خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۳ پاییز ۹۲ (۲۶۶-۲۵۵)

مقاله پژوهشی

پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال با غلظت‌های بهینه H_2O_2 به منظور افزایش بقای سلولی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های اکسیداتیو

حامدبشیری نهنجی[۱]، مهریارحبیبی رودکنار[۲]، راحله حلبیان[۳]، مهدی جلیلی[۴]، محمدعلی جلیلی[۵]

چکیده

سابقه و هدف

مطالعه‌ها بر روی سلول‌های مزانشیمال پیوندی نشان داده‌اند که شرایط نامساعد محیط بافت از جمله حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایتوکاین‌های التهابی، قسمت اعظم آن‌ها را در روزهای ابتدایی پس از پیوند از بین می‌برد. به منظور رفع این مشکل، در این مطالعه اثر پیش‌شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با H_2O_2 به منظور افزایش مقاومت آن‌ها در برابر شرایط اکسیداتیو کشنده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از فایکول جداسازی و پاساژ چهارم انتخاب شد. سلول‌های پاساژ چهارم با غلظت‌های مختلف H_2O_2 طی زمان‌های متفاوت، مجاور و انکوبه شدند. سپس سلول‌ها ریکاور شده و در شرایط معمول کشت سلول قرار گرفتند. در نهایت سلول‌های پیش شرطی شده تحت شرایط کشنده قرارگرفتند. پس از انجام این مراحل، میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام مراحل پیش شرطی و القای آپوپتوز، به منظور بررسی تاثیر پیش‌شرطی کردن در قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی و بنیادی بودن آن‌ها، سلول‌های پیش شرطی شده، به رده سلولی استئوسیت تمایز داده شدند.

یافته‌ها

نتایج نشان دادند که پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمی با H_2O_2 موجب افزایش بقا و مقاومت آن‌ها در برابر استرس‌های اکسیداتیو کشنده در مقایسه با سلول‌های کنترل پیش شرطی نشده، می‌شود بدون این که تاثیر منفی در قابلیت تمایز آن‌ها داشته باشد.

نتیجه گیری

پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با غلظت‌های بهینه H_2O_2، بقای آن‌ها را در برابر استرس‌های اکسیداتیو افزایش داده و ممکن است منجر به پیشبرد کارایی درمان سلولی شود.

کلمات کلیدی: H_2O_2 ، پیش شرطی کردن ایسکمیک، آپوپتوز، سلول‌های استرومال مزانشیمی چند قوه

تاریخ دریافت : ۹۱/ ۶/۱۹
تاریخ پذیرش : ۹۱/۱۱/۲۳

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی ـ مربی مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران
۴- دکترای عمومی دامپزشکی ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ـ کرج ـ ایران
۵- مؤلف مسؤول: PhD شیمی‌دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSCs)، سلول‌های استرومایی غیر هماتوپوئتیک هستند که قادر به تمایز و شرکت در بازسازی بافت‌های مزانشیمال از قبیل استخوان، غضروف، عضله و چربی می‌باشند(۱). امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمال به یک هدف امید بخش در خصوص سلول درمانی و ژن درمانی برای بیماری‌های مختلف و نیز مهندسی بافت تعدیل شده‌اند. به عنوان مثال در زمینه پیوند سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک(HSC)، سلول‌های بنیادی مزانشیمال موجب پیشرفت و بهبود پیوند HSCs و تسریع در بازسازی بافت خونساز می‌شوند. هم چنین با توجه به قابلیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی، موجب درمان GVHD حاد می‌گردند. با این وجود به علت شرایط زیان بار محیط گیرنده پیوند از جمله نبود اکسیژن، فقر غذایی و نبود عروق تغذیه‌کننده، وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن، افزایش سایتوکاین‌های التهابی و عوامل دیگر، همگی باعث مرگ زودرس قسمت اعظم این سلول‌ها در روزهای ابتدایی پس از پیوند می‌شوند که به موجب آن میزان کارایی درمان سلولی بسیار پایین‌تر از حد انتظار است(۲). بنابراین لازم است برای افزایش کارایی درمان مؤثر، راه‌کاری ارایه شود تا سلول‌های بنیادی را در برابر این شرایط سخت مقاوم کرده و مدت بقای این سلول‌ها را در محیط پیوند افزایش دهد. برای نیل به این هدف، مطالعه‌های زیادی در خصوص دست‌ورزی ژنتیکی MSCs به وسیله ژن‌های بقا و ضد آپوپتوزی و دیگر عوامل انجام شده ولی به علت خطر جهش‌زایی، از دیدگاه ایمن بودن این روش هنوز مورد تردید است و کاربرد بالینی پیدا نکرده است. یکی از روش‌هایی که در طی چند سال اخیر توجه بسیار ویژه‌ای به آن شده است، استفاده از پیش شرطی کردن (preconditioning) می‌باشد که اثرات بسیار سودمندی در محافظت سلولی دارد(۳).

در پیش شرطی کردن از عوامل مختلفی می‌توان استفاده کرد، از قبیل فاکتورهای رشد، عوامل استرس‌زا مانند H_2O_2، هیپوکسی، لیپوپلی ساکارید (LPS) و شوک حرارتی، انواع سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، مواد دارویی و دیگر موارد که سودمندی هر کدام از آن‌ها در رده‌های سلولی مختلف به منظور سلول درمانی به اثبات رسیده است. در این روش سلول را با غلظت‌های بهینه عوامل مختلف مانند H_2O_2 یا فقر غذایی، به طور دوره‌ای مواجه می‌کنند که باعث می‌شود بیان ژن‌های بقا و محافظت‌کننده سلولی در سلول افزایش یابد، سلول را در برابر عوامل زیانبار در محیط پیوند حفظ کنند و بقای سلول پیوندی به میزان زیادی افزایش یابد که در نتیجه آن کارایی پیوند سلول بنیادی به میزان بسیار زیادی افزایش می‌یابد. یکی از مزیت‌های مهم این روش، ایمن بودن آن است که در آن سلول بنیادی از نظر ژنتیکی دست‌ورزی نمی‌شود و این که می‌توان این روش را بدون خطر در طب بالینی نیز استفاده کرد. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته، در این مطالعه از پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال با غلظت‌های بهینه H_2O_2، به عنوان یک استراتژی درمانی جدید و ایمن با هدف افزایش بقای MSCs پس از مواجهه با استرس‌های اکسیداتیو کشنده استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده جهت بررسی‌های فلوسایتومتریک شامل؛

CD 105-PE ، CD 73 (ALCAM)-PE ، CD 44-FITC ، CD 90-FITC ، CD 34-FITC و CD 271-FITC (داکو ـ دانمارک) بودند.

تهیه غلظت‌های مختلف H_2O_2:

مولاریته استوکی که برای تهیه غلظت‌های مختلف H_2O_2 مورد استفاده قرار گرفت، برابر ۸/۸ M بود. غلظت‌هایی که برای پیش شرطی کردن مورد نیاز بودند به صورت میکرومولار بودند. بنابراین این استوک باید با استفاده از PBS (بافر نمکی) رقیق می‌شد تا به غلظت‌های مورد نظر می‌رسید.

تهیه محلول تریپان بلو ۰/۴٪ :

۴ میلی‌گرم پودر تریپان بلو را در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر

www.SID.ir

حل نمودیم. محلول تهیه شده از صافی عبور داده شد و برای ممانعت از رشد قارچ‌ها، چند قطره سدیم آزاید به محلول اضافه گردید.

تهیه محلول MTT:

۵ میلی‌گرم از پودر Thiazolyl blue tetrazolium bromide را در ۱ میلی‌لیتر PBS حل نمودیم.

کشت سلولی:

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آسپیراسیون مغز استخوان یک اهداکننده سالم(با کسب رضایت)، به وسیله متخصص مربوطه در مرکز خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی گرفته شد و بعد از انتقال نمونه به لوله‌های حاوی ضد انعقاد هپارین، تحت شرایط استریل در درجه حرارت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات انتقال خون ایران منتقل شد. به طور خلاصه، سلول‌های تک هسته‌ای که سلول‌های مزانشیمی نیز جزو این دسته از سلول‌ها هستند، با استفاده از فایکول(سوئد، آمرشام بیوساینس) و روش گرادیانت غلظت جداسازی و در محیط کشت اختصاصی DMEM-Low Glucose (آمریکا، سیگما) با ۱۰٪ FBS (آمریکا، اینویتروژن)، ۱٪ پنی‌سیلین و ۱٪ استرپتومایسین(ایران، سیناژن) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند.

دو روز پس از کشت اولیه، سلول‌های غیر چسبنده به وسیله تعویض محیط کشت حذف شدند اما سلول‌های مزانشیمی به کف فلاسک چسبیدند. در نهایت MSCs حاصل از پاساژ چهارم جهت مطالعه مورد نظر فراهم شدند. به منظور تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده در مراحل قبل، پس از رشد سلول‌ها در محیط کشت اختصاصی، خصوصیات مورفولوژیکی(شکل ظاهری) سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس و هم چنین حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال به وسیله فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین شاخص‌های سطحی MSCs به وسیله فلوسایتومتری:

ابتدا MSCs را با PBS (آمریکا، اینویتروژن) شستشو داده و پس از تریپسینه کردن به فالکن منتقل شدند و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. پس از سانتریفوژ کردن، مایع رویی را دور ریخته و به ازای هر ۱۰۴-۱۰۳ سلول در هر میکرولیتر محیط، ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مربوطه افزوده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر محلول پارافرمالدئید به محلول حاوی سلول و آنتی‌بادی اضافه شد و نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری آنالیز گردید.

مراحل پیش شرطی‌کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال با H_2O_2:

ابتدا در ۲ پلیت ۹۶ خانه‌ای، تعداد ۱۲۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت ریخته و به محیط کشت DMEM Low Glucose حاوی ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک اضافه شد. سپس پلیت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 دار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از این مدت تعدادی از سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ µM از ماده H_2O_2 مجاور شده و مابقی سلول‌ها به عنوان کنترل باقی ماندند. پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند تا زمان انکوباسیون را طی کنند. یکی از پلیت‌ها به مدت ۱۲ ساعت و پلیت دیگر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌ها ریکاور شده و در نهایت تحت شرایط کشندگی(غلظت‌های ۵۰۰ µM و ۳۰۰ µM از ماده H_2O_2) قرار گرفتند.

سنجش درصد بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT:

پس از اتمام مراحل پیش شرطی کردن و القای آپوپتوز، محیط چاهک‌ها خارج شد و ۱۵ میکرولیتر MTT (آمریکا، سیگما) به همراه ۹۰ میکرولیتر ار محیط DMEM Low Glucose بر روی سلول‌های موجود در هر چاهک اضافه و پلیت حاوی سلول‌ها و MTT به مدت ۲ ساعت در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 و دور از نور نگهداری شد. سپس ۹۰ میکرولیتر از محیط چاهک‌ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (آلمان، مرک) به همراه ۲۵

Archive of SID
www.SID.ir

میکرولیتر از بافر سورنسن به هر چاهک اضافه شد. در نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

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

تمایز سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی با H_2O_2 قرار گرفته بودند، به رده‌های سلولی استخوان (اوستئوبلاست)، بررسی میزان تاثیر پیش شرطی کردن بر روی قدرت تمایز سلول‌های MSC با استفاده از کیت‌های تمایز سلولی و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بر روی سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی کردن قرار گرفته بودند و سلول‌های کنترل(MSC معمولی) انجام شد.

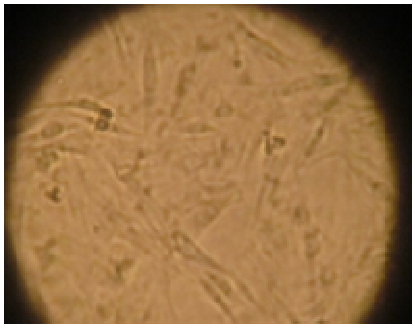
تمایز سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی با H_2O_2 قرار گرفته بودند، به رده سلولی چربی(آدیپوسیت):

پس از طی مراحل پیش شرطی کردن در MSCs این سلول‌ها به همراه سلول‌های MSC معمولی، با استفاده از روش‌های ذکر شده، به رده سلولی چربی تمایز داده شدند، پس از ۷ روز رنگ‌آمیزی با ۱٪ HCS LipidTOXTM Green Neutral Lipid صورت گرفت.

یافته‌ها

تایید حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و دستگاه فلوسایتومتری:

پس از جداسازی سلول‌ها و کشت در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از لحاظ مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جدا شده از لحاظ مورفولوژی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمال بودند(شکل ۱). پس از مشاهدات میکروسکوپی، حضور آنتی‌بادی‌های موجود در سطح سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وجود مارکرهای سطحی CD105 ، CD29 و CD73 و عدم حضور مارکرهای CD45 ، CD31 و CD34 تاییدکننده سلول‌های مزانشیمال می‌باشد(شکل ۲).



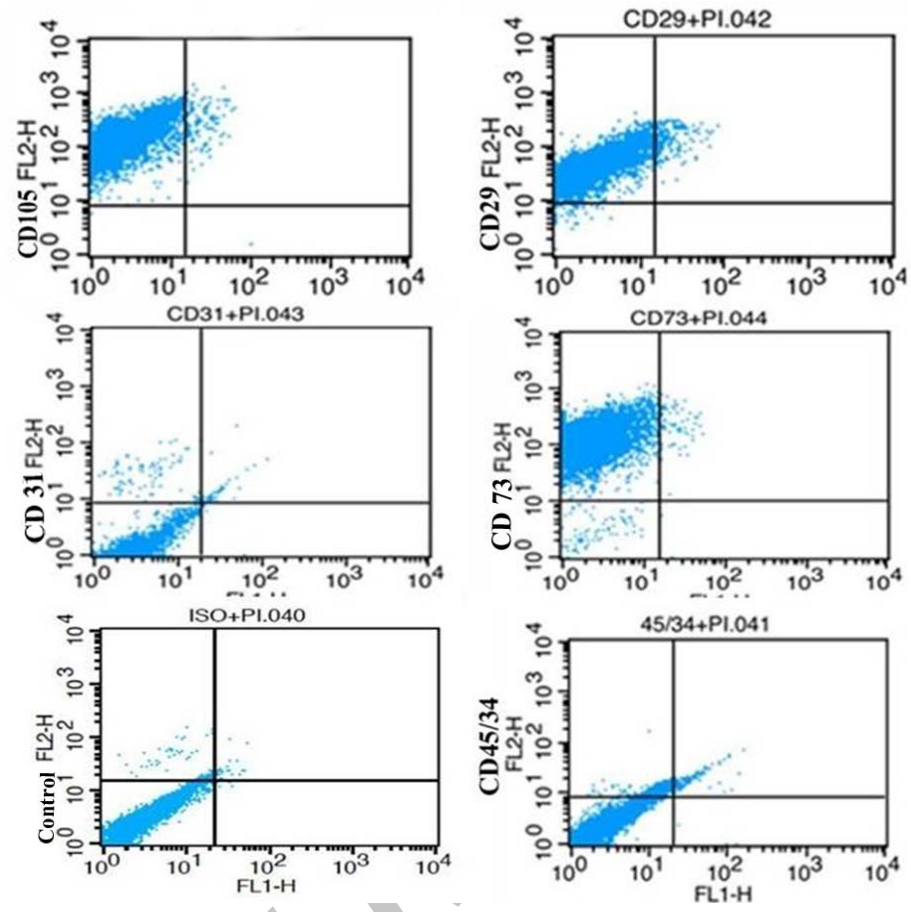
شکل ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده از مغز استخوان سلول‌ها پس از گذشت ۷ روز از پاساژ اول

ارزیابی کاهش مرگ سلولی در سلول‌های پیش شرطی شده با H_2O_2 با استفاده از تریپان بلو و MTT:

به منظور تعیین میزان سلول‌های زنده بعد از قرار گرفتن تحت شرایط کشندگی، سلول‌ها با تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی شدند(جدول ۱).

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بقای سلول‌هایی که با محدوده غلظت بین ۱۵-۵ µM از H_2O_2 پیش‌شرطی شده بودند، در مقایسه با سلول‌های کنترل (بدون پیش شرطی) در مواجهه با دوز کشندگی ۳۰۰ µM و ۵۰۰µM از H_2O_2 ، تقریباً به طور متوسط به میزان چهار برابر افزایش یافت. لازم به ذکر است که هیچ گونه تفاوتی در نتایج به دست آمده از انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت با انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و هم چنین نتایج حاصل از کشندگی سلول‌ها با غلظت ۳۰۰ µM و ۵۰۰ µM از H_2O_2 ، مشاهده نشد. اما از غلظت‌های ۵۰۰µM H_2O_2 به بالا، میزان مرگ در سلول‌های پیش شرطی شده و سلول‌های کنترل یکسان بوده و بیش از ۸۰٪ سلول‌ها دچار مرگ شدند. هم چنین میزان بقای سلولی پس از پیش شرطی کردن با H_2O_2 با آزمایش MTT بررسی شد(نمودار ۱). درصد بقای سلول‌های پیش شرطی شده با غلظت‌های ۵ ، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار H_2O_2 در قایسه با سلول‌های کنترل، به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. میانگین و انحراف معیار سلول‌های کنترل و MSC تیمار شده حدود ۱/۰۴ ± ۹۸ بود.

Archive of SID
www.SID.ir



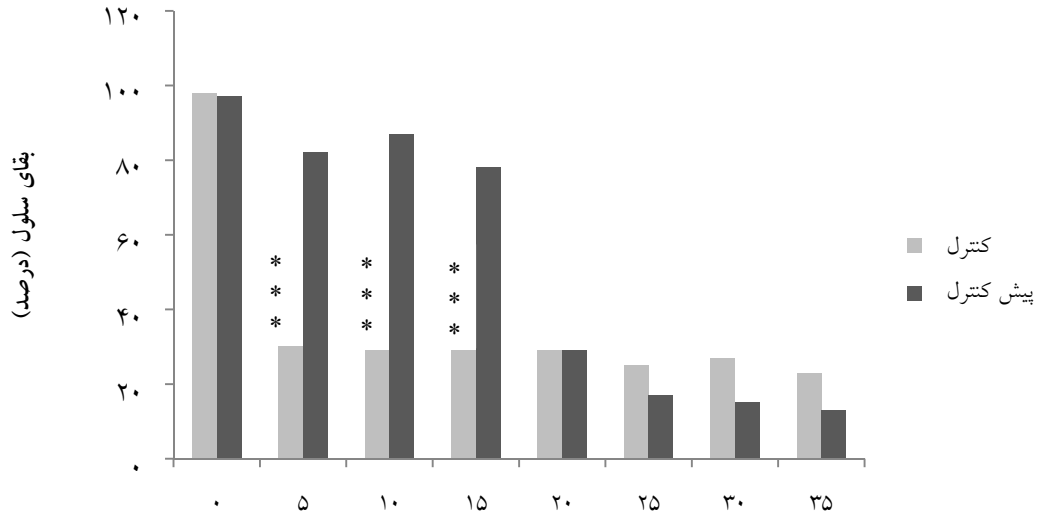
شکل ۲: بررسی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال. وجود مارکرهای سطحی CD105 ، CD29 و CD73 و عدم حضور مارکرهای CD45، CD31 و CD34 تاییدکننده سلول‌های مزانشیمال می‌باشد.

جدول ۱: بررسی میزان مرگ سلول پس از تیمار با H_2O_2 با استفاده از تریپان‌بلو

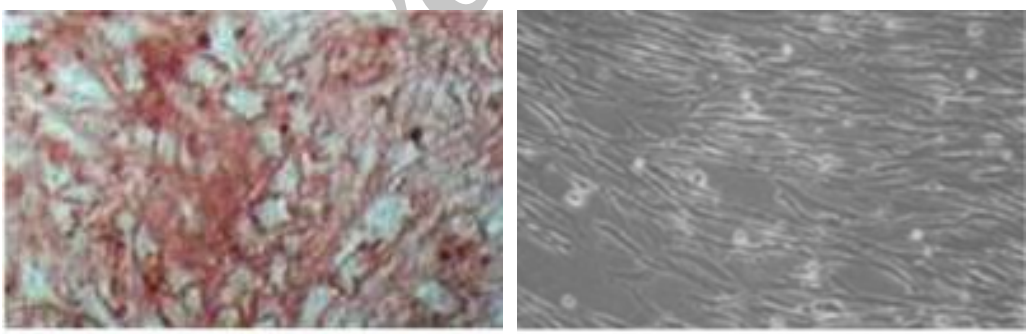
غلظت‌های پیش‌شرطی H_2O_2 (بر حسب µM)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰
درصد سلول‌های مرده در سلول‌های پیش‌شرطی شده*	۲ ± ۰/۵	٪۱۵ ± ۰/۸۹	٪۱۲ ± ۰/۵	٪۱۸ ± ۱/۵	۶۸ ± ۲/۵	٪۸۵ ± ۲/۳
درصد سلول‌های مرده در سلول‌های کنترل*	۲ ± ۰/۵	٪۷۹ ± ۰/۳۴	٪۷۸ ± ۰/۳۷	٪۷۹ ± ۰/۲۵	٪۷۸ ± ۰/۳۰	٪۸۰ ± ۰/۴۵

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بقای سلول‌هایی که با محدوده غلظت بین µM ۱۵-۵ از H_2O_2 پیش شرطی شده بودند در مقایسه با سلول‌های کنترل(بدون پیش شرطی) در مواجهه با دوز کشندگی µM ۳۰۰ و ۵۰۰µM از H_2O_2 تقریباً به طور متوسط به میزان چهار برابر افزایش یافت.

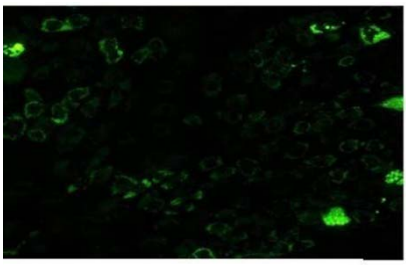
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۱: میزان بقای سلول با استفاده از MTT : محور افقی نشان‌دهنده غلظت‌های پیش‌شرطی H_2O_2 و محور عمودی درصد بقای سلول است. میزان دوز کشندگی ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت. Mean ± SD ، (p< ۰/۰۰۱ : *) همان طور که در نمودار مشخص است درصد بقای سلول‌های پیش‌شرطی‌شده با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار H_2O_2 در مقایسه با سلول‌های کنترل(در همان غلظت‌ها) به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. میانگین و انحراف معیار سلول‌های کنترل و MSC تیمارشده حدود ۱/۰۴ ± ۹۸ بود.**



A: کنترل **B: تمایز به رده استخوانی**



C: تمایز به رده چربی

شکل ۳: تمایز سلولی. پس از طی مراحل پیش شرطی با H_2O_2 ، سلول‌های پیش شرطی شده از نظر قابلیت تمایز به رده استخوانی مورد ارزیابی قرار گرفتند که همان گونه که در تصویر مشخص است، پیش شرطی کردن MSCs تغییری در روند تمایز سلولی نداشته و این سلول‌ها به سلول‌های رده مورد نظر تمایز پیدا کردند.

www.SID.ir

نتایج تمایز سلول‌های MSC و سلول‌های MSC پیش‌شرطی شده با H_2O_2 ، به رده سلولی استخوان (اوستئوبلاست):

پس از طی مراحل پیش شرطی کردن در سلول‌های MSC ، این سلول‌ها به همراه سلول‌های MSC معمولی، با استفاده از روش‌های ذکر شده، به رده سلولی استخوانی تمایز داده شدند و پس از ۲۱ روز، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد S ۲٪ صورت گرفت. نتایج بیانگر آن است که سلول های MSC که تحت مراحل پیش شرطی قرار گرفتند، همانند سلول‌های کنترل می‌توانند به رده سلولی استخوانی تمایز یابند و پیش شرطی کردن تغییری در خاصیت تمایزی سلول‌های MSC به رده استخوانی ایجاد نمی‌کند(شکل ۳). نتایج تمایز سلول‌های MSC و سلول‌های MSC پیش شرطی شده با H_2O_2 ، به رده‌های سلولی چربی (آدیپوسیت) و غضروف پس از طی مراحل پیش شرطی کردن در MSCs این سلول‌ها به همراه سلول‌های MSC معمولی، با استفاده از روش‌های ذکر شده، به رده سلولی چربی تمایز داده شدند، پس از ۷ روز رنگ‌آمیزی HCS ۱٪ LipidTOXTM Green Neutral Lipid صورت گرفت. نتایج بیانگر آن است که سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی قرار گرفتند، همانند سلول‌های کنترل می‌توانند به رده چربی تمایز یابند. به عبارت دیگر پیش شرطی کردن تاثیری در خاصیت چند ظرفیتی بودن MSC ندارد و احتمالاً بیانگر کاربردی بودن این سلول‌ها برای مطالعه‌های *in vivo* می‌باشد.

بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان یک هدف امید بخش در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی برای بیماری‌های مختلف و نیز مهندسی بافت مطرح شده‌اند و اخیراً در تعدادی از موارد از جمله پیوند، کاربردهای بالینی از آن گزارش شده است. به طوری که در سال ۱۹۹۹ وقتی برای اولین بار ماکینو و همکارانش در آزمایش‌های *in vitro* ظرفیت تمایزی MSCs به سلول‌های عضله قلبی (کاردیومیوسیت‌ها) را گزارش کردند، به یک باره تحقیقات در زمینه سلول درمانی و مهندسی بافت به طرز شگفت‌انگیزی توسعه پیدا کرد(۴). در همین راستا مطالعه‌های دیگری ظرفیت تمایزی MSCs مغز استخوان را در *in vitro* و *in vivo* به سلول‌های عصبی، سلول‌های عضله اسکلتی و کاردیومیوسیت‌ها نشان دادند(۸-۵). با این وجود سلول‌های بنیادی پیوندی نمی‌توانند در محیط ایسکمیک پیوند که سرشار از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایتوکاین‌های التهابی می‌باشد، به مدت زیادی دوام بیاورند و در همان روزهای ابتدایی قسمت اعظم سلول‌های بنیادی دچار مرگ سلولی می‌شوند که کارایی‌شان را در درمان سلولی بسیار محدود می‌کند(۹). 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 مطلوب را داشتند(۱۰). هم چنین کو و همکارانش اشاره داشتند که بیش از ۹۳٪ از میوبلاست‌های عضله اسکلتی، ۲ روز بعد از پیوند دچار مرگ سلولی می‌شوند(۱۱). هم چنین در مطالعه‌ای بر روی انسان، پاگانی و همکارانش گزارش کردند در پیوند اتولوگ میوبلاست‌های عضله اسکلتی به قلب ایسکمیک بیماران، کمتر از ۱٪ سلول‌های پیوندی زنده بودند(۱۲).

عوامل متعددی در مرگ زودرس MSCs در ریز محیط پیوندی نقش دارند. در همین رابطه ژو و همکارانش در طی آزمایشاتی به این نتیجه رسیدند که استرس‌های اکسیداتیو و آسیب ایسکمی(فقر غذایی به همراه هایپوکسی) از دلایل اصلی آپوپتوز MSCs در روزهای ابتدایی پس از پیوند می‌باشند(۱۳). با این وجود هاگتز علاوه بر استرس‌های اکسیداتیو و آسیب ایسکمی، پاسخ‌های التهابی و ایمنی موضعی را نیز از دلایل اصلی مرگ زودرس سلول‌های پیوندی می‌دانست(۱۴). با توجه به اهمیت موضوع، M ژانگ و روبی در پایان مطالعه‌های‌شان به این نتیجه رسیدند که عامل موفقیت در افزایش کارایی پیوند MSCs ، در ارتباط با ظرفیت بقای MSCs و نیز مقاومت‌شان به عوامل آسیب‌رسان موجود در ریز محیط پیوندی می‌باشد(۱۵). در این رابطه هایدر مهم‌ترین عامل عدم موفقیت پیوند MSCs را بقای پایین سلول‌های پیوندی می‌داند و برای افزایش کارایی و موفقیت پیوند، افزایش بقای MSCs به وسیله عوامل محافظت‌کننده سلولی را ضروری می‌داند(۸). بنابراین برای

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش کارایی، درمان مؤثر نیاز است تا سلول‌های بنیادی را در برابر این شرایط سخت مقاوم کرده و مدت بقای این سلول‌ها را در محیط پیوند افزایش دهیم. برای نیل به این هدف، مطالعه‌های زیادی در خصوص دست‌ورزی ژنتیکی MSCs به وسیله ژن‌های بقا و ضد آپوپتوزی و دیگر عوامل انجام شده و می‌شود ولی به علت خطر جهش‌زایی، از دیدگاه ایمن بودن این روش هنوز مورد تردید است و کاربرد بالینی پیدا نکرده است. یکی از روش‌هایی که در طی چند سال اخیر توجه بسیار ویژه‌ای به آن شده است، استفاده از روش پیش شرطی کردن با عوامل مختلف از قبیل هیپوکسی، فاکتورهای رشد و دیگر عوامل می‌باشد که اثرات بسیار سودمندی در محافظت سلولی دارد و به این ترتیب می‌توان تا حد زیادی به افزایش اثر بخشی پیوند کمک کرد. استفاده از پیش شرطی کردن به منظور پیوند سلول‌های بنیادی، یک روش بسیار مؤثر است و اثرات بسیار قوی در محافظت سلولی دارد(۱۶). موری و همکارانش در سال ۱۹۸۶ اولین پیشگامان این روش بودند که نشان دادند مواجهه کوتاه مدت به طور دوره‌ای با استفاده از پیش شرطی کردن با ایسکمی، منجر به این می‌شود که قلب مقاومت زیادی در برابر ایسکمی کشنده داشته باشد و بعد از آن پیش شرطی کردن به عنوان یک روش مؤثر و بسیار قوی به منظور محافظت سلولی مطرح شد. افضل و همکارانش در سال ۲۰۰۷ ، کوی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ ، و سوزوکی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که اثرات محافظت سلولی پیش شرطی کردن با ایسکمی را می‌توان به وسیله روش‌های مختلف دیگر از قبیل استفاده از عوامل دارویی، شوک حرارتی، تعدیل و اصلاح ژنتیکی سلول‌ها به منظور افزایش بیان فاکتورهای رشد و مولکول‌های مسیر بقای سلولی و در معرض قرار دادن سلول‌ها با فرا صوت(Ultrasound) نیز انجام داد(۱۹-۱۷). گورک و همکارانش در سال ۱۹۹۶ ، مولیک و همکارانش در سال ۱۹۹۸ و نیز یلون و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به این نتیجه رسیدند که پیش شرطی کردن با ایسکمی دوره‌ای خفیف، تحمل بافت‌های بدن مانند عضلات اسکلتی و قلبی را در برابر ایسکمی کشنده بسیار افزایش می‌دهد(۲۲-۲۰). در روش‌های آزمایشگاهی به منظور محافظت قلب، داس و همکارانش در سال ۲۰۰۶ و نیز سوزوکی و همکارانش در سال ۲۰۰۴، طی مطالعه‌هایی که انجام دادند مشاهده کردند پیش شرطی کردن با استفاده از ایسکمی مختصر و دوره‌ای، اندازه ناحیه سکته دیده شده عضله قلبی را به وسیله کاهش مرگ آپوپتوتیک و نکروتیک میوسیت‌ها به مقدار زیادی کاهش می‌دهد(۲۵-۲۳). روسوا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ طی مطالعه‌هایی که انجام دادند، مشاهده کردند که پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسان(MSCs) با هایپوکسی منجر به افزایش تحرک و نیز بهبود پتانسیل درمانی MSCs می‌شود(۲۶). زیشان پاشا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در آزمایش‌هایی که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که پیش شرطی کردن MSCs با SDF-1α (Stromal-derived factor-1α)، باعث افزایش بقای سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به میوسیت‌ها در طی پیوند به قلبی که دچار انفارکتوس شده می‌شوند(۱۷). در سال ۲۰۱۲، ون ولتون و همکارانش با پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمال به مغز مدل‌های نوزاد حیوانی که دچار آسیب ایسکمی شده بودند، موفق شدند تا اندازه ناحیه آسیب دیده را کاهش داده و موجب بهبود عملکرد مغز شوند. آن‌ها این طور نتیجه گرفته‌اند که سلول‌های مزانشیمال در پاسخ به نیازهای محیط ایسکمیک مغز با ترشح فاکتورهای رشد متعدد، سایتوکاین‌ها و سایر مولکول‌های بیواکتیو، فرآیندهای ترمیمی را تنظیم می‌کنند(۲۷).

با توجه به این که نتایج بسیاری از مطالعه‌ها حاکی از این است که پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی با استفاده از عوامل مختلف نظیر H_2O_2 ، هیپوکسی، عوامل شیمیایی و فاکتورهای رشد موجب افزایش مقاومت و بقای سلول‌های پیوندی در محیط ایسکمیک بافت می‌شود و علاوه بر ایجاد مقاومت در سلول‌ها، خطرات ناشی از دست‌ورزی ژنتیکی را نیز ندارد، در این مطالعه ما نیز به بررسی تاثیرات پیش شرطی کردن سلول‌ها با H_2O_2 پرداختیم(۳۰-۲۸).

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمال را در *in vitro* با غلظت‌های پایین H_2O_2 در فواصل زمانی کوتاه مواجه کردیم، سپس سلول‌های پیش شرطی شده را در

www.SID.ir

معرض عوامل کشنده(غلظت‌های کشنده H_2O_2) قرار دادیم و در ادامه میزان بقای سلولی را به طور کیفی با تریپان‌بلو و به طور کمی با آزمایش MTT assay اندازه‌گیری نمودیم.

در طی آزمایش‌های متعددی که انجام دادیم، نتایج حاکی از این بود که پیش شرطی کردن سلول‌ها با H_2O_2، می‌تواند موجب افزایش مقاومت MSCs در پاسخ به استرس‌های کشنده شده و بقای سلولی را به میزان قابل توجهی در مقایسه با کنترل(MSCs معمولی که تحت هیچ گونه فرآیند پیش شرطی کردن قرار نگرفته) بهبود دهد.

نتایج آزمایش‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پیش شرطی کردن MSCs با عوامل اکسیدان، می‌تواند یک سیستم دفاعی قوی برای MSCs در جهت مقابله با آسیب‌های وارده در شرایط *in vitro* و *in vivo* فراهم کند.

در تایید مطالب ذکر شده، تانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در طی تحقیقاتی که انجام دادند ثابت کردند که پیش شرطی کردن به وسیله H_2O_2 در رده سلولی PC12 ، اثرات محافظتی در برابر استرس‌های اکسیداتیو دارد و باعث کاهش آپوپتوز از طریق مکانیسم‌های ROS ، MMP و Bcl-2 می‌شود. هم چنین شی یانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که پیش شرطی کردن MSCs با H_2O_2 باعث افزایش بیان مولکول چسبندگی CXCR4 و جلوگیری از آپوپتوز MSCs می‌شود(۳۱).

اشمل کو و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند کشت سلول‌های $CD133^+$ در حضور VEGF و فاکتور رشد سلول‌های عصبی مشتق شده از مغز(b NGF) به صورت تکی یا هر دو با هم، تمایز میواندوتلیال سلول‌های $CD133^+$ را تقویت می‌کنند.

آپوپتوز یکی از عوامل بسیار مهم کاهش بقای MSCs در پیوند می‌باشد. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که پیش شرطی کردن سلول‌ها، سبب فعال شدن مسیرهای آنتی‌آپوپتوتیک شده و در نتیجه بقای MSCs را افزایش می‌دهد. در تایید این موضوع می‌توان به مطالعه پاریزاس و همکارانش اشاره کرد که در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که واکنش IGF-1/IGF-1R باعث فعال شدن متوالی مسیرهای انتقال سیگنالی می‌شود که از آپوپتوز سلول جلوگیری می‌کنند.

در این مطالعه، سلول‌ها را به صورت موقتی در معرض غلظت‌های بهینه شده عوامل اکسیدان قرار دادیم تا از این طریق استرسی به سلول‌ها وارد کرده باشیم که نه تنها برای آن‌ها آسیب‌رسان و کشنده نمی‌باشد، بلکه از طریق القای مکانیسم‌های گوناگون نظیر فعال کردن ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک، القای بیان فاکتورهای رشد و مهار ژن‌های آپوپتوتیک در سلول‌ها سبب ایجاد مقاومت در آن‌ها و افزایش بقای آن‌ها می‌شود. تاکنون مسیرهای انتقال سیگنالی که به وسیله پیش شرطی کردن ایسکمیک شروع می‌شود و در فعال‌سازی مسیرهای مختلف پروتئین‌های بقای سلولی نقش دارد گزارش شده است. گورک و همکارانش در سال ۱۹۹۶ ، ژو و همکارانش در سال ۲۰۰۱ و هازنلوی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ آن‌ها را شناسایی کردند که عبارتند از پروتئین کینازهای C ، A و G که جزو خانواده MAPK و BMK1 (JNK ، P38 و Erk1/2) ، فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز(P13K) آبشار P13k-Akt و مسیر JAK-STAT می‌باشند(۳۲، ۳۱، ۲۲).

در مقایسه با مقاوم کردن سلول‌ها از طریق دستورزی ژنتیکی، پیش شرطی کردن سلول‌ها این مزیت را دارد که خطر تومورزایی را نداشته و تغییرات پایدار در سلول‌ها ایجاد نمی‌کند. از طرفی نیز در این فرآیند، سلول‌ها با عواملی مواجه می‌شوند که به طور طبیعی با آن‌ها رو به رو می‌شوند، بنابراین سلول‌ها در معرض شرایط ناشناخته جدید که می‌تواند برای آن‌ها مضر باشد قرار نمی‌گیرند. از دیگر مزایای پیش شرطی کردن این است که مقاومت بالایی را در سلول‌ها ایجاد می‌کنند. به طوری که در مطالعه‌ای که انجام شد، مشاهده گردید که غلظت ۵ µM از H_2O_2 موجب می‌شود تا حدود ۸۵٪ از سلول‌ها در برابر شرایط کشنده القا شده، زنده بمانند.

نتیجه‌گیری

پیش شرطی کردن فرآیندی است که طی آن سلول‌ها به طور موقتی تحریک شده و به طور موقتی هم فعال می‌شوند بنابراین می‌توان از آن به عنوان راه‌کاری مؤثر در جهت افزایش بقای سلول‌ها پس از پیوند و افزایش اثر بخشی پیوند، بدون داشتن خطرات سرطان‌زایی، بهره گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

ایـن تحقیـق حاصـل پایـان‌نامـه کارشناسـی ارشـد هماتولوژی مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشـی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد.

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- 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.
3- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74(5): 1124-36.
4- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, *et al*. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 1998; 279(5356): 1528-30.
5- Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. Artif Organs 2001; 25(3): 187-93.
6- Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, *et al*. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 2002; 105(3): 380-6.
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- Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. J Cell Biol 1998; 142(5): 1257-67.
9- Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, *et al*. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. J Am Coll Cardiol 2003; 41(5): 879-88.
10- 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.
11- Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(2): 416-25.
12- Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. J Mol Cell Cardiol 2001; 33(5): 907-21.
13- 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.
14- Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, Zhang D, Zhao T, Ashraf M. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. Cardiovasc Res 2008; 77(1): 134-42.
15- Afzal MR, Haider HK, Idris NM, Jiang Sh, Ahmed R, Ashraf M. Preconditioning promotes survival and proliferation of mesenchymal stem cells in the infarcted rat heart via activation of NF-B downstream of PI3K/Akt signaling. Circulation 2007; 116: II_68.
16- Cui JH, Park SR, Park K, Choi BH, Min BH. Preconditioning of mesenchymal stem cells with low-intensity ultrasound for cartilage formation in vivo. Tissue Eng 2007; 13(2): 351-60.
17- Suzuki K, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Brand NJ, Yacoub MH. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. Circulation 2000; 102(19 Suppl 3): III216-21.
18- Gürke L, Marx A, Sutter PM, Frentzel A, Salm T, Harder F, *et al*. Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. Am Surg 1996; 62(5): 391-4.
19- Maulik N, Yoshida T, Engelman RM, Deaton D, Flack JE 3rd, Rousou JA, *et al*. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death associated with ischemia/reperfusion. Mol Cell Biochem 1998; 186(1-2): 139-45.
20- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol Rev 2003; 83(4): 1113-51.
21- Das S, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Angiotensin preconditioning of the heart: evidence for redox signaling. Cell Biochem Biophys 2006; 44(1): 103-10.
22- Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, Das DK. GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. J Mol Cell Cardiol 2004; 37(6): 1195–203.
23- Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2008; 26(8): 2173-82.
24- Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. J Biol Chem 2009; 284(48): 33161-8.
25- Li S, Deng Y, Feng J, Ye W. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. Cell Biol Int 2009; 33(3): 411-8.
26- Fernández V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, *et al*. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. Free Radic Biol Med 2008; 44(9): 1724-31.
27- Tang XQ, Feng JQ, Chen J, Chen PX, Zhi JL, Cui Y, *et*

Archive of SID
www.SID.ir

al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H2O2 in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. Brain Res 2005; 1057(1-2): 57-64.
28- van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. Pediatr Res 2012; 71(4 Pt 2): 474-81.
29- Shmelkov SV, Meeus S, Moussazadeh N, Kermani P, Rashbaum WK, Rabbany SY, *et al*. Cytokine preconditioning promotes codifferentiation of human fetal liver CD133+ stem cells into angiomyogenic tissue. Circulation 2005; 111(9): 1175-83.
30- Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281(3): H1295-303.
31- Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. Cardiovasc Res 2006; 70(2): 240-53.
32- Nasef A, Fouillar L, El-Taguri A, Lopez M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Libyan J Med 2007; 2(4): 190-201.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10(3): 255-266

Original Article

Enhancement of the resistance of mesenchymal stem cells against killing conditions by the oxidative preconditioning

Bashiri Nahanji H.[1], Habibi Roudkenar M.[1], Halabian R.[2], Jalili M.[3], Jalili M.A.[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
[3]Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

Abstract

Background and Objectives

About 70% of MSCs die in the early stages of transplantation into the infarcted myocardium. Several solutions have been made to address this problem. In the last decade, preconditioning of MSCs with oxidative stresses has gained a lot of attention. In this study, we have investigated the effects of preconditioning with hydrogen peroxide (H_2O_2) on the survival of MSCs and their resistance against oxidative stresses.

Materials and Methods

Mesenchymal stem cells from bone marrow have been cultured. Cells from the passage four were treated with 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, and 100µm concentrations of H_2O_2, and were then recovered with the fresh medium. Finally, the treated cells were exposed to 500 µM H_2O_2 as the killing condition. The percentage of survived cells was analyzed by the MTT assay kit.

Results

Preconditioning with 5 and 10 µM H_2O_2 significantly increased the resistance of MSCs against the apoptosis induced by 500 µM H_2O_2.

Conclusions

Preconditioning of MSCs with oxidative stresses enhances their survival; therefore, it can increase the efficacy of transplantation.

Key words: Hydrogen Peroxide (H_2O_2), Ischemic Preconditioning, Apoptosis, Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

Received: 9 Sep 2012
Accepted:11 Feb 2013

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*

Archive of SID
www.SID.ir