خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۱ بهار ۹۲ (۵۲-۴۰)

مقاله پژوهشی

تاثیر اتوفاژی بر بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمال پس از مواجهه با استرس‌های اکسیداتیو

علی حسینی[۱]، راحله حلبیان[۲]، پژمان حامدی اصل[۱]، حامد بشیری نهنجی[۱]، محمد علی جلیلی[۳]، مجید حیدری[۴]، ناصر امیری‌زاده[۵]، مهریار حبیبی رودکنار[۶]

چکیده

سابقه و هدف

بررسی‌ها نشان داده که سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSC) در مدت زمان کوتاهی پس از پیوند می‌میرند، که به دلیل شرایط نامطلوب ریز محیط پیوندی در اثر افزایش عوامل استرسی، به ویژه استرس‌های اکسیداتیو، هایپوکسی و فقر غذایی می‌باشد. به دلیل اهمیت موضوع، در این مطالعه اثر اتوفاژی بر بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمال پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو(H_2O_2) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان(MSCs) با استفاده از فایکول جداسازی و پاساژ سلولی چهارم انتخاب شد. وجود اتوفاژی از طریق شناسایی LC3 (از اجزای اصلی اتوفاگوزوم) با ترانسفکشن وکتور حاوی GFP-LC3 به MSCs بررسی گردید. راپامایسین جهت القای اتوفاژی و تری متیل آدنین(۳MA) جهت مهار اتوفاژی به محیط کشت MSCs افزوده شدند. پس از طی دوره انکوباسیون، MSCs با غلظت‌های کشنده از H_2O_2 مواجه و میزان بقای این سلول‌ها با روش MTT Assay ارزیابی شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که القای اتوفاژی در MSCs موجب افزایش حساسیت در برابر استرس‌های اکسیداتیو و مهار اتوفاژی باعث افزایش مقاومت MSCs نسبت به استرس‌های اکسیداتیو و افزایش میزان بقای MSCs در مقایسه با سلول‌های کنترل شد.

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که مهار اتوفاژی در MSCs می‌تواند به میزان قابل توجهی بقای سلولی را در برابر استرس‌های اکسیداتیو بهبود بخشد. در نتیجه استفاده از مهارکننده‌های اتوفاژی از قبیل ۳MA در پیوند MSCs ممکن است در آینده‌ای نزدیک، یک راه‌کار برای افزایش کارآمدی سلول درمانی را فراهم کند.

کلمات کلیدی: **سلول‌های بنیادی مزانشیمال، اتوفاژی، استرس‌های اکسیداتیو، هایپوکسی سلولی، راپامایسین**

تاریخ دریافت : ۹۱/۲/۱۸
تاریخ پذیرش : ۹۱/۷/ ۲

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی ـ مربی مرکز تحقیقات میکروبیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران
۳- PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد پاتوبیولوژی ـ مربی مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۶- مؤلف مسؤول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

مقدمه

MSCs ، گروهی از سلول‌های استرومایی غیرخونساز مغز استخوان هستند که در شرایط مناسب کشت سلولی و محیط بدن، توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی از قبیل سلول‌های استخوانی، چربی، غضروف و سلول‌های عضلانی را دارا می‌باشند(۱). امروزه MSCs به عنوان یک منبع سلولی امید بخش در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی جهت درمان بسیاری از بیماری‌های کشنده و ژنتیکی مطرح گردیده‌اند. با این وجود مشکلات فراوانی از جنبه‌های گوناگون موجب محدودیت‌هایی در کاربرد بالینی MSCs شده است. در این خصوص نتایج بسیاری از تحقیقات دلالت بر این دارد که در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند به دلیل آسیب‌های ناشی از استرس‌های اکسیداتیو، فقر غذایی، هایپوکسی و دیگر موارد، تعداد ناچیزی از MSCs زنده می‌مانند و تنها بهبود عملکرد نواحی حاشیه‌ای بافت آسیب دیده را به همراه دارند(۲). در این راستا، ارایه راه‌کارهای درمانی مؤثر با هدف افزایش کارآیی و ایمنی درمان‌های سلولی مبتنی بر MSCs، از موضوعات بسیار مهم تحقیقات جدید به شمار می‌رود که از آن جمله می‌توان به درمان ریز محیط پیوندی جهت کاهش عوامل آسیب‌رسان مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن(OFRs)، بیان یا القای ژن‌های بقای سلولی به ترتیب از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک یا روش‌های پیش‌شرطی کردن(preconditioning) را نام برد.

با وجود نتایج رضایت‌بخش در خصوص هر یک از این روش‌ها، تاکنون جواب قطعی و قابل قبولی به دست نیامده است و هریک در زمینه خاصی با مشکلاتی همراه بوده است. به عنوان مثال در روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌های بنیادی با ژن‌های بقای سلولی از قبیل AKT ، به دلیل افزایش بقای سلولی به طور دایم و کاهش قابل توجه در میزان آپوپتوز سلول‌ها، خطر وقوع تومورزایی در سلول‌ها مشاهده شده است(۳). از طرف دیگر در بررسی نتایج درمان در ژن درمانی، به دلیل طولانی بودن فرآیند پایش و مشخص نبودن محدوده زمانی، از نظر اقتصادی اجرایی نمی‌باشد.

امنیت زیستی درمان(درمان با کمترین عوارض) از معیارهای اصلی در استانداردهای کنترل کیفی درمان های سلولی می‌باشد و در این راستا به منظور استفاده بالینی از MSCs در درمان، علاوه بر دست‌یابی به تعداد مورد نیاز از سلول‌هایی با صلاحیت عملکردی مطلوب، بایستی سلول‌ها از نظر ویژگی فنوتیپ و ژنوتیپ سلولی نیز بدون نقص و پایدار باشند، تا افزایش کارآیی و امنیت زیستی پیوند منجر به درمانی استاندارد و موفقیت‌آمیز گردد.

اتوفاژی یک مسیر کاتابولیک است که به وسیله تشکیل وزیکول با غشای دو لایه به نام اتوفاگوزوم مشخص می‌گردد. اتوفاگوزوم اجزای درون سیتوپلاسمی را در بر گرفته و به لیزوزوم‌ها جهت تجزیه تحویل می‌دهد. اتوفاژی پس از مواجهه سلول با استرس‌های محیطی همانند فقر غذایی، هایپوکسی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن، القا شده و با فرآیندی تطابقی یا سازگار پذیر(آداپتیو)، از طریق مهیا کردن متابولیت‌های انرژی‌زا، بقای سلول را تداوم می‌بخشد. به طوری که در مطالعه‌های اخیر با حذف ژن‌های کلیدی فرآیند اتوفاژی، افزایش مرگ سلولی مشاهده شده است. در مطالعه‌های مشابهی گزارش شده که به واسطه مهار اتوفاژی در سلول‌ها، آپوپتوز افزایش می‌یابد.

اتوفاژی به عنوان یک فرآیند حیاتی در سلول شناخته می‌شود که در تکامل زیستی، سیستم ایمنی و مرگ سلولی نقش ایفا می‌کند و در خصوص اختلالات کشنده‌ای از قبیل تحلیل سیستم عصبی، بیماری‌های خود ایمنی و انواع سرطان‌ها تاثیرگذار می‌باشد. اتوفاژی دارای عملکردی دوگانه می‌باشد، از یک طرف باعث افزایش مدت و میزان بقای سلول و از طرف دیگر در مراحل پیشرفته باعث مرگ سلول می‌شود(۴). لیکن تاکنون درخصوص نقش اتوفاژی در فرآیند مرگ سلولی توافقی حاصل نشده است و ناهمگونی در نتایج بسیاری از مطالعه‌ها بحث‌برانگیز بوده است. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته، در این مطالعه از اتوفاژی به عنوان یک راه‌کار درمانی جدید و ایمن با هدف افزایش بقای MSCs پس از مواجهه با استرس‌های اکسیداتیو(H_2O_2) استفاده گردید.

به طور کلی هدف پاسخ به دو سؤال بود: ۱- آیا القای

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

اتوفـاژی با راپامایسین، منجر به افزایش بقای MSCs پـس از مواجهه با H_2O_2 می‌گردد یـا بـر عکـس؟ ۲- آیـا مهـار اتوفاژی با ۳MA منجـر بـه افـزایش بقـای MSCs پـس از مواجهه با H_2O_2 می‌گردد یا بر عکس؟

مواد و روش‌ها

پلاسمید و سویه باکتری:

در یـک مطالعـه تجربـی، پلاسـمید pEGFP-LC3m (اهدایی از آزمایشـگاه پروفسـور فوکوموتـا در ژاپـن) بـه عنـوان وکتـور کلونینـگ و بیـانی و سـویه بـاکتری *E.coli* (اینـویتروژن ـ آمریکـا) TOP10 بـه عنـوان میزبـان پروکاریوتی جهت ازدیاد وکتور مـورد نظـر انتخـاب شـد. وکتور pEGFP-LC3m دارای ژن مقاومـت بـه کانامایسـین جهت غربـالگری کلـون‌هـای ترانسـفرم شـده در میزبـان پروکاریوتی و جنتیسین برای غربالگری کلون‌هـای پایـدار ترانسفکت شده در رده سلولی یوکـاریوتی مـی‌باشـد. بـه منظور بررسی اتوفاژی، وکتور پلاسـمیدی pEGFP-LC3m حاوی ژن LC3 و جهت ردیابی سلول‌های مـورد نظـر بـه وسیله میکروسـکوپ فلورسـانت، ژن گزارشـگر پـروتئین فلورسانت سبز(GFP) در سـاختار وکتـور قـرار داده شـده بود.

LC3 (ژن مخصوص بررسی اتوفاژی) بـه صـورت tag به پروتئین GFP متصـل اسـت و در متـن ارایـه گردیـد. پروتئین LC3 تعبیه شده در وکتور، یکی از اجزای کلیـدی اتوفاژی بـوده کـه بـه دو صـورت LC3 نـوع I و II بـروز می‌کند. این پروتئین به طور طبیعـی در سیتوپلاسـم واقـع شده است و در هنگام تشکیل اتوفاگوزوم LC3 نوع I ، به LC3 نوع II تبدیل شده و به غشای دو لایه‌ای اتوفاگوزوم الحاق می‌گردند، که در نتیجه آن می‌توان به طور مستقیم با شناسایی LC3 ، القا شدن اتوفاژی را در سـلول شناسـایی نمود(۵). در این حالت به دلیل این کـه LC3 بـه صـورت فیوژن به GFP متصل می‌باشد، نقـاط سـبز رنـگ GFP بـه صورت نقطه نقطه متراکم در غشای اتوفـاگوزوم‌هـا قابـل مشاهده هستند. در غیر این صورت (عدم اتوفـازی) GFP به صورت معمول و یکنواخت در کل سیتوپلاسم پراکنـده است.

کشت سلولی:

میزان ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آسپیراسیون مغز استخوان یک داوطلب سالم(بـا کسـب رضـایت) در مرکـز پیونـد مغـز استخوان بیمارستان شریعتی جهت جداسازی سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمال(MSCs) در ضد انعقاد هپارین گرفته شد و در شرایط استریل به مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انتقال یافت.

بـه طـور خلاصـه سـلول‌هـای تـک هسـته‌ای مغـز اسـتخوان(MNC) بـا اسـتفاده از فـایکول(۱/۰۷۷ g/mL ؛ آمریکا، آمستردام) با سانتریفوژ شیب غلظتی جداسـازی و در محـیط کشـت سـلولی اختصاصـی DMEM-Low Glucose (آمریکـا ، اینـویتروژن) بـا ۱۰٪ FBS (آمریکـا، اینویتروژن)، ۱٪ پنـی‌سـیلین و ۱٪ استرپتومایسـین(ایـران، سیناژن) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گـراد و ۵٪ CO_2 کشـت داده شدند.

۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیر چسبنده به وسیله تعویض محیط کشت حذف شدند و سلول‌هـای چسبنده باقی ماندنـد. تعـویض محـیط کشـت سـلولی بـا فاصـله زمـانی ۳ روز، موجـب حـذف سـلول‌هـای غیـر چسبنده شد و در نهایت MSCs حاصـل از پاسـاژ چهـارم برای آزمایش‌های نهایی فراهم شدند. جهت تاییـد هویـت سلولی، MSCs تکثیر یافته در *in vitro* از نظر مورفولـوژی مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیـین شـاخص‌هـای سـطحی MSCs بـه وسـیله فلوسایتومتری:

ابتدا MSCs را با PBS (آمریکـا، اینـویتروژن) شستشـو داده و پس از تریپسینه کردن به فالکن منتقـل شـدند و بـه مدت ۵ دقیقه سـانتریفوژ انجـام شـد. پـس از سـانتریفوژ نمودن، مایع‌رویی را دور ریخته و بـه ازای هـر ۱۰۴-۱۰۳ سـلول در هـر میکرولیتـر محـیط، ۵ میکرولیتـر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مربوطه افزوده شده و بـه مـدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تـاریکی انکوبـه شدند. در انتهـا ۱۰۰ میکرولیتـر محلـول پارافرمالدئیـد بـه محلول حاوی سلول و آنتی‌بادی اضـافه گردیـد و توسـط دستگاه فلوسایتومتری، نتایج تجزیه و تحلیل گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های MSC ، به رده سلولی استخوانی:

بررسی میزان تمایز سلول‌های MSC با استفاده از کیت‌های تمایزی اختصاصی به رده سلولی استخوانی حاوی Ascorbate ، L-Glutamin ، β-Glycerophosphate Dexamethasone و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بر روی سلول‌های MSC انجام شد. در یک پلیت ۲۴ خانه‌ای به صورت سه تایی، ۱۰۰۰۰ سلول MSC جداسازی شده (پاساژ ۲) ریخته شد و به آن‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-LG حاوی سرم افزوده و پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵٪ قرار داده شد. پس از ۳ روز، محیط کشت خالی شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محیط تمایز به سه چاهک افزوده شد. در سه چاهک دیگر که به عنوان کنترل استفاده شدند، تنها محیط کشت اضافه شد(در این چاهک‌ها فقط ۱۰۰۰۰ سلول MSC معمولی بدون فاکتور تمایزدهنده وجود دارد). به مدت ۲۱ روز، محیط تمایز هر ۴-۳ روز یک بار تعویض شد. بعد از این مدت در نهایت رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایزی ۲٪ آلیزارین رد جهت تعیین هویت رده سلولی استخوانی (اوستئوبلاست) مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های MSC به رده چربی (آدیپوسیت):

بررسی میزان تمایز سلول‌های MSC با استفاده از کیت‌های تمایزی اختصاصی به رده سلولی آدیپوسیت حاوی L-Glutamin ، H-Insulin (recombinant) ، IBMX، Indomethacin ، Dexamethasone ، (3-isobutyl-methyl-xanthine) و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بر روی سلول‌های MSC انجام شد. ابتدا در یک پلیت ۲۴ خانه‌ای، به صورت سه‌تایی ۱۵۰۰۰ سلول MSC به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-LG حاوی سرم ریخته و پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵٪ قرار داده شد. پس از ۳ روز محیط کشت خالی شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محیط تمایز به سه چاهک افزوده شد. در سه چاهک دیگر که به عنوان کنترل استفاده شدند، تنها محیط کشت اضافه شد(در این چاهک‌ها فقط ۱۵۰۰۰ سلول MSC معمولی بدون فاکتور تمایزدهنده وجود دارد). به مدت ۷ روز، محیط تمایز هر ۴-۳ روز یک بار تعویض شد. بعد از این مدت به منظور بررسی تمایز سلول‌ها، رنگ‌آمیزی اختصاصی HCS LipidTOXTM Green Neutral Lipid انجام گرفت.

ترانسفورماسیون وکتور pEGFP-LC3m به میزبان پروکاریوتی:

جهت بررسی میزان اتوفاژی در سلول بنیادی، می‌بایست سازه حاوی ژن بیانگر اتوفاژی در این سلول‌ها به صورت اکتوپیک بیان شود. بدین منظور از وکتور pEGFP-LC3m استفاده گردید. برای تکثیر این سازه، ابتدا وکتور مذکور به داخل باکتری *E.coli* سوش TOP10 که با روش $CaCl_2$ سرد آماده شده بود ترانسفورم شد. در پایان مرحله ترانسفورم، باکتری ترانسفورم شده در پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک اختصاصی کانامایسین، به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به دلیل وجود ژن مقاومت به کانامایسین در وکتور، تنها کلون‌های حاوی وکتور زنده مانده و بدین صورت کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب غربالگری شدند. از کلونی‌های رشد کرده در محیط انتخابی با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation (رُوش – آلمان) و طبق دستورالعمل، استخراج پلاسمید نوترکیب صورت گرفت. سپس غلظت(کمیت) پلاسمید استخراج شده با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری و هم چنین با الکتروفورز بر روی ژل ۱٪ آگارز پلاسمید تعیین کیفیت شد.

ترانسفکشن وکتور pEGFP-LC3m به MSCs جهت القای اتوفاژی:

۲ میکروگرم از وکتور pEGFP-LC3m به همراه ۵ میکرولیتر از معرف فیوژن ۶ (Fugene 6 Transfection Reagent ، آلمان، رُوش) به داخل هر چاهک ۶ خانه حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمال ترانسفکت گردید. لازم به ذکر است یک روز قبل از ترانسفکت، حدود ۵۰۰ هزار سلول در هر چاهک ۶ خانه‌ای ریخته شد. به منظور به دست آوردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال GFP-LC3

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

پایدار، به محیط‌های کشت آنتی‌بیوتیک جنتیسین اضافه گردید. از آن جا که سلول‌های حاوی وکتور، دارای ژن مقاوم به جنتیسین بودند، در مقابل این آنتی‌بیوتیک مقاومت کرده و بقیه سلول‌ها مردند. از زمانی که سلول‌های ترانسفکت شده با جنتیسین تیمار شدند، از روز ۳ به بعد مرگ سلولی آغاز و بعد از گذشت ۱۶ روز سلول‌های پایدار مقاوم به جنتیسین به دست آمد. سپس تعداد ۱۵۰۰۰۰– ۲۰۰۰۰۰ سلول به هر خانه پلیت کشت سلولی شش خانه‌ای حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی DMEM Low Glucose ، FBS دار منتقل گردید. به یک سری از سلول‌ها راپامایسین با غلظت ۱۰ ng/mL (به عنوان القاکننده اتوفاژی) و به سری دیگر MA ۳ با غلظت ۱ mM/mL (به عنوان مهارکننده اتوفاژی) افزوده و سری سوم به عنوان کنترل درنظر گرفته شد. سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در نهایت جهت بررسی اتوفاژی در MSCs پلیت‌های حاوی سلول، برای مشاهده نقاط سبزرنگ با میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

به دلیل این که پایه و مبنای این مطالعه بررسی تاثیر اتوفاژی بر بقای سلول‌های مزانشیمال بوده و برای این ارزیابی در درجه اول حضوریک ژن بیانگر(مارکر) اتوفاژی از ملزومات مطالعه بود، بنابراین در آزمایش‌ها، گروه کنترل همان سلول ترانسفکت شده با مارکر اتوفاژی LC3 است که با سلول‌های ترانسفکت شده و تیمار شده با القاکننده و مهارکننده اتوفاژی مقایسه می‌شود. در واقع مقایسه بین سلول ترانسفکت شده با LC3 بدون تیمار با القاکننده و مهارکننده اتوفاژی(کنترل) و سلول‌های ترانسفکت شده باLC3 و تیمار شده با القاکننده و مهارکننده اتوفاژی است. چون اصل مطالعه بررسی شکست LC3 و ایجاد و مشاهده اتوفاگوزوم در سلول‌ها است در صورت عدم حضور عامل اصلی(LC3 متصل به GFP) این مطالعه معنادار نمی‌باشد(۱۶، ۲).

مواجهه سلول‌های MSC با غلظت‌های مختلف H_2O_2 :

ابتدا ۱۲۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و به محیط کشت DMEM Low Glucose حاوی ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک اضافه شد. سپس پلیت به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 دار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از این مدت به تعدادی از سلول‌ها راپامایسین(عامل القای اتوفاژی) با غلظت‌های ۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۸ نانوگرم، به تعداد دیگری از سلول‌ها MA ۳ (عامل مهار اتوفاژی) با غلظت‌های mM ۳، ۲، ۱ اضافه شد و مابقی سلول‌ها به عنوان کنترل باقی ماندند. سپس پلیت برای بار دیگر به داخل انکوباتور منتقل و ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت تمام سلول‌ها به جز کنترل، با غلظت‌های H_2O_2 µm/mL ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰ مجاور شدند و به مدت ۴ ساعت(در تاریکی) در داخل انکوباتور، انکوبه شدند.

سنجش درصد بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT :

پس ازانجام مراحل فوق، ابتدا مایع چاهک‌ها خارج شدند سپس سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (آمریکا، سیگما) به علاوه ۹۰ میکرولیتر از محیط DMEM Low Glucose داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 دار انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (آلمان، مرک) به علاوه ۲۵ میکرولیتر از بافر سورنسن به چاهک‌ها اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS در $p< ۰/۰۰۱$ ، $p< ۰/۰۱$ و $p< ۰/۰۵$ و با در نظر گرفتن خطای معیار(SEM) انجام گردید. تمام مراحل آزمایش‌های فوق به صورت سه تایی(تریپلیکیت) انجام شد.

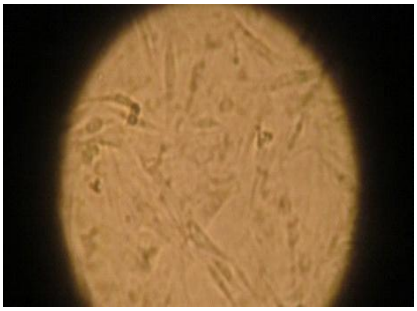
یافته‌ها

تایید حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی و دستگاه فلوسیتومتری:

پس از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSC) جدا شده از نمونه مغز استخوان و گذشت زمان لازم برای رشد در محیط کشت اختصاصی، مورفولوژی آن‌ها مورد

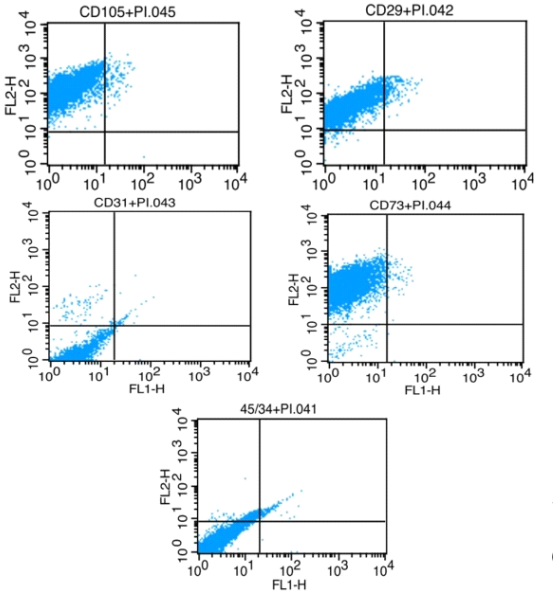
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

بررسی قرار گرفت. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جدا شده از لحاظ مورفولوژی مشابه سلول‌های MSC بودند(شکل ۱).



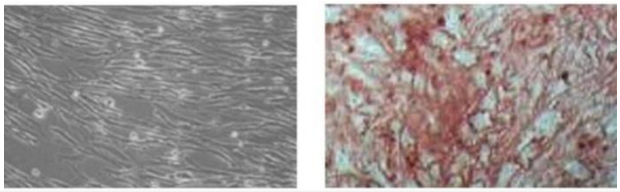
شکل ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده از مغز استخوان، ۷ روز پس از زمان جداسازی پاساژ اول

پس از مشاهدات میکروسکوپی، حضور مارکرهای موجود در سطح سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وجود مارکرهای سطحی CD73 ، CD29 ، CD105 و عدم حضور مارکرهای CD31 ، CD45 ، CD34 تاییدکننده سلول‌های مزانشیمال بود(شکل ۲).

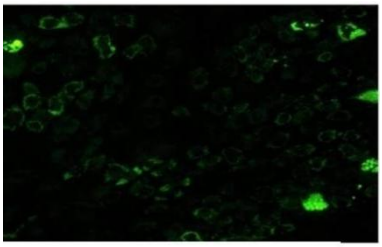


شکل۲: بررسی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال. وجود مارکرهای سطحی CD37 ، CD29 ، CD105 و عدم حضور مارکرهای CD31، CD45، CD34 تایید کننده سلول‌های مزانشیمال بود.

سلول‌های MSC با استفاده از مراحل ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها، به رده سلولی استخوانی تمایز داده شد، پس از ۲۱ روز، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ۲٪ صورت گرفت. نتایج بیانگر آن بود که سلول‌های MSC توانایی تمایز به رده سلولی استخوانی را داشتند(شکل ۳B).



B : تمایز استخوانی A : کنترل



C : تمایز چربی

شکل ۳: توانایی تمایز سلولی سلول‌های MSC. A : سلول‌های MSC کنترل بدون تیمار با فاکتورهای تمایزی. B : سلول‌های MSC تمایز یافته به استخوانی در حضور فاکتورها و محیط اختصاصی سلول‌های استخوان‌ساز. C : سلول‌های MSC تمایز یافته به سلول‌های چربی در حضور فاکتورها و محیط اختصاصی سلول‌های چربی‌ساز.

تمایز سلول‌های MSC به رده سلولی چربی(آدیپوسیت):

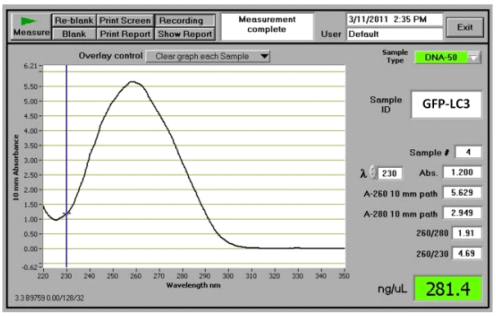
سلول های MSC با استفاده از مراحل ذکر شده در بخش موادو روشها ، به رده سلولی استخوانی تمایز داده شد، پس از ۷ روز رنگ‌آمیزی HCS LipidTOXTM Green Neutral Lipid ۱٪ صورت گرفت. نتایج بیانگر آن است که سلول‌های MSC دارای خاصیت چند ظرفیتی بوده و به رده چربی تمایز یافتند(شکل ۳C).

تکثیر وکتور بیانی حاوی ژن LC3 (pEGFP-LC3) :

وکتور نوترکیب با روش شیمیایی به باکتری مستعد انتقال داده شد. از آن جا که ناقل کلونینگ حاوی ژن

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

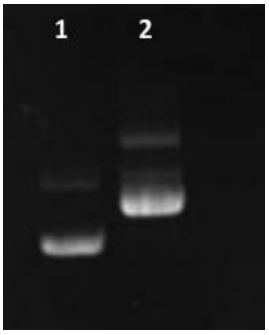
مقاومت به کانامایسین بود، تنها باکتری‌های نوترکیب در محیط کشت LB آگارحاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد کردند.



شکل ۴: اندازه‌گیری کمیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ. همان گونه که در نمودار مشخص است، عدد ۲۸۱/۴، نمایانگر غلظت DNA می‌باشد.

تعیین کمیت و کیفیت DNA پلاسمیدی استخراج شده:

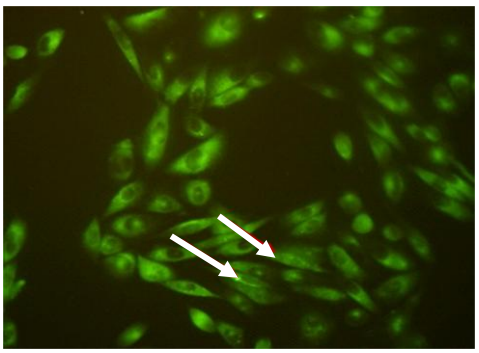
DNA پلاسمیدی از تک کلون‌های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک در محیط کشت LB و غلظت (کمیت) پلاسمید استخراج شده با دستگاه نانودراپ که یک اسپکتروفتومتر می‌باشد، اندازه‌گیری شد(شکل ۴). کمیت DNA ۲۸۱/۴ uL/ng بود. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج λ ۲۶۰/۲۸۰ ، ۱/۹۱ بود که نشان‌دهنده عدم وجود ناخالصی می‌باشد. پس از این که غلظت DNA پلاسمیدی استخراج شده به کمک نانودراپ تعیین گردید برای آنالیزکیفیت نمونه، از نمونه استخراج شده آزمایش الکتروفورز در کنار ناقل pUC19 به عمل آمد که حضور سه باند بیانگر کویل، سوپرکویل و خطی بودن DNA و نشان‌دهنده خلوص و عدم شکست در پلاسمید و هم چنین تاییدکننده صحت مراحل استخراج پلاسمید بود، از آن جا که ناقل کنترل دارای طول ۲۶۸۰ bp و معادل ناقل خالی است، بنابراین می‌بایست محل قرار گرفتن باند حاصل از پلاسمید نوترکیب بالاتر از پلاسمید کنترل باشد (شکل ۵). سپس وکتور تکثیر و خالص‌سازی شده به MSCs انتقال یافت و پس از ترانسفکت سازه GFP-LC3 به داخل سلول‌ها، به منظور بیان پایدار GFP-LC3 در سلول‌های ترانسفکت شده از جنتیسین استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های مختلف جنتیسین تیمار شدند و در نهایت غلظت بهینه به دست آمد. سپس سلول‌های ترانسفکت شده با غلظت بهینه جنتیسین(۱۲۰ ng) کشت داده شدند و در نهایت سلول‌های پایدار حاوی GFP-LC3 به دست آمد.



شکل ۵: ستون ۱؛ پلاسمید pUC19 به عنوان کنترل. ستون ۲؛ پلاسمید حاوی ژن LC3 . پلاسمید حاوی ژن LC3 نسبت به کنترل سنگین‌تر بوده و بالاتر قرار می‌گیرد.

القا و مهار اتوفاژی در سلول‌های MSC در حضور راپامایسین و ۳MA:

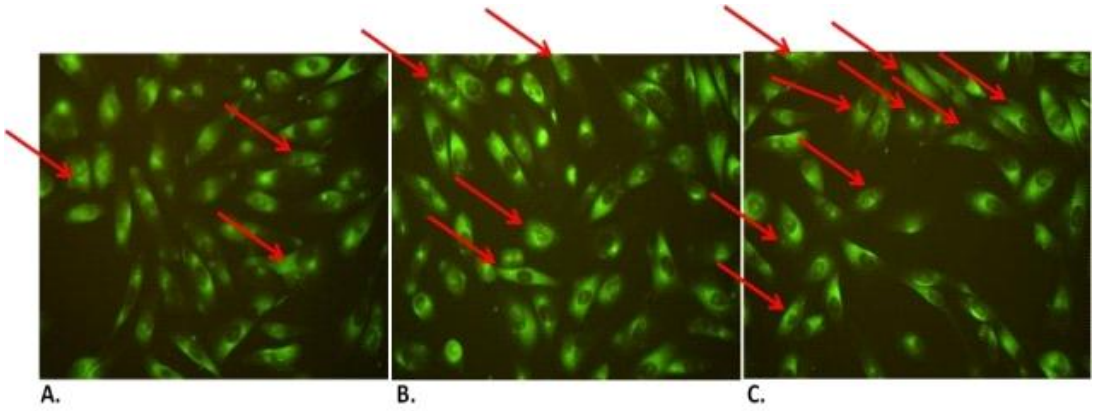
از آن جایی که راپامایسین به عنوان عامل القاکننده اتوفاژی و ۳MA از عوامل مهار کننده اتوفاژی است، در ابتدای امر برای به دست آوردن میزان بهینه شرایط القا و مهار اتوفاژی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت غلظت‌های مختلف عوامل فوق قرار گرفتند که نتایج به شرح زیر می باشد:



شکل ۶ : نقاط سبز رنگ در سلول‌های MSC پس از الحاق GFP با LC3 .

در حالت اول در سلول‌های بنیادی مزانشیمال کنترل

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

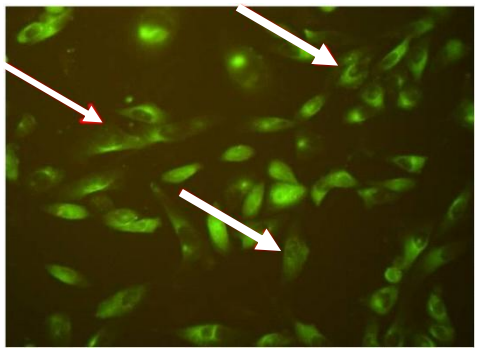


شکل۷: القای اتوفاژی با راپامایسین. A : سلول‌های MSC-GFP-LC3 در مواجهه با ۸ ng راپامایسین. B: سلول‌های MSC-GFP-LC3 در مواجهه با ۱۰ ng راپامایسین. C : سلول‌های MSC-GFP-LC3 در مواجهه با ۱۴ ng راپامایسین. فلش قرمز نشان‌دهنده سلول‌های دارای اتوفاژی است. با افزایش غلظت راپامایسین، اتوفاژی هم افزایش می‌یابد.

حاوی GFP-LC3 (بدون مهار یا القای اتوفاژی)، نقاط سبز رنگ کمی حدود ۱٪ (مشخص شده با فلش) مشاهده شد که مبین حضور اتوفاژی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشد. لازم به ذکر است در صورت عدم رخداد اتوفاژی، سلول‌ها به صورت یکنواخت سبز رنگ دیده می‌شوند و عدم وجود نقاط سبز رنگ(اتوفاگوزوم‌های حاوی LC3 نوع II) نشان‌دهنده عدم اتوفاژی است(شکل ۶).

در حالت دوم سلول‌های بنیادی مزانشیمال حاوی GFP-LC3 با غلظت‌های مختلف راپامایسین تیمار شدند. با القای اتوفاژی، درون سلول مناطقی به صورت نقاط سبز رنگ(نقطه نقطه) ایجاد می‌شود. مشاهده شد هر چه میزان (غلظت) ماده القاکننده بیشتر می‌شود، حضور و تعداد نقاط سبز رنگ(مشخص شده با فلش) در درون سلول هم فزونی می‌یابد که این امر مبین اتوفاژی بیشتر می‌باشد. لازم به ذکر است در سلول‌های کنترل(عدم حضور راپامایسین)، میزان نقاط سبز رنگ مشابه حالت اول بود (شکل ۷).

در حالت سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمال حاوی GFP-LC3 که با مهارکننده اتوفاژی(۳MA) تیمار شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند و مشاهده شد که تعداد نقاط سبز رنگ به شدت کاهش یافته و در حقیقت نقاط سبز وجود ندارد که مبین کاهش اتوفاژی در این سلول‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف ۳MA ، تاثیری در میزان مهار اتوفاژی نداشته و در واقع در غلظت‌های مختلف ۳MA ، اتوفاژی به میزان یکسان مهار می‌گردد. در سلول‌های کنترل میزان نقاط سبز رنگ بیشتر می‌باشد(شکل۸).



شکل ۸: مهار اتوفاژی با ۳MA . مواجهه سلول‌های MSC-GFP-LC3 با ۳MA منجر به کاهش اتوفاژی گردید.

نتایج بالا نشان داد که می‌توان از راپامایسین برای القا و ۳MA برای مهار اتوفاژی در سلول‌های بنیادی و بررسی اثر آن بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال استفاده کرد.

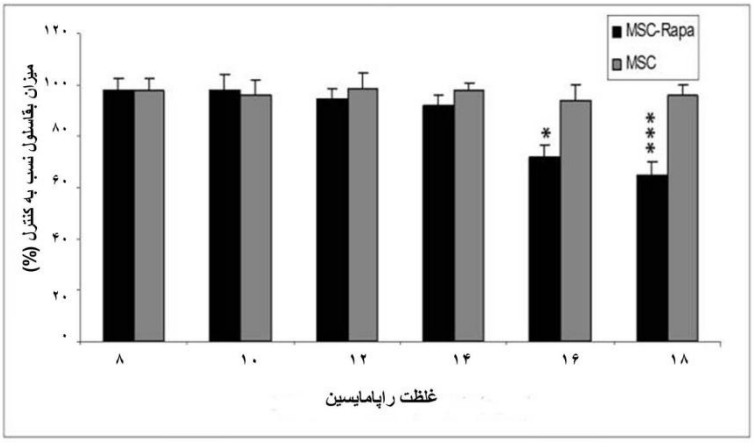
القای اتوفاژی و کاهش بقای سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو(H_2O_2):

با افزودن راپامایسین(به عنوان القاکننده اتوفاژی) با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

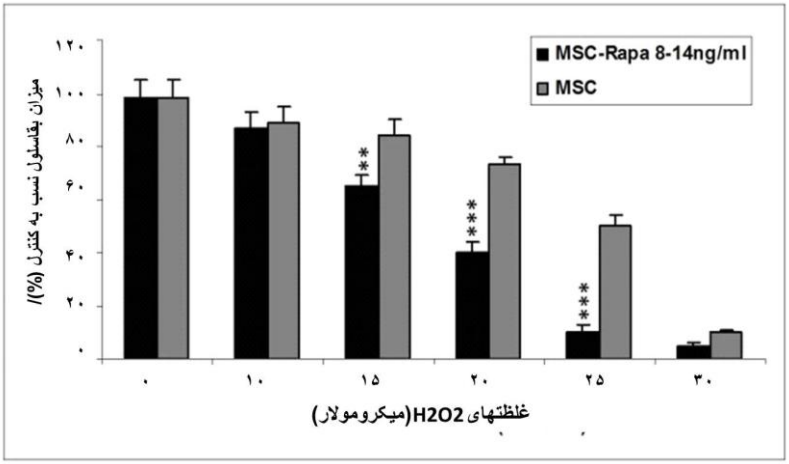
غلظت‌های مختلف به سلول‌های MSC ، مشاهده شد که غلظت‌های مختلف اتوفاژی به تنهایی، اثر چندانی بر مرگ و یا زنده ماندن سلول‌ها نداشت، البته غلظت بالای راپامایسین باعث مقدار مختصری مرگ در این سلول‌ها شد(منظور از غلظت بالای راپامایسین، غلظت ۱۶ ng/mL می‌باشد). میانگین و انحراف معیار سلول‌های کنترل و MSC تیمار شده با راپامایسین(غلظت۸ ng/m) حدود ۰/۹۸۴ ± ۹۸ و MSC تیمار شده با راپامایسین (غلظت ۱۸ ng/m) حدود ۱/۶۵ ± ۶۱/۹ بود. میانگین و انحراف معیار سلول‌های کنترل در تمامی غلظت‌ها تقریباً یکسان بود(نمودار ۱).

میزان مرگ سلولی با افزایش غلظت H_2O_2 به سلول‌های MSC که اتوفاژی در آن‌ها القا شده بود و کنترل(سلول‌هایی که هیچ القایی صورت نگرفته بود)، به طور چشمگیری افزایش پیدا کرد، البته میزان مرگ در سلول‌های MSC که در آن‌ها اتوفاژی القا شده بود، نمود بیشتری داشت(نمودار۲). همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود، درصد مرگ سلولی در مواجهه با H_2O_2 برای محدوده غلظت ng/mL ۱۴–۸ راپامایسین مشابه بود و در واقع کاهش بقای سلولی از غلظت H_2O_2 µM ۱۵به بالا



نمودار ۱: میزان بقای سلول‌های MSC در غلظت‌های ng/mL ۱۸، ۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰ و ۸ راپامایسین نسبت به حالت کنترل. غلظت‌های ng/mL ۱۴–۸ تاثیری در مرگ سلول نداشته و از غلظت‌های ng/mL ۱۶ به بالا، مرگ سلولی آغاز شد.

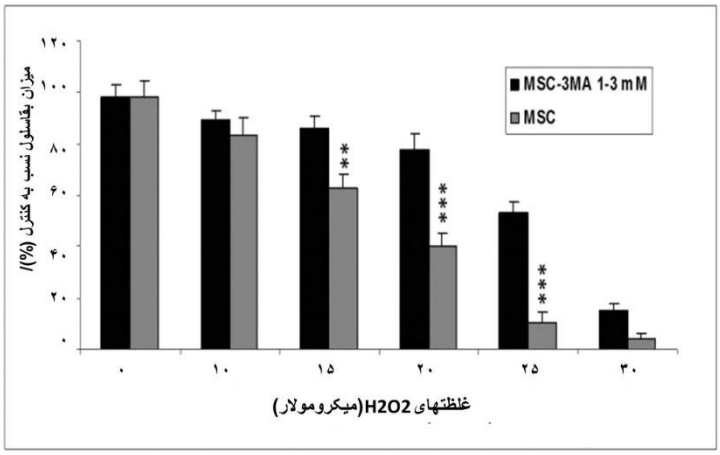
(Mean ± SD ، * : p< ۰/۰۵ ، *** : p< ۰/۰۱).



نمودار ۲: میزان بقای سلول‌های MSC در غلظت‌های ۱۴، ۱۲، ۱۰ و ng/mL ۸ راپامایسین پس از مواجهه با غلظت‌های متفاوت H_2O_2

(Mean ± SD ، *** : p< ۰/۰۰۱ ، ** : p< ۰/۰۱).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]



نمودار ۳: بقای سلول‌های MSC در غلظت MA ۳ ، ۳-۱ mM/mL پس از مواجهه با غلظت‌های متفاوت H_2O_2 . بقای سلولی در غلظت‌های ۱۵-۲۵ µM H_2O_2 در سلول‌های حاوی MA ۳ نسبت به کنترل بیشتر است.
(Mean ± SD ، *** : p< ۰/۰۰۱ ، ** : p< ۰/۰۱).

در سلول‌های تیمار شده با راپامایسین در مقایسه با کنترل به طور آشکاری نمایان گردید.

مهار اتوفاژی و افزایش بقای سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو(H_2O_2):

نتایج استفاده از محدوده غلظت ۳MA ۱-۳ mM/mL (به عنوان مهارکننده اتوفاژی) به سلول‌های MSC ، نشان داد که مهار اتوفاژی در سلول‌ها هیچ گونه تاثیری بر روند طبیعی مرگ سلولی نداشت. علاوه برآن، کاهش قابل ملاحظه روند مرگ سلولی در سلول‌های MSC تیمار شده با ۳MA در مواجهه با غلظت‌های مختلف H_2O_2 ، از جمله نکات حایز اهمیت بود. در واقع مهار اتوفاژی با ۳MA در سلول‌های بنیادی، منجر به مقاوم‌سازی سلول‌ها به شرایط اکسیداتیو- استرس گردید(نمودار۳).

بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSCs) به عنوان یک منبع سلولی بسیار مهم و ایده‌آل در رابطه با پیوند شناخته می‌شوند، از سال ۱۹۹۹ وقتی برای اولین بار ماکینو و همکارانش در آزمایش‌های *in vitro* ، ظرفیت تمایزی MSCs به سلول‌های عضله قلبی (کاردیومیوسیت‌ها) را گزارش کردند، تحقیقات در زمینه سلول درمانی و مهندسی بافت به طرز شگفت‌انگیزی توسعه پیدا کرده است(۶). مهم‌ترین مساله‌ای که در درمان با این سلول‌ها وجود دارد، مرگ اغلب این سلول‌ها در مدت کوتاهی پس از پیوند می‌باشد که موجب شده کارآیی پیوند بسیار پایین‌تر از حد انتظار باشد(۷). در این رابطه، توما و همکارانش گزارش کردند، کمتر از ۰/۴۴٪ از MSCs در طی ۴ روز بعد از پیوند به قلب موش‌های SCID ، بقای مطلوبی داشتند(۸). عوامل گوناگونی در مرگ زودرس سلول‌های MSC در ریز محیط پیوندی نقش دارند. در همین رابطه ژو و همکارانش در طی مطالعاتشان نشان دادند که استرس‌های اکسیداتیو و آسیب ایسکمی(فقر غذایی به همراه هایپوکسی)، از دلایل اصلی مرگ زودرس سلول‌های MSC در روزهای ابتدایی پس از پیوند می‌باشند(۹).

در این پژوهش برای اولین بار اثر اتوفاژی بر روی بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط نامطلوب ریز محیط پیوندی، بررسی گردید. اتوفاژی به عنوان یک فرآیند حیاتی در سلول شناخته می‌شود که در تکامل زیستی، سیستم ایمنی و مرگ سلولی نقش ایفا می‌کند و نیز در خصوص اختلالات کشنده‌ای از قبیل تحلیل سیستم عصبی، بیماری‌های خود ایمنی و انواع سرطان‌ها تاثیرگذار می‌باشد. اتوفاژی دارای عملکردی دوگانه است، از یک طرف باعث افزایش مدت و میزان بقای سلول و از طرف

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

دیگر در مراحل پیشرفته باعث مرگ سلول می‌شود (۱۰).

به طور کلی تاکنون در خصوص نقش اتوفاژی در فرآیند مرگ سلولی توافقی حاصل نشده است و ناهمگونی در نتایج بسیاری از مطالعه‌ها، بحث‌برانگیز بوده است.

استرس‌های اکسیداتیو و هم‌چنین فقر سرمی و هایپوکسی که از عوامل اصلی در مرگ زودرس سلول‌های MSC در ریز محیط پیوندی می‌باشند، اتوفاژی را القا می‌کنند. در تایید این موضوع ماتسو و شرز شوال نشان دادند که استرس‌های اکسیداتیو، فقر غذایی، میتوکندری با عملکرد ناقص و هم‌چنین استرس‌های رتیکولوم اندوپلاستیک، می‌توانند باعث القای اتوفاژی شوند(۱۲، ۱۱).

پلیکانو و همکارانش نشان دادن که تحت شرایط اکسیداتیو، ROS ها که شامل رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید(O_2–)، رادیکال‌های هیدروکسیل(OH–) و پر اکسید هیدروژن(H_2O_2) می‌باشند، به مقدار زیادی تولید شده و آسیب‌های جدی به سلول زده و اغلب باعث مرگ سلول می‌شوند(۱۳).

یو و همکارانش در طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که مرگ سلولی در اثر استرس‌های اکسیداتیو، توسط آپوپتوز و به واسطه کاسپازها صورت می‌گرفت. با مهار کاسپاز هم‌چنان تجزیه کاتالاز و افزایش ROS ها ادامه داشت و باعث مرگ سلولی می‌شد و نشان دادند این مرگ سلولی توسط اتوفاژی صورت می‌گرفت(۱۴).

در این مطالعه اتوفاژی به منظور افزایش مقاومت و بقای سلول‌های MSC در جهت افزایش کارآیی و بهبود عملکرد این سلول‌ها بعد از پیوند، مورد بررسی قرار گرفت در نتیجه مطابق اهداف یاد شده، اتوفاژی در سلول‌های MSC در *in vitro* پس از مواجهه با غلظت‌های کشنده H_2O_2 ، القا و مهار شد و در ادامه میزان بقای سلولی به طور کمی با آزمایش MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت.

در آزمایش‌هایی که انجام شد، نتایج حاکی از این بود که مهار اتوفاژی در سلول‌های MSC می‌تواند موجب افزایش مقاومت این سلول‌ها در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو(H_2O_2) شده و بقای سلولی را به میزان قابل توجهی، در مقایسه با حالت کنترل(سلول‌های MSC در حالت معمولی) و در حالتی که اتوفاژی در سلول‌های MSC القا می‌شود، بهبود بخشد. در ارتباط با مهار اتوفاژی و اثر آن، چن و همکارانش برای اولین بار نشان دادند که سل لاین‌های Hek 293 ، U87 و Hela زمانی که تحت مقادیر مختلف H_2O_2 قرار گرفتند، مرگ سلولی ایجاد شد و با مهار اتوفاژی نشان دادند که میزان کشندگی H_2O_2 بدون مهار آپوپتوز بسیار کاهش یافت. اما این میزان کشندگی با مهار آپوپتوز بدون مهار اتوفاژی تغییری نکرد(۱۵).

هم‌چنین در ارتباط با اثر مهار و القای اتوفاژی بر سلول‌های مختلف، کواهارا و همکارانش در طی مطالعه‌هایی نشان دادند که با القای اتوفاژی به وسیله راپامایسین، سلول‌های سرطانی که به اشعه مقاوم بودند، حساس شده و زودتر می‌مردند و به درمان با اشعه پاسخ بهتری می‌دادند و نیز نشان دادند که با مهار اتوفاژی به وسیله ۳MA ، سلول‌های توموری نسبت به اشعه در رادیوتراپی مقاومت بیشتری نشان می‌دهند(۱۶).

آزاد و همکارانش هم ثابت کردند که در سلول‌های سرطانی سینه وگلیوما(glioma)، هایپوکسی با واسطه اتوفاژی باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. هم‌چنین نشان دادند که اتوفاژی در پیشرفت سرطان پروستات هم نقش دارد(۱۷). کازاوا و همکارانش نشان دادند داروهای شیمیایی مانند آرسنیک تری‌اکسید یا داروهای سرکوب‌کننده تومور، با القای مسیر اتوفاژی منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند و بدین صورت درمان صورت می‌گیرد(۱۸). لین و همکارانش نشان دادند که مهار اتوفاژی باعث مقاومت بیشتر سلول‌های سرطانی پاپیلاری تیروئید به رادیوتراپی می‌شود، در حالی که القای اتوفاژی ممکن است در درمان این نوع سرطان و کشتن سلول‌های سرطانی مقاوم به درمان‌های متداول مفید باشد(۱۹).

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش‌های ما نشان می‌دهد که مهار اتوفاژی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال ممکن است بتواند یک سیستم دفاعی قوی برای این سلول‌ها در برابر آسیب‌های وارده در شرایط *in vivo* و *in vitro* فراهم کند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

تشکر و قدردانی

ایـن تحقیـق حاصـل پایـان‌نامـه کارشناسـی ارشـد هماتولوژی مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشـی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از مرکـز تحقیقات انتقال خون و مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشـی طب انتقال خون که در انجام این پروژه ما را یاری نمودنـد کمال تشکر را داریم.

References:

1- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. Clin Orthop Relat Res 1980; (151): 294-307.
2- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, *et al*. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. Ann Thorac Surg 2002; 73(6): 1919-25; discussion 1926.
3- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, *et al*. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med 2003; 9(9): 1195-201.
4- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, *et al*. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. Nature 2009; 460(7253): 392-5.
5- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al*. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J 2000; 19(21): 5720-8.
6- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, *et al*. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999; 103(5): 697-705.
7- Haider HKh, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation. J Mol Cell Cardiol 2008; 45(4): 554-66.
8- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105(1): 93-8.
9- Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, Grounds MD. Why do cultured transplanted myoblasts die *in vivo*? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. Cell Transplant 2000; 9(4): 489-502.
10- Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene 2004; 23(16): 2891-906.
11- Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, *et al*. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. Circ Res 2007; 100(6): 914-22.
12- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO J 2007; 26(7): 1749-60.
13- Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat 2004; 7(2): 97-110.
14- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, *et al*. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(13): 4952-7.
15- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. Cell Death Differ 2008; 15(1): 171-82.
16- Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar MH, Fukumoto M, Shimura T, *et al*. Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. Cell Death Dis 2011; 2: e177.
17- Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, *et al*. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. Autophagy 2008; 4(2): 195-204.
18- Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. Oncogene 2005; 24(6): 980-91.
19- Lin CI, Whang EE, Abramson MA, Jiang X, Price BD, Donner DB, *et al*. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. Autophagy 2008; 4(2): 195-204.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10 (1): 40-52

Original Article

Role of autophagy as a survival factor in MSCs following exposure to oxidative stress

Hosseini A.[1], Halabian R.[2], Hamedi Asl P.[1], Bashiri Nahanji H.[1], Jalili M.A.[1], Heydari M.[1], Amiri zade N. [1], Habibi Roudkenar M.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Previous studies have showed that a large percentage of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) die in the early stages of transplantation due to oxidative streeses, hypoxia, and serum deprivation. Hence, this study was aimed to address whether induction or inhibition of autophagy would affect the viability of MSCs after exposure to oxidative stress.

Materials and Methods

In this descriptive study, MSCs were isolated from bone marrow with ficol and density gradient method; the fourth passage MSCs were selected in the study. Autophagy was detected by using transfection of GFP-LC3 to MSCs. Induction and inhibition of autophagy were performed by using rapamycin and 3MA, respectively. MSCs were exposed to lethal doses of H_2O_2 followed by cells viability evaluated with MTT assay.

Results

Our results revealed that the enhancement of autophagy in MSCs sensitized them against oxidative stress and inhibition of autophagy led to resistance against oxidative stress in comparison with the control cells.

Conclusions

Inhibition of autophagy using non genetic engineering method in MSCs enhances cell viability following exposure to the oxidative stress. This may provide a novel strategy to promote the efficiency of cell therapies following transplantation in the future.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Autophagy, Oxidative Stress, Cell Hypoxia, Rapamycin

Received: 7 May 2012
Accepted: 23 Sep 2012

Correspondence: Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *roudkenar@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]