلیظ شد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مجاورت سکرتوم سلول‌های دست ورزی شده: تعداد ۲۰۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در پلیت ۶ خانه‌ای در محیط DMEM-LG دارای ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین کشت داده شدند. بعد از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت پلیت‌ها تخلیه شده و سلول‌ها در محیط کشت تازه حاوی ۷٪ سکرتوم حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده با *Nrf2* (۷۰ میکرولیتر سکرتوم به اضافه ۹۳۰ میکرولیتر محیط کشت ذکر شده) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور استاندارد کشت سلولی نگهداری شدند. این گروه، S-Nrf2 نامیده شدند. هم‌زمان گروه کنترل (MSC) که شامل سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی و تیمار سکرتومی بودند نیز کشت داده شدند.

بهینه‌سازی القای آسیب حاد کلیوی و ارزیابی آسیب با دو روش بیوشیمیایی و پاتولوژی:

به منظور تعیین دوز بهینه برای القای آسیب حاد کلیوی (AKI)، موش‌های صحرایی نر از گونه رتوس نروژیکوس با سن ۸-۱۲ هفته و وزن ۱۸۰-۲۵۰ گرم به مدت ۱۸ ساعت در شرایط بی‌آبی قرار داده شدند در حالی که مواد غذایی طبق دستورالعمل استاندارد در اختیار حیوان قرار داده شد. مقادیر مختلف از محلول گلیسرول (۵، ۸،

۱۰، ۱۳ و ۱۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن حیوان) به صورت درون ماهیچه‌ای به حیوان تزریق شد. سپس در بازه‌های زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، میزان آسیب ایجاد شده با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بهترین مقدار و مناسب‌ترین زمان برای ایجاد آسیب تعیین شود.

گروه‌بندی موش‌های صحرایی و بررسی اثر درمانی سلول‌های بنیادی کشت داده شده در سکرتوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* بر بهبود آسیب حاد کلیوی:

پس از تزریق درون ماهیچه‌ای گلیسرول و القای موفقیت‌آمیز آسیب حاد کلیوی، موش‌های صحرایی به ۴ گروه اصلی ۱۰ تایی تقسیم شدند و سلول‌های مورد نظر به طور سیستمیک با استفاده از سرنگ انسولین به سیاهرگ دمی حیوان تزریق شدند. خصوصیات ۴ گروه تحت مطالعه بدین شرح بود:

گروه ۱: هیچ تزریقی صورت نگرفت (Cont.)

گروه ۲: تزریق ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PBS)

گروه ۳: تزریق ۳۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی بافر فسفات و تعداد ۲ میلیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)

گروه ۴: تزریق ۳۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی بافر فسفات و تعداد ۲ میلیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در مجاورت سکرتوم (S-Nrf2).

بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* بر میزان اوره و کراتینین موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی:

بر اساس گروه‌بندی انجام شده، در روزهای ۳، ۱۰ و ۱۴ پس از تزریق، میزان اوره و کراتینین نمونه سرم مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب نمونه‌های خون تهیه شده در دور ۴۴۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از آن سرم خون از محتویات سلولی خون جدا شد. میزان

دامنه طبیعی سازی و اختلاف معنادار با ارزش p کمتر از ۰/۰۵ گزارش شد.

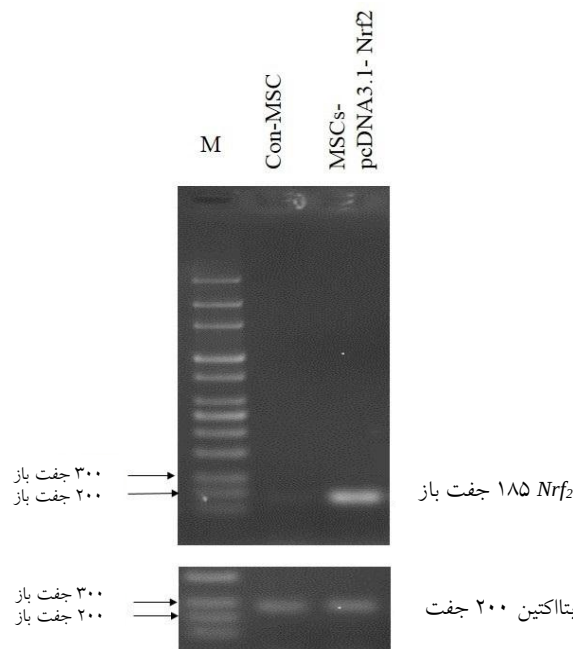
یافته‌ها

سلول‌های ترانسفکت شده ژن *Nrf2* را بیان می‌کنند: ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها با pcDNA3.1-*Nrf2*، بیان ژن *Nrf2* به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس و وسترن بلات در سلول‌های ترانسفکت شده در مقایسه با سلول‌های کنترل بررسی شد. سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-*Nrf2*، که MSC-*Nrf2* نامیده شدند، ژن *Nrf2* را بیان کردند (شکل ۱). در حالی که در سلول‌های دست‌ورزی نشده بیان این ژن مشاهده نشد. جهت کنترل مراحل آزمایش، بیان ژن بتا‌اکتین نیز مورد بررسی قرار گرفت و هر دو گروه مورد بررسی این ژن را به میزان مناسب بیان کردند (شکل ۱). نتایج وسترن بلات و حضور باند مورد نظر در سلول‌های MSC-*Nrf2* نشان داد که این سلول‌ها پروتئین *Nrf2* را نیز بیان می‌کنند. سلول‌های مزانشیمی که ترانسفکت نشده بودند، این پروتئین را بیان نکردند (شکل ۲).

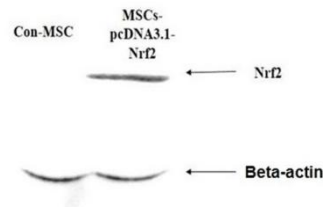
اوره و کراتینین سرم تهیه شده در آزمایشگاه بیوشیمی سازمان انتقال خون ایران اندازه‌گیری شد.

بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در سکرتم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* در بهبود شاخص‌های ریخت‌شناسی بافت کلیه: ۱۴ روز پس از سلول درمانی و به دنبال معدوم کردن موش‌های صحرایی طبق دستورالعمل استاندارد، مقاطع بافت کلیه تهیه گردید و رنگ‌آمیزی شد. به طور خلاصه مقاطع میکروسکوپی به ضخامت ۵ میکرون، با استفاده از میکروتوم دوار (Rotary) از بافت کلیه تهیه شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از الکل ۲۰٪ فیکس شده و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین صورت گرفت.

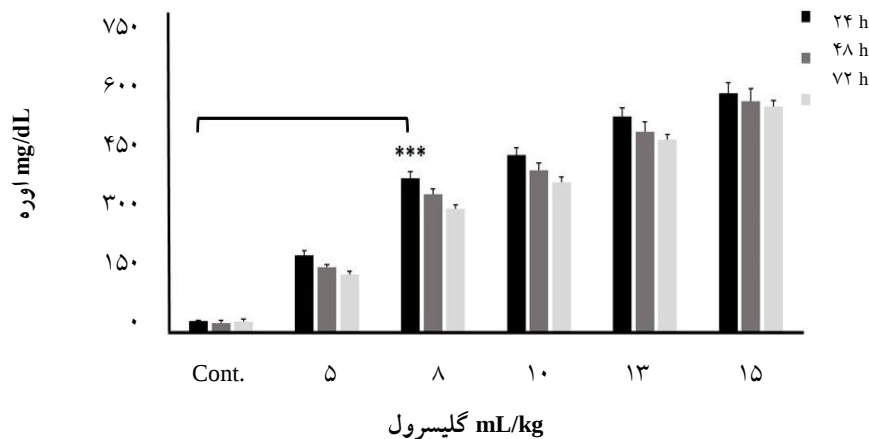
بررسی‌های آماری و تجزیه و تحلیل اطلاعات: داده‌ها و اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS version ۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.



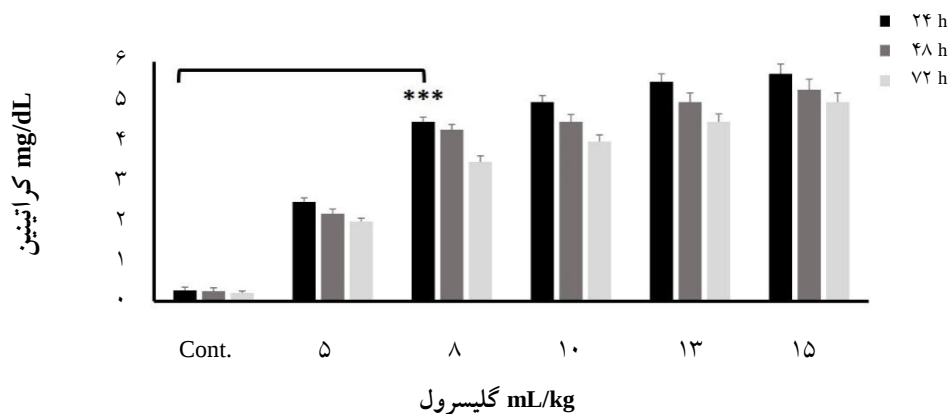
شکل ۱: بررسی بیان ژن *Nrf2* در سلول‌های MSCs ترانسفکت شده. شکل بالا: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪. M: مارکر ۱۰۰bp، MSCs-peDNA3.1-*Nrf2* ترانسفکت شده حاوی ژن *Nrf2*، Con-MSCs، MSC ترانسفکت نشده. شکل پایین: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن بتا اکتین مربوط به همان گروه‌های سلولی.



شکل ۲: بررسی بیان پروتئین Nrf2 در سلول‌های MSCs ترانسفکت شده: شکل بالا: Con-MSCs : MSC ترانسفکت نشده، MSCs-pcDNA3.1- *Nrf2* : MSC ترانسفکت شده حاوی ژن *Nrf2*. شکل پایین: بیان پروتئین بتا اکتین مربوط به همان گروه‌های سلولی.



نمودار ۱: بررسی میزان اوره سرم ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق مقادیر مختلف گلیسرول. میزان اوره پس از تزریق ۸ mL/kg گلیسرول افزایش داشت (۱۸ ± ۳۸۸). تزریق مقادیر ۱۰ تا ۱۵ mL/kg گلیسرول باعث افزایش مرگ و میر حیوانات می‌شد. مقدار ۸ mL/kg به عنوان مقدار بهینه جهت القای آسیب کلیوی تعیین شد ($p < 0.001$: ***).



نمودار ۲: بررسی میزان کراتینین سرم ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق مقادیر مختلف گلیسرول. میزان کراتینین پس از تزریق ۸ mg/kg افزایش داشت (۰/۶ ± ۴/۳). تزریق مقادیر ۱۰ تا ۱۵ mg/kg گلیسرول باعث افزایش مرگ و میر حیوانات می‌شد. مقدار ۸ mL/kg به عنوان مقدار بهینه جهت القای آسیب کلیوی تعیین شد ($p < 0.001$: ***).

تأیید آسیب حاد کلیوی در موش‌های صحرایی:

به منظور تعیین مقدار بهینه گلیسرول برای القای آسیب حاد کلیوی در موش‌های صحرایی، مقادیر مختلفی از گلیسرول به حیوانات تزریق شد و در بازه‌های زمانی مختلف میزان آسیب القا شده با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی نشان داد که مقدار ۸ mL/kg (میلی لیتر به کیلوگرم وزن حیوان) از محلول گلیسرول، ۲۴ ساعت پس از تزریق منجر به ایجاد آسیب حاد کلیوی در موش‌های صحرایی می‌گردد. نمودار ۱ و ۲ به ترتیب نتایج بیوشیمیایی میزان اوره و کراتینین سرم خون را به عنوان دو شاخص اصلی آسیب حاد کلیوی نشان می‌دهد. میزان اوره و کراتینین به طور قابل ملاحظه‌ای در این مدل از آسیب حاد کلیوی افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده نکروز پیش رونده بافتی و کاهش ناگهانی میزان قابلیت فیلتراسیون گلوMEROL بافت کلیه می‌باشد.

نتایج تزریق مقادیر بالاتر گلیسرول نیز آسیب حاد کلیوی را نشان می‌داد اما میزان مرگ حیوانات در مقادیر گلیسرول ۱۰ به بالا بسیار زیاد بود. هم چنین نتایج بافت‌شناسی آسیب‌های توبولی همانند فقدان حاشیه، فقدان سلول‌های اپی‌تلیال، بقایای سلولی در ناحیه لومن و کست‌های هیالینی را نشان می‌دهد که القای آسیب را در سطح بافتی تأیید می‌کند (شکل ۳). بنابراین مقدار ۸ mL/kg از محلول گلیسرول بعد از گذشت ۲۴ ساعت به عنوان مقدار و زمان بهینه برای القای آسیب حاد کلیوی تعیین شد.

سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* باعث بهبود اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی آسیب حاد کلیوی می‌شود:

بر اساس گروه‌بندی انجام شده، گروه‌های مختلف سلول‌های بنیادی مزانشیمی به موش‌های صحرایی تزریق شدند. میزان اوره و کراتینین نمونه سرم در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از درمان در گروه‌های مختلف ارزیابی شد. طبق نتایج به دست آمده، در روز ۳ تفاوت معناداری در میزان اوره و کراتینین بین موش‌های صحرایی دچار آسیب

حاد کلیوی دریافت‌کننده S-Nrf2، گروه MSC و گروه کنترل مشاهده نشد.

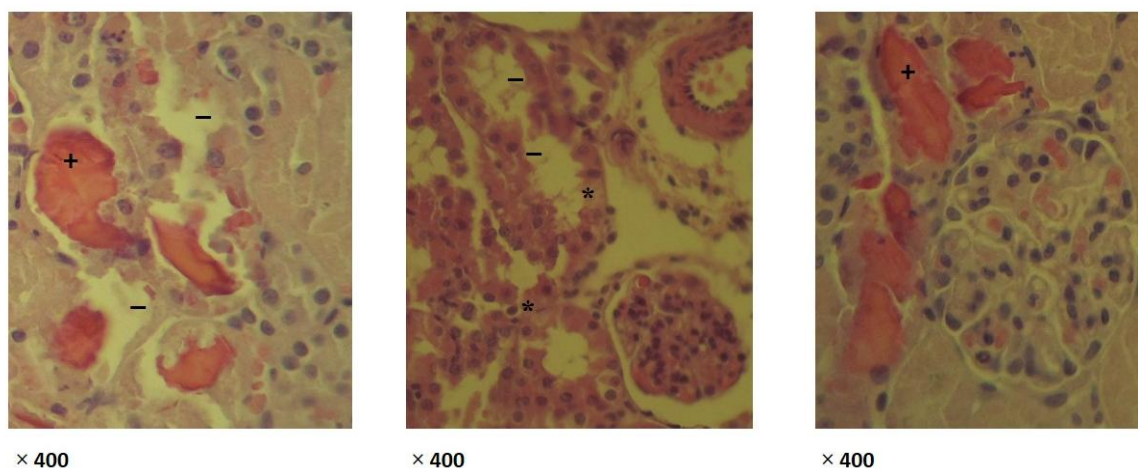
در روز ۷ میزان اوره سرم (9 ± 123 mg/dL) در گروه S-Nrf2 نسبت به گروه MSC (14 ± 209 mg/dL) به طور معناداری کاهش پیدا کرد ($p < 0/01$) (نمودار ۳). هم چنین پس از گذشت ۱۴ روز، اوره سرم ($3/5 \pm 48$ mg/dL) در گروه S-Nrf2 کاهش بیشتری در مقایسه با گروه MSC ($9/9 \pm 100$ mg/dL) نشان داد ($p < 0/001$: ***). از طرفی از نظر کاهش کراتینین سرم نیز در روزهای ۷ و ۱۴ پس از درمان، تفاوت معنادار بین گروه S-Nrf2 نسبت به گروه MSC مشاهده شد. کاهش مقادیر به ترتیب در روز ۷، $0/35 \pm 1/05$ mg/dL نسبت به $0/43 \pm 1/97$ mg/dL و در روز ۱۴، $0/15 \pm 0/49$ mg/dL نسبت به $0/26 \pm 0/97$ mg/dL بود (نمودار ۴) (به ترتیب $p < 0/005$ و $p < 0/001$). این شواهد نشان‌دهنده تأثیر سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* بر روی بهبود اثرات درمانی سلول‌های بنیادی بود.

۱۴ روز پس از سلول درمانی، ترمیم بافت کلیه با بررسی مقاطع بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. در گروهی که سلول دریافت نکرده بودند آسیب کلیوی، از دست رفتن انسجام توبولی و پهن شدن سلول‌های اپی‌تلیال به وضوح دیده شد. در گروه MSC آسیب بافتی کمتر و بقایای سلولی مشاهده گردید. در حالی که در گروه دریافت‌کننده S-Nrf2، انسجام توبول‌ها مشابه حالت طبیعی بوده و آثار چندانی از آسیب بافتی مشاهده نشد (شکل ۴A، B، C).

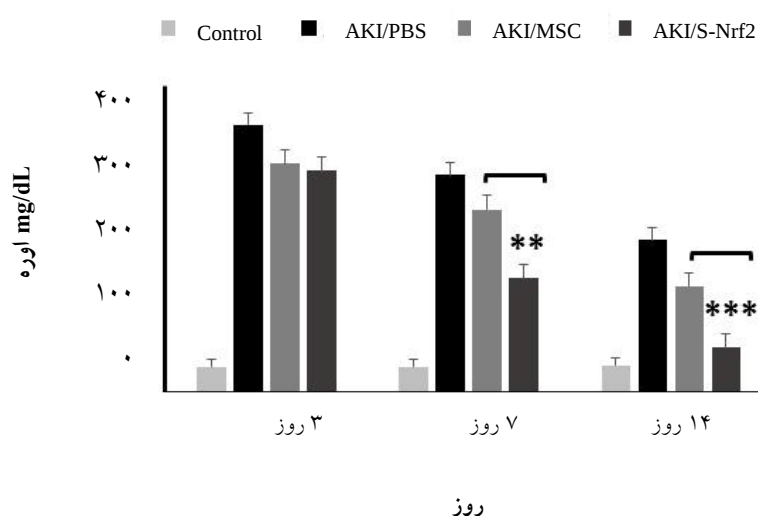
هم چنین بررسی مقاطع بافت‌شناسی در روز ۱۴ پس از درمان و کمی‌سازی تعداد کست و میزان نکروز توبولی، تفاوت معناداری را بین تعداد کست‌های مشاهده شده در مقاطع بافت کلیه موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی تحت درمان با S-Nrf2 (تعداد کست: $0/26$) و گروه MSC (تعداد کست: $0/51$) در مقایسه با گروه AKI که هیچ نوع سلولی دریافت نکرده بودند (تعداد کست: $3/6$) نشان داد ($p < 0/001$). بررسی کمی میزان نکروز توبولی در همان روز نیز مبین بهبود بیشتر بافت کلیه در گروه S-Nrf2 (میزان نکروز توبولی: $0/97$) در مقایسه با گروه MSC

Nrf2 بر بهبود اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود (شکل ۴D).

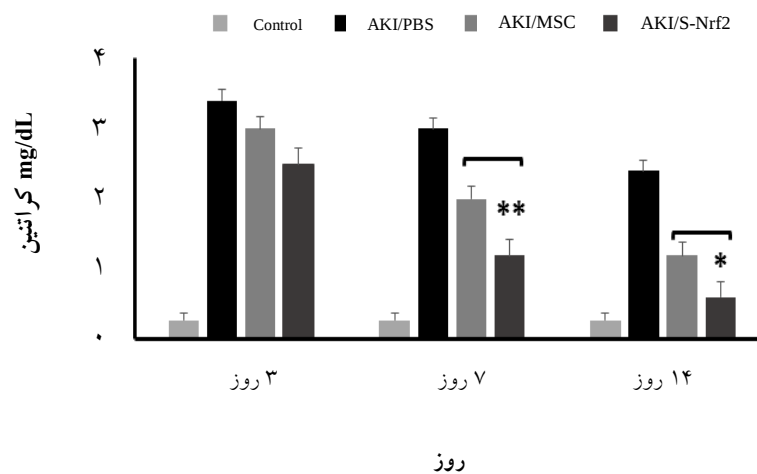
(میزان نکروز توبولی: ۱/۹۳) بود ($p < 0/001$) (شکل ۴). در مجموع نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مؤید تاثیر سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن



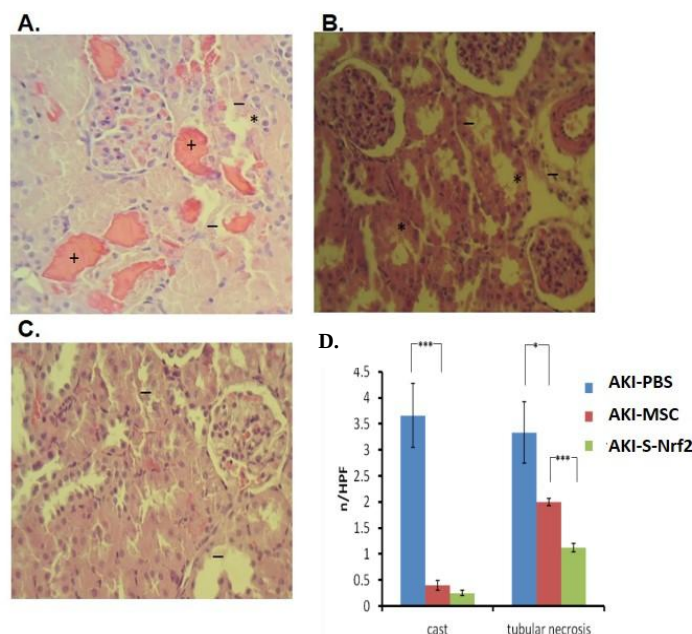
شکل ۳: نتایج ارزیابی پاتولوژی مقاطع بافت کلیه در موش‌های صحرایی ۲۴ ساعت پس از تزریق درون ماهیچه‌ای ۸ mL/kg گلیسرول. (+): cast، (-): بقایای سلولی (Cell debris) و (*): از دست دادن هسته. وجود این مشخصات ریخت‌شناسی در مقاطع بافتی از علائم اصلی آسیب حاد کلیوی می‌باشند.



نمودار ۳: ارزیابی میزان اوره سرم در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از درمان. ۷ روز پس از درمان کاهش مقدار اوره در گروه S-Nrf2 (9 ± 123) نسبت به گروه MSC (14 ± 209) معنادار بود ($p < 0/01$). پس از گذشت ۱۴ روز، اوره سرمی در گروه S-Nrf2 کاهش بیشتری ($5/3 \text{ mg/dL}$) در مقایسه با گروه MSC ($9/9 \pm 100$) نشان داد ($p < 0/001$: ***).



نمودار ۴: ارزیابی میزان کراتینین سرم در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از درمان. در روز ۷ مقدار کراتینین در گروه S-Nrf2 (1.05 ± 0.35) نسبت به گروه MSC (1.97 ± 0.43) معنادار بود ($p < 0.01$). پس از گذشت ۱۴ روز کراتینین سرمی در گروه S-Nrf2 کاهش بیشتری (0.15 ± 0.49) در مقایسه با گروه MSC (0.97 ± 0.26) نشان داد ($p < 0.001$).



شکل ۴: بررسی پاتولوژی بافت کلیه در موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی ناشی از تزریق گلیسرول ۱۴ روز پس از درمان سلولی: (A) گروه AKI (بدون دریافت سلول): توپول‌های کلیوی انسجام خود را از دست داده‌اند، سلول‌های اپی‌تلیال پهن‌تر شده‌اند و بقایای سلولی مشاهده می‌گردند. (B) گروه MSC: توپول‌ها منسجم‌تر می‌باشند، بقایای سلولی مشاهده می‌گردد و آسیب بافتی کمتری به نظر می‌رسد. (C) گروه S-Nrf2: انسجام توپول‌ها طبیعی می‌باشند و آثار چندانی از آسیب بافتی مشاهده نمی‌گردد. نمودار شمارش کست و نکروز توپولی در زمینه میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی $\times 400$. تعداد کست‌ها در گروه S-Nrf2 (میانگین 0.26) و گروه MSC (میانگین 0.51) در مقایسه با گروه AKI که هیچ نوع سلولی دریافت نکرده بودند (میانگین 3.6) تفاوت معنادار داشت ($p < 0.001$). میزان نکروز توپولی در گروه S-Nrf2 (میانگین: 0.97) در مقایسه با گروه MSC (میانگین: 1.93) کاهش بیشتری داشت ($p < 0.001$).

بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهم‌ترین سلول مورد استفاده در سلول درمانی می‌باشد (۳-۱). با وجود فواید متعدد، میزان بقای سلولی پایین MSCs در روزهای ابتدایی پس از پیوند، بعنوان چالش اساسی در کاربرد آن‌ها در سلول درمانی مطرح می‌باشد (۷).

به نظر می‌رسد مجهز کردن این سلول‌ها به ابزارهایی که باعث افزایش مقاومت سلولی می‌شوند، راهکاری نویدبخش در افزایش کارایی آن‌ها باشد. یکی از عوامل محافظت‌کننده سلولی، فاکتور رونویسی *Nrf2* می‌باشد که نقش مهمی را در بیان القایی بسیاری از ژن‌های محافظت‌کننده سلولی در برابر استرس اکسیداتیو و سایر تحریکات محیطی ایفا می‌کند (۹، ۱۷).

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شده با سکرتم ترشحی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2*، اثرات درمانی بیشتری در بافت کلیه آسیب دیده داشته و منجر به کاهش معنادار کراتینین و اوره سرم در روزهای ۷ و ۱۴ پس از سلول درمانی می‌شوند. از طرفی نتایج پاتولوژی مشخص کرد که در گروه دچار آسیب کلیوی دریافت‌کننده بافر فسفات، توبول‌های کلیوی انسجام خود را از دست داده، سلول‌های اپی‌تلیال پهن‌تر شده یا کاملاً از بین رفته‌اند. در گروه دریافت‌کننده MSC، توبول‌ها منسجم‌تر بوده و آسیب بافتی کمتری مشاهده شد. اما در گروه دریافت‌کننده S-Nrf2، توبول‌ها مشابه حالت طبیعی انسجام یافته بوده و آسیب بافتی چندانی مشاهده نمی‌گردد. کمی‌سازی نتایج پاتولوژی و شمارش کست و نکروز توبولی بیانگر ترمیم بیشتر بافت کلیه در گروه دریافت‌کننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شده با سکرتم بود.

به نظر می‌رسد بیشتر اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ناشی از اثرات پاراکرین و وجود فاکتورهای رشد یا مولکول‌های فعال زیستی مترشح آن‌ها باشد. این سلول‌ها پس از تزریق به بافت آسیب دیده مهاجرت کرده و باعث افزایش سرعت ترمیم بافتی می‌شوند (۱۹، ۱۸). در صورت به کارگیری مکانیسمی جهت افزایش بقای این

سلول‌های جادویی و جمع‌آوری سکرتم مربوطه، می‌توان از اثرات پاراکرین و ترشحی آن‌ها استفاده نموده و باعث افزایش اثرات درمانی و ترمیمی آن‌ها شد (۲۰).

به این منظور مطالعه‌هایی جهت افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا کاربرد آن‌ها در درمان بیماری‌های کلیوی انجام شده است. سلطانی و همکاران مقاومت و بقای سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شده با سکرتم سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1α* را در شرایط استرس اکسیداتیو، فقر غذایی و کمبود اکسیژن بررسی کردند و چنین نتیجه گرفتند که سکرتم ترشحی سلول‌های دست‌ورزی شده با *Nrf2*، باعث افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط سرشار از استرس می‌گردد (۱۵).

طبق مطالعه انجام شده توسط محمدزاده و همکارانش در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث تقویت ویژگی‌های ضدآپوپتوز و ضداکسیداتیو آن‌ها شده و بقای سلولی MSCs را در برابر استرس‌هایی که به ناچار با آن‌ها مواجه می‌شوند افزایش و میزان آپوپتوز سلول‌ها را کاهش می‌دهد (۱۱). از طرفی محمدزاده و همکاران طی مطالعه‌ای دیگر، پس از افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از سیستم آدنووایروس، از آن‌ها در درمان آسیب حاد کلیوی ناشی از تزریق سیس‌پلاتین استفاده کردند. وی اثرات درمانی سلول‌ها را طی ۱۱ روز بررسی کرد و این‌طور نتیجه گرفت که سلول‌های دست‌ورزی شده دارای توان ترمیمی بیشتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی معمولی بوده و باعث ترمیم سریع‌تر بافت کلیه پس از آسیب می‌شوند (۲۱).

مسعود و همکاران در سال ۲۰۱۲، جهت افزایش قدرت تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آن‌ها را با متیلن‌بلو و نیترو استیل پنی‌سلین آمین پیش شرطی کردند. پس از تزریق این سلول‌ها به موش‌های صحرایی دچار آسیب ایسکمیک کلیوی، این‌طور گزارش کردند که تزریق این سلول‌ها باعث کاهش فیبروز کلیوی، بهبود عملکرد بافت و افزایش بیان فاکتورهای رگرایی و التیام سریع‌تر می‌شود (۲۲).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌های ما، راه‌کار جدیدی را برای افزایش بقا و بهبود عملکرد MSCs در راستای افزایش کارایی و کیفیت سلول درمانی این سلول‌ها در زمینه درمان بیماری‌های کلیوی، بدون نیاز به دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها در آینده ارائه می‌دهد و گام نوینی به منظور امکان استفاده از سلول درمانی در مرحله بالینی را فراهم می‌آورد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح پژوهشی مصوب شده در مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. کلیه حقوق مربوط به این کار پژوهشی به این مؤسسه باز می‌گردد.

References :

- Amiri F, Halabian R, Dehgan Harati M, Bahadori B, Mehdipour A, Mohammadi Roushandeh A, *et al.* Positive selection of Wharton's jelly-derived CD105+ cells by MACS technique and their subsequent cultivation under suspension culture condition: A simple, versatile culturing method to enhance the multipotentiality of mesenchymal stem cells. *Hematology* 2015; 20(4): 208-16.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy* 2013; 15(3): 330-43.
- Li Q, Wang Y, Deng Z. Pre-conditioned mesenchymal stem cells: a better way for cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4(3): 63.
- Amiri F, Molaei S, Bahadori M, Nasiri F, Deyhim MR, Jalili MA, *et al.* Autophagy-modulated Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Liver Restoration in Mouse Models of Acute Liver Failure. *Iran Biomed J* 2016; 20(3): 135-44.
- Nasiri F, Amiri F, Mohammadipour M, Molaei S, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. H₂O₂-preconditioned mesenchymal stem cell regenerative effects on acute liver failure mice. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2015; 12(2): 111-24. [Article in Farsi]
- Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 2016; 25(5): 829-48.
- Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L and Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(7): 1339-50.
- Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. *In vitro* augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments: *In vitro* augmentation of mesenchymal stem cells viability. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20(2): 237-51.
- Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37(2): 139-43.
- Mehrabi Habibabadi H, Amiri F, Moslemi E, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. Overexpression of Nrf2 in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells upregulating cytoprotective genes, TXNRD1 and GCLC. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2015; 12(3): 255-65. [Article in Farsi]
- 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.
- Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, Kanehira M, Sun R, Nukiwa T, *et al.* Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. *Mol Ther* 2011; 19(1): 196-203.
- 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.
- Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(13-14): 1479-89.
- Soltani F, Amiri F, Kheirandish M, Mohammadipour M, Jalili M, Habibi Roudkenar M, *et al.* Cell survival evaluation of mesenchymal stem cells cultivated in the presence of secretome of HIF-1 α /Nrf2-engineered-MSC. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2016; 12(4): 318-30. [Article in Farsi]
- Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, *et al.* Chronic kidney disease as global public health problem: approaches and initiatives a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007; 72(3): 247-59.
- Murakami S, Motohashi H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(Pt B): 168-78.
- Bianchi F, Sala E, Donadei C, Capelli I, La Manna G. Potential advantages of acute kidney injury management by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(5): 644-50.
- Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and

- kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant 2010; 25(1): 17-24.
- 20- Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, *et al.* Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. Cell Transplant 2011; 20(5): 693-706.
- 21- Mohammadzadeh-Vardin M, Habibi Roudkenar M, Jahanian-Najafabadi A. Adenovirus-Mediated Over-Expression of *Nrf2* Within Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Protected Rats Against Acute Kidney Injury. Adv Pharm Bull 2015; 5(2): 201-8.
- 22- Masoud MS, Anwar SS, Afzal MZ, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Pre-conditioned mesenchymal stem cells ameliorate renal ischemic injury in rats by augmented survival and engraftment. J Transl Med 2012; 10: 243.

Original Article

Evaluation of the repair effects of MSCs cultivated with secretome of *Nrf2* engineered MSCs on acute kidney injury in rats

Jaleh F.¹, Amiri F.¹, Dehghan Harati M.¹, Habibi Roudkenar M.¹, Jalili M.A.¹

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

Abstract

Background and Objectives

The decrease in mesenchymal stem cells (MSCs) survival rate after transplantation is a major challenge in MSC-cell-therapy. Hence, it is promising to employ some proper strategies for addressing this problem. This study was conducted to assay the therapeutic effects of MSCs treated with *Nrf2*-manipulated-MSC conditioned medium in acute kidney injury (AKI)-induced animal models.

Materials and Methods

In an experimental study, recombinant plasmid pcDNA3.1-*Nrf2* was transfected into bone marrow-derived MSCs and the resulted conditioned medium was harvested. The MSCs was cultivated with *Nrf2*-manipulated-derived conditioned medium. The conditioned medium-treated-MSCs were transplanted to AKI-induced rats (each group containing 10 rats) and the therapeutic potentialities of these MSCs were evaluated using biochemical and pathological methods.

Results

Fourteen days after MSCs transplantation, there was a significant difference in BUN decreasing in rat groups injected with conditioned medium-treated-MSCs (48 ± 3.5 mg/dL) in comparison with those injected with normal MSCs (100 ± 9.9 mg/dL) ($p < 0.001$). The number of observed casts (0.26) in kidney tissue sections of these rat groups were also less than (0.51) the groups transplanted with normal MSCs.

Conclusions

Cultivation of MSCs in the presence of *Nrf2*-manipulated-derived conditioned medium increase the therapeutic effects of these cells in AKI-induced models.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Acute Kidney Injury, Conditioned Medium

Received: 26 Jun 2015

Accepted: 5 Oct 2016

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