

مقاله پژوهشی

مطالعه‌ی تاثیر استرس اکسیداتیو بر مسیر سیگنالینگ سلولی *Nrf-2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCs)

پریسا بوستانی^۱، الناز خجسته^۲، چنگیز احمدی زاده^{۲*}

^۱ گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

* Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۹

چکیده

مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال نشان داد که القای اتوفژی در MSCs موجب افزایش حساسیت در برابر استرس اکسیداتیو و مهار اتوفژی باعث مقاومت MSCs نسبت به استرس‌های اکسیداتیو و افزایش میزان بقای MSCs در مقایسه با سلول‌های کنترل می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر استرس اکسیداتیو بر مسیر سیگنالینگ سلولی *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشد. مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریز فناوری دارویی علوم پزشکی تبریز، در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت DMEM-F12 کشت داده شدند و بعد از تریپسین کردن کشت مجدد انجام و پاساژ سلولی چهارم انتخاب شد. سپس با استفاده از روش MTT assay مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA از سلول‌های تیمار شده انجام و تست DNA Ladder assay صورت گرفت و پس از تهیه cDNA میزان بیان ژن‌های *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. نتایج نشان دادند که استرس اکسیداتیو می‌تواند مسیر سیگنالینگ سلولی *Nrf2*-*Ngoi* را فعال کند و سلول‌های بنیادی می‌توانند از طریق این مسیراسترس را مهار نمایند. بنابراین باید برای تقویت این مسیر از طریق آنتی اکسیدانت‌های غذایی و مکمل به منظور افزایش کارایی سلول درمانی اقدام نمود.

کلیدواژه‌ها: استرس اکسیداتیو، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، *Nrf-2*.

مقدمه

اکسیژن (ROS) و توانایی یک سیستم زیستی در خنثی‌سازی و مهار میانجی‌های سمی آن یا ترمیم آسیب‌های وارده است. هرگونه آشفتگی و اختلال در وضعیت طبیعی اکسیداسیون-

استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) بازتاب‌دهنده‌ی عدم تعادل میان تظاهرات سیستماتیک «گونه‌های فعال

احیا (ریداکس)، از طریق تولید پراکسید و رادیکال های آزاد، منجر به تولید اثرات سمی و آسیب به تمامی اجزاء و ساختارهای درون سلولی، از جمله پروتئین ها، لیپید و DNA می گردد. آسیب به بازها اغلب غیر مستقیم و توسط گونه های فعال اکسیژن همچون O_2^- (رادیکال سوپراکسید)، OH (رادیکال هیدروکسیل) و H_2O_2 (هیدروژن پراکسید) ایجاد می شود. [۱۰]. برخی گونه های فعال اکسیژن در سیستم سیگنالینگ ریداکس، به عنوان پیام رسان سلولی عمل می کنند در نتیجه، استرس اکسیداتیو می تواند سبب اختلال در پیام رسانی سلولی شود. در انسان، استرس اکسیداتیو در بروز اختلال کم توجهی - بیش فعالی، سرطان، پارکینسون، بیماری لافورا، آلزایمر، تصلب شرایین، نارسایی قلب، سکته قلبی، و اختلال افسردگی اساسی و... نقش دارد [۱۶] و به نظر می رسد یکی از ویژگی های مبتلایان به نشانگان آپرگر نیز باشد [۲۶].

همچنین استرس اکسیداتیو کوتاه مدت ممکن است در جلوگیری از پیری از طریق فرایندی موسوم به «میتوهورمیس» نقش داشته باشد [۳۳، ۱۲]. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) از مهمترین سلول های بنیادی بالغین هستند [۳۱]. سلول های بنیادی مزانشیمی طی جداسازی سلول های استخوانی از مغز استخوانی موش شناسایی شدند [۵]. این سلول ها، جمعیتی از سلول های بنیادی چند تانه می باشند که از بافت هایی نظیر مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، مغز، بافت چربی، خون بندناف، خون محیطی و بافت های پیوندی پوستی جدا می شوند [۳۴]. علیرغم تفاوت های مختصر، توانایی تکثیر و خودنوسازی طولانی مدت، ریخت شناسی دوکی و فیبروبلاست و توانایی تمایز به دودمان مزودرمی و حتی غیر مزودرمی از خصوصیات منحصر به فرد این سلول ها می باشند [۴]. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، توانایی تمایز به رده های مختلف سلولی را داشته، در آزمایشگاه به آسانی از بافت های مختلف جدا و تکثیر داده می شوند [۱۴]. این سلول ها دارای ویژگی های خاص مانند خصوصیت تعدیل ایمنی و توانایی مهاجرت و جایگزینی در محل آسیب دیده هستند [۳]. امروزه از این سلول ها به عنوان یک منبع سلولی ایده آل در زمینه سلول درمانی، ژن درمانی و نیز مهندسی بافت استفاده می شود. [۲۲]. از مهمترین عوامل

آسیب رسان؛ کمبود اکسیژن، فقر غذایی و وجود رادیکال های آزاد اکسیژن ناشی از واکنش های اکسیداسیون و احیا یا همان استرس اکسیداتیو می باشند [۳۶]. افزایش مقاومت سلول های بنیادی مزانشیمی در برابر شرایط استرسزا جهت افزایش کارایی پیوند این سلول ها، بسیار حیاتی است [۳۰]. مطالعه های متعددی در زمینه افزایش بقای سلول های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش دست ورزی ژنتیکی سلول ها با ژن های محافظت کننده سلولی مختلف انجام شده است [۲۰]. از جمله ژن های محافظت کننده ژن *Nuclear Factor- Hypoxia Inducible NF-E2 Nrf2* یا *Erythroid HIF-1α* (HIF-1α) و *(Related Factor 2 1α-Factor)* - می باشند که به عنوان دو فاکتور رونویسی منجر به بیان مجموعه ژن هایی می گردند که افزایش مقاومت این سلول ها را مقابل شرایط استرس اکسیداتیو و کمبود اکسیژن به دنبال خواهد داشت [۱۷]. از طرفی سلول های بنیادی مزانشیمی توانایی ترشح سیتوکین ها و مولکول های فعال زیستی زیادی را دارا می باشند [۱۷]. سکرئوم (Secretome) مجموعه ای از سیتوکین های تعدیل کننده ایمنی و درمانی مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمی است سکرئوم در اصل از سلول های دست ورزی شده با ژن *Nrf2* و *HIF-1α*، حاوی مجموعه ای از پروتئین های باقی باشد که می توانند در افزایش مقاومت سلول ها در برابر استرس اکسیداتیو و شرایط کمبود اکسیژن مؤثر باشند [۳۲]. پروتئین *Nrf2* یک نوع فاکتور رونویسی هسته ای است که نقش اساسی در شبکه تنظیم کننده ژن های همونستازی و ردوکس ایفا می کند. [۱۳]. یکی از عوامل محافظت کننده سلولی فاکتور نسخه برداری *Nrf2* است. این فاکتور نسخه برداری بقای سلولی را در مواجهه با استرس های مختلف افزایش می دهد. *Nrf2* به طور طبیعی بیان شده و به پروتئین های سیتوپلاسمی متصل می شود و در اثر استرس های گوناگون، به هسته سلول رفته و موجب بیان ژن های متعددی مانند آنزیم های مؤثر در فرآیند آنتی اکسیدان و سم زدایی سلولی می شود. *Nrf2* نقش مهمی در حفاظت علیه استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی ناشی از مواد شیمیایی دارد [۲۹]. تحت شرایط استرس، بیان *Nrf2* افزایش یافته و موجب رونویسی از ژن هایی می گردد که باعث افزایش مقاومت سلولی می شوند. از جمله این ژن ها

bromide و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ تیره و نامحلول فورمازان در آب می‌باشد. احیاء MTT، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد بلورهای فورمازان در حلال‌های آلی چون ایزوپروپانول و DMSO قابل حل می‌باشند که با سنجش میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر می‌توان تعداد سلول‌های زنده را که فعالیت سوخت و سازی دارند تعیین نمود [۱۵]. MTT نمک ترازولیوم محلول در آب به رنگ زرد می‌باشد که در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز که فقط در سلول‌های زنده فعال هستند در حلقه MTT محلول شکستی ایجاد شده و به بلورهای آبی رنگ فورمازان غیر محلول تبدیل می‌شود، لذا با استفاده از روش نورسنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر میزان فورمازان که توسط ایزوپروپانول اسیدی یا حلال‌های دیگر (نظیر DMSO و بافر سورنسون) به شکل محلول درآمده اندازه گیری شده و به این وسیله میزان سلول‌های زنده تعیین می‌گردد. پس از هر انکوباسیون محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شده و هر خانه با ۱۵۰ ماکرولیتر محیط تازه و ۵۰ ماکرولیتر محلول MTT (میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شده در PBS) جایگزین می‌شود. سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ ماکرولیتر DMSO به همراه ۲۵ ماکرولیتر بافر سورنسون (گلاسیسین ۰/۱ مولار، NaCl ۰/۱ مولار دارای pH=10.5 بهینه شده با NaOH یک مولار) جایگزین گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق شیک گردیدند. سرانجام تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. زیست‌پذیری سلولی نسبی به صورت (نمونه‌ها A570 تقسیم بر کنترل A570) ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید. کل آزمایش بصورت ۳ تکرار انجام شد. همچنین تمام نمودارها توسط نرم‌افزار excel ورژن ۲۰۱۳ رسم شد. [۱۵].

رنگ آمیزی سلولی دیبی (Dapi staining)

برای بررسی مستقیم استرس اکسیداتیو بر روی سلول‌های بنیادی، بعد از کشت سلول‌ها و تکثیر سلول‌ها در پلیت ۶ خانه‌ای، در ابتدای کار داخل هر چاهک یک لامل

TXNRD1 و *GCLC* و *GSTs* و *UGT* و *NQO1* هستند که اثرات سمیت زدایی و آنتی اکسیدانی داشته و در نهایت منجر به دفاع سلولی می‌شوند [۲۱]. Canella و همکاران در سال ۲۰۱۸ دریافتند که سیگنالینگ *Ntf2* یک مسیر کلیدی است که برای از بین بردن آنزیم آنتی اکسیدان و حذف ROS و سایر مواد مضر و محافظت از بدن در برابر استرس اکسیداتیو ضروری است [۹]. Xiang و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که پیش شرط *d* کردن *MSCs* با H_2O_2 باعث افزایش بیان مولکول چسبندگی *CXCR4* و جلوگیری از آپوپتوز *MSCs* می‌شود [۳۷]. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر استرس اکسیداتیو بر مسیر سیگنالینگ سلولی *Ntf-2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بوده و جهت انجام آن از سلول‌های بنیادی مزانشیمال استفاده شده است مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریز فناوری دارویی علوم پزشکی تبریز، در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. رده سلولی *MSCs* از بانک سلولی پاستور تهیه شد. سلول‌ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت DMEM-F12 (U.S.Gipco) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ ماکرولیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ و استرپتومایسین $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) در انکوباتور در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شد. سپس سلول‌ها پاساژ داده شده و با شمارش سلول‌ها و با توجه به محاسبات مربوط به *Seedind density* مورد نظر برای انجام آزمایشات، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی را توسط محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسانید و و بعد از بررسی فلاسک مورد نظر توسط میکروسکوپ، در انکوباتور قرار گرفت [۲۴].

MTT assay

آزمون MTT، آزمونی کمی و رنگی است که اساس آن بر پایه‌ی احیاء نمک زرد رنگ محلول در آب 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) (-2,5-diphenyltetrazolium

تیوب‌ها ۲۰ میکرولیتر DEPC ریخته و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد سپس OD و غلظت آنها بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر با دستگاه نانو دراپ سنجیده شد. به منظور بررسی کیفیت RNA های استخراج شده، ۵ نمونه به صورت راندوم بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد (۱ ساعت در ولتاژ 80 V).

سنتز cDNA

۱ میکروگرم از total RNA که با ۰/۲ میکرومولار هگزامر پرایمر و ۱ میکرولیتر (۱۰ mM dNTP) و آب DEPC مخلوط کرده با حرارت ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد، سپس ۵ یونیت آنزیم RT (MMLV) (Thermo Fisher, U.S.)، بافر ۱ buffer for MMLV (x) RT، یک یونیت بر میکرولیتر مهارگر RNase را افزوده و در واقع در انتها حجم کلی هر تیوب باید ۲۰ میکرولیتر شود. بعد تیوب‌ها را در دستگاه PCR قرار داده و به دستگاه، برنامه: ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه ۴۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه داده شد تا cDNA ها سنتز شوند [۲۷].

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار oligo 5 طراحی و توسط وب سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) BLAST شدند که اطلاعات آنها در جدول شماره ۱ موجود است. پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. لازم به ذکر است که از ژن به عنوان ژن خانه گردان استفاده شد.

گذاشته و سلول‌ها را بر روی آن‌ها ریخته شد، بعد از یک روز اب اکسیژنه را داخل هر چاهک پلیت ۶ خانه ریخته شد و مایع رویی محیط کشت سلول‌ها را کاملاً خالی کرده و با افزودن ۶۰ میکرولیتر پارافرمالدهید (paraformaldehyde) ۴ درصد به هر چاهک، فیکس کرده سپس مایع رویی سلول‌ها را خالی کردیم، سلول‌های داخل هر چاهک را با PBS، ۳ بار شستشو داده، و سلول‌های داخل هر چاهک را با محلول نفوذپذیر کننده Triton x-100 0.1% به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شد سپس سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانت Olympus IX81 invert مجهز به Olympus DP70 camera (Olympus Corp., Tokyo, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج RNA با تریزول

برای استخراج RNA، به سلول‌ها تریزول اضافه شد تا سلول‌ها لیز شوند سپس سلول‌های لیز شده به تیوب‌های ۲ سی‌سی منتقل شد. به تیوب‌ها حدود ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی هر تیوب به تیوب‌های ۲ سی‌سی جدید منتقل شدند، سپس به هر تیوب ۲/۵ برابر حجم نمونه ایزوپروپانول سرد افزوده سر و ته کرده ۲۴ ساعت در ۷۰- قرار گرفتند، سپس تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و مایع رویی بیرون ریخته شد، تیوب‌ها در دمای اتاق کاملاً خشک شده در انتها به

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن های هدف و مرجع

ژن هدف	توالی پرایمر
<i>Nrf2</i> Forward	GAGACAGGTGAATTTCTCCCAAT
<i>Nrf2</i> Reverse	TTTGGAATGTGGGCAAC
<i>HO1</i> Forward	ACGGCTTCAAGCTGGTGATG
<i>HO1</i> Reverse	TGCAGCTCTTCTGGGAAGTAG
<i>NQOI</i> Forward	ATGTATGACAAAGACCCTTCC
<i>NQOI</i> Reverse	TCCCTGCAGAGAGTACATGG
<i>GAPDH</i> Forward	GAGCCAAAAGGGTCATCATC
<i>GAPDH</i> Reverse	TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG

interest / Concentration of reference gene

$$\Delta Ct = Ct_{(TG)} - Ct_{(RGI)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{(Control)}$$

$$Ration = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

روش محاسبه آماری

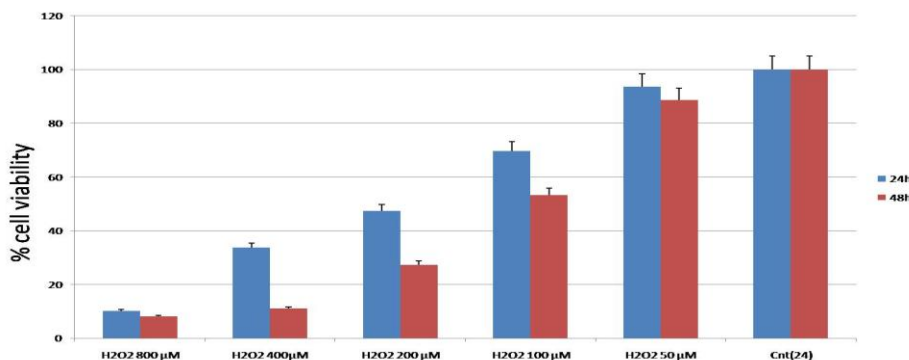
پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی با به کار بردن قانون هاردی وینبرگ میزان فراوانی مورد انتظار و مشاهده شده محاسبه و وارد محیط SPSS شد. برای مقایسه میانگین تعداد الل‌های جهش یافته در جامعه مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس استفاده شد. فرض صفر در آنالیز واریانس برابر بودن میانگین متغیر وابسته در تمام سطوح متغیر مستقل است.

نتایج

انجام MTT ASSAY به منظور یافتن حداقل میزان ۵۰

درصد کشندگی H_2O_2

این تست برای پیدا کردن ۵۰ درصد کشندگی غلظت انجام شد غلظت‌های مختلفی از آب اکسیژنه به منظور ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بکار برده شد. زمان‌های مورد تیمار شامل ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بود. نتایج نشان داد بیشترین کشندگی در غلظت‌های ۱۵۰ میکرومولار اب اکسیژنه در ساعت ۲۴ و ۱۰۰ میکرومولار در ساعت ۴۸ بود. نمودار ذیل میزان IC_{50} را در ساعت‌های مختلف و برای غلظت‌های مختلف اب اکسیژنه نشان داده است.



شکل ۱: نتیجه آزمایش MTT به منظور تعیین غلظتی از اب اکسیژنه که ۵۰ درصد سلول‌ها را کشته باشد. همانطور که در شکل نشان داده شده است غلظت ۱۵۰ و ۱۰۰ کشندگی ۵۰ درصد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته را دارد که برای مطالعات مولکولی این غلظت مورد استفاده قرار گرفت.

Real-time RT- PCR

واکنش Real time PCR به صورت تکرارهای ۳ تایی صورت گرفت. بدین شکل که در تیوب‌های مخصوص Real time PCR 1 ماکرولیتر cDNA و ۱۹ ماکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ ماکرولیتر پرایمر فوروارد (۰/۲ ماکرومولار)، ۱ ماکرولیتر پرایمر ریورز (۰/۲ ماکرومولار)، ۷ ماکرولیتر DEPC و ۱۰ ماکرولیتر Mastermix 1x Real time ریخته شد. بعد تیوب‌ها را در دستگاه Real time PCR قرار داده و دستگاه run گردید. لازم به ذکر است که با رقت سازی یک از نمونه‌ها، منحنی رسم گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

قبل از آنالیز داده‌ها منحنی‌های ذوب (Melting curve) بدست آمده از هر واکنش PCR بررسی شد تا صحت پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز در ژن‌های سوماتیک و U6-snRNA و GAPDH به عنوان رفرنس محاسبه شد.

فرمول محاسبه تغییر بیان نسبی

Concentration = efficiency average CT

(controls) - average CT (samples)

Relative expression = Concentration of gene of

نتایج تست DNA Ladder

پس از تیمار سلول های بنیادی با میزان غلظت ۱۵۰ میکرومولار آب اکسیژنه به منظور تایید استرس اکسیداتیو و نیز آپوپتوز ناشی از استرس تست DNA لدر انجام شد. همانطور که می دانیم در آپوپتوز سلول ها فراگمنتیشن DNA یکی از حوادث در پروسه آپوپتوز سلول ها محسوب می شود نتیجه حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA که در مراحل انتهایی فرایند آپوپتوز رخ میدهد و در طی آن بر اثر فعال شدن آنزیم های آندونوکلاز درونی مانند (CAD/CPAN/DFF40) به وسیله کاسپازها، DNA کروموزومی از نواحی بین نوکلئوزومی بریده و قطعات یک و یا چند نوکلئوزومی ایجاد گردیده و قطعات حاصل پس از تفکیک به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، الگوی مشخص نردبانی ایجاد مینمایند که به راحتی از الگوی پیوسته ی DNA در سلول های نکروزی قابل تفکیک است بخوبی در دستگاه ژل داگ و زیر نور UV مشاهده گردید. در هنگام آپوپتوز حجم سلول کاهش یافته و در سلول ویزیکول های متعددی ایجاد می شوند. سپس کروماتین متراکم شده و قطعه قطعه می شوند. در مراحل بعد، غشا هسته از بین می رود و در آخر، سلول بصورت وزیکول های کوچکی، به چندین قسمت تقسیم می شود. در طول آپوپتوز، اندامک های داخلی سلول، مانند، میتوکندری ها و لیزوزوم ها سالم می مانند. وزیکول هایی که از قطعه قطعه شدن سلول پدید می آیند، بوسیله فاگوسیت ها، بلعیده می شوند و هضم می شوند.

بررسی آپوپتوز با روش DAPI staining

سلول های تیمار شده تحت رنگ آمیزی DAPI قرار گرفتند. در واقع، در سلول های آپوپتوتیک قابلیت ورود رنگ به درون هسته افزایش میابد و تغییرات مورفولوژیک هسته (بصورت متراکم و تکه تکه شده) قابل تشخیص می گردد. علاوه بر اینکه کروموزوم های متراکم شده به خوبی رنگ آمیزی می شوند. در حالیکه در مدت زمان مشابه، هسته کروی سلول های نرمال به صورت یکنواخت رنگ آمیزی میشود. سلول های آپوپتوز شده نسبت به نرمال رنگ آبی قوی-تری رو دارند. رنگ DAPI هسته سلولی را رنگ می کند و زیر میکروسکوپ می توان تغییرات ایجاد شده در هسته را بررسی

کرد. رنگ دپی هم برای سلول های زنده و هم برای سلول های آپوپتوزی استفاده میشود، دپی میتواند از غشای سلولی سالم عبور کند اما میزان نفوذ آن در سلول زنده به علت توانایی غشا در مهار ورود مواد خارجی کمتر از زنده است. این روش در واقع یک نوع رنگ آمیزی فلوروسنس DNA است.

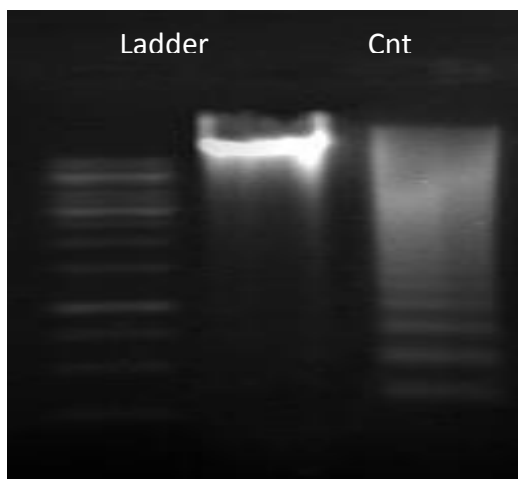
استخراج RNA از سلول های تیمار شده

شکل ذیل نتیجه الکتروفورز RNA نشان می دهد که از کمیت و کیفیت خوبی برخوردار بوده و برای سنتز cDNA مناسب می باشد. با وجود الکتروفورز به منظور اطمینان از نتایج الکتروفورز و همچنین به منظور محاسبه دقیق مقدار RNA ی اولیه برای انجام RT-PCR نمونه نانودراپ شدند. نتیجه نانودراپ و تعیین میزان rna استخراج شده را نشان می دهد که برای تهیه cDNA باید از میزان یکسانی استفاده می شد.

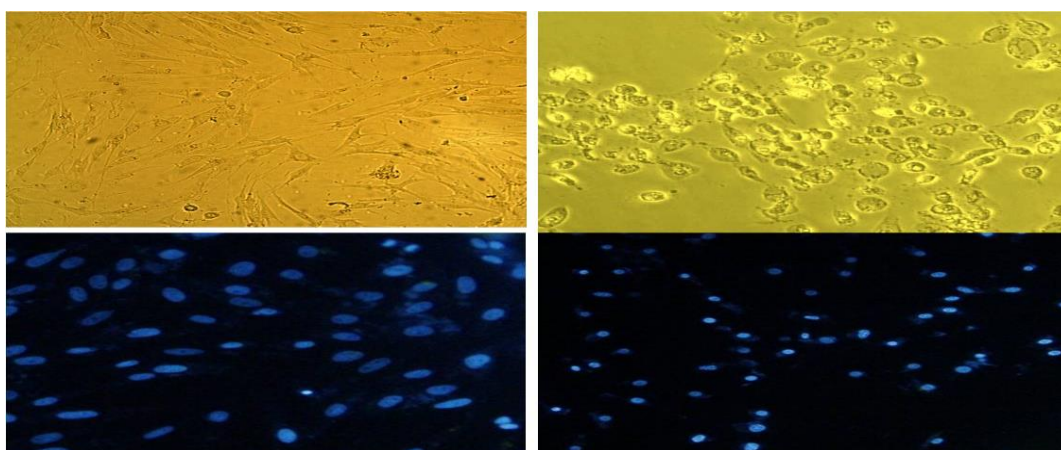
نتایج Real-time PCR

برای انجام این آزمایش سلول ها در پلیت های ۶ خانه ای با غلظت های IC50 اب اکسیژنه تیمار گردیدند. نمودارهای ذیل نشان دهنده صحت و راندمان PCR (نمودار استاندارد) همچنین اختصاصیت PCR و پرایمر (نمودار ذوب) می باشد. میزان افیشیتی واکنش بر اساس این منحنی بدست آمد. شیب نمودار با مقدار ۳/۴۸ - نشان می دهد واکنش بدون هیچ مداخله ای انجام شده است و همه Ct های بدست آمده قابل اطمینان می باشد. نمونه های با غلظت های بیشتر در سیکل-های پایین تری به حد آستانه رسیده اند و چون همه عوامل جز مقدار cDNA ها در نمونه ها ثابت است مشخص می گردد که CT های حاصل شده فقط به غلظت cDNA بستگی داشته که نشان دهنده صحت کار می باشد.

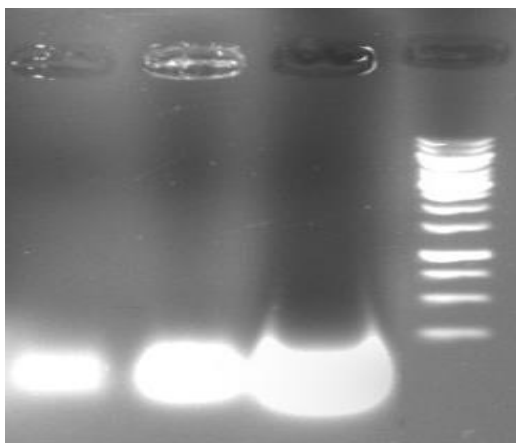
همچنین با توجه به اینکه Ct های بدست آمده بین ۲۳ و چرخه ۳۲ می باشند به جز موارد استاندارد که رقت سازی شده بودند این Ct ها قابل اطمینان بوده و ناشی از الودگی نمی تواند باشد. در عین حال دی کنار سایر نمونه ها یک نمونه کنترل منفی و بدون CDNA الگو هم قرار داده شده بود. نمودار تکثیر ذیل این مطلب را کاملا نشان داده است.



شکل ۲: الکتروفورز ۲ درصد برای تشخیص شکستگی DNA سلول‌های تیمار شده با آب اکسیژنه شکستگی‌هایی بصورت نردبانی نشان داده است.



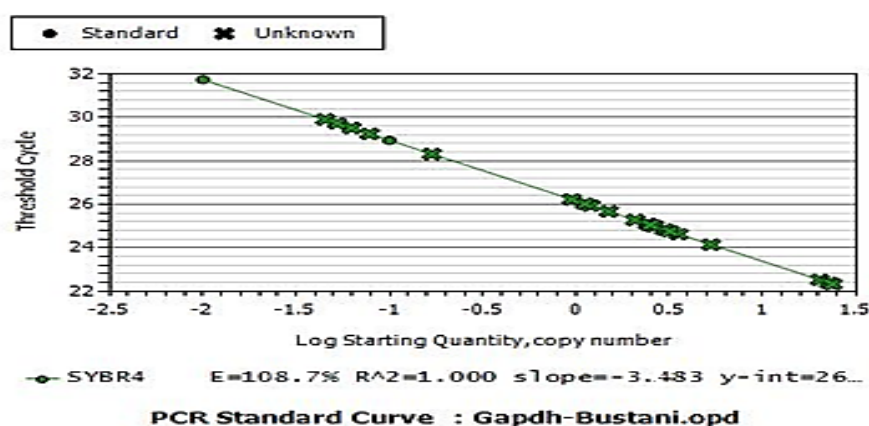
شکل ۳: رنگ آمیزی DAPI نمونه های تیمار شده و کنترل همانطور که در شکل نشان داده شده است نمونه های تیمار شده سلول‌های در حال آپوپتوز را نشان می‌دهد که دارای هسته قطعه قطعه شده و ریز هستند. قطعه قطعه شدن DNA در مقیاس بالا، به قطعات با وزن مولکولی بالا و اندازه نوکلئوزومی، عموماً مارکری برای مرگ سلولی از نوع آپوپتوزی است. تست DNA LADDER ASSAY برای ردیابی این شکست‌ها ایده آل است. با این حال، از آنجایی که تخریب DNA در اواخر مرگ سلولی ناشی از نکروز نیز دیده می‌شود و همچنین آپوپتوز در غیاب قطعه قطعه شدن هسته می‌تواند رخ دهد بنابراین استفاده از رنگ آمیزی DAPI بعنوان مکمل تست dna Ladder assay مهم می‌باشد



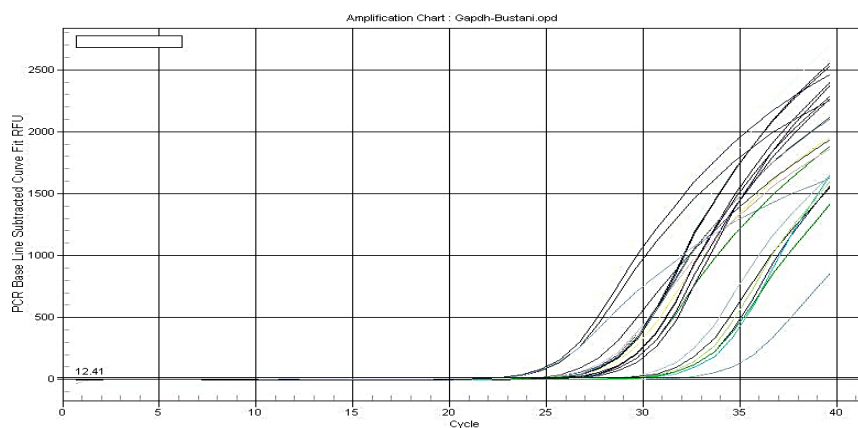
شکل ۴: نمونه استخراج RNA از نمونه های کنترل (Cnt) و نمونه تیمار شده با دو تکرار. چاهک اول لدر یک کیلو بازی برای تایید صحت الکتروفورز

جدول ۲: میزان RNA استخراج شده از نمونه کنترل و تیمار شده. همونطور که دیده می شود میزان OD 260/280 بالای ۲ نشان از کیفیت بالای RNA استخراجی می باشد

نام نمونه	OD 26/280	Ng/ μ L
سلول مزانشیمی بنیادی	۲,۳	۳۷۴ Ng/ μ L
سلول مزانشیمی بنیادی تیمار شده با آب اکسیژنه	۲,۱۷	۸۱۷ Ng/ μ L



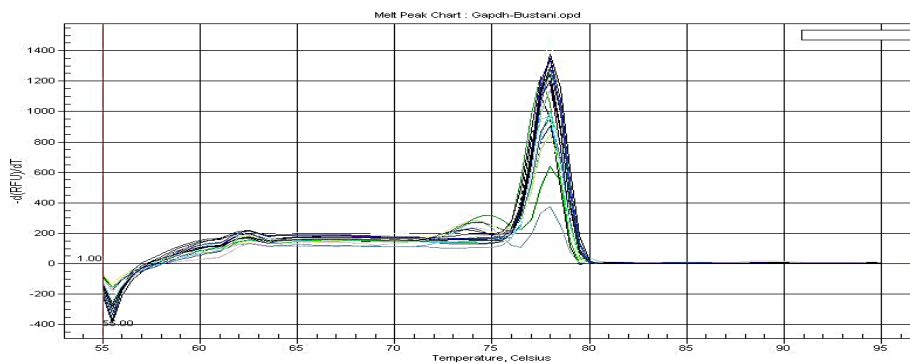
شکل ۵: منحنی استاندارد Realtime PCR. با انجام رقت سازی بر روی CDNA ی نمونه کنترل به نسبت یک به ده و انجام Realtime PCR این نمودار بدست آمد.



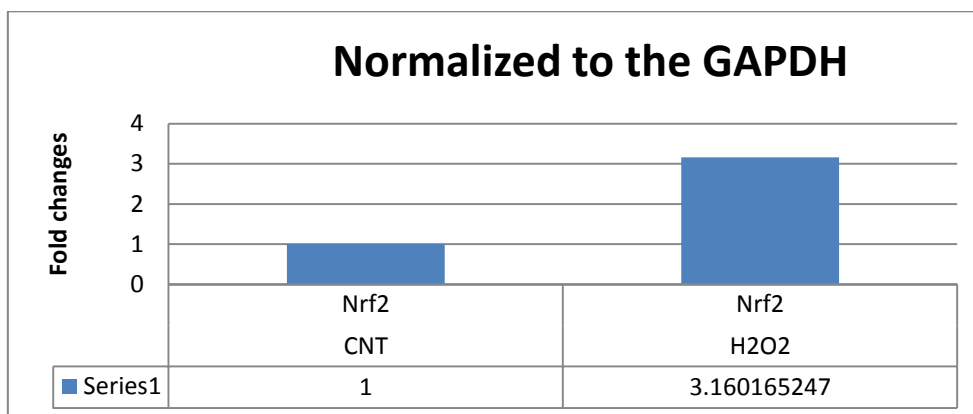
شکل ۶: منحنی تکثیر Real time PCR برای ژن *GAPDH* پس از تیمار سلولها با آب اکسیژنه و بدون تیمار با تکرار سه تایی. میزان *Ct* ها بین ۲۳ تا ۳۲ برای نمونه های تیمار شده می باشد. *Ct* های ۳۵ به بالا مربوط به *cdna* های رقیق شده استاندارد می باشند.

با وجود افزایش میزان بیان ژن *nrf2* تعداد زیادی از سلول ها اپوپتوز داده است. به منظور شناسایی کامل مسیر مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو ژن *hoi* در پایین دست ژن *nrf2* مطالعه شد. شکل ذیل نشان می دهد هیچ افزایش معناداری در افزایش بیان ژن هم اکسیژناز ۱ وجود ندارد و بنابراین باید مسیر دیگری در مقاومت به استرس در این سلول های بنیادی وجود داشته باشد.

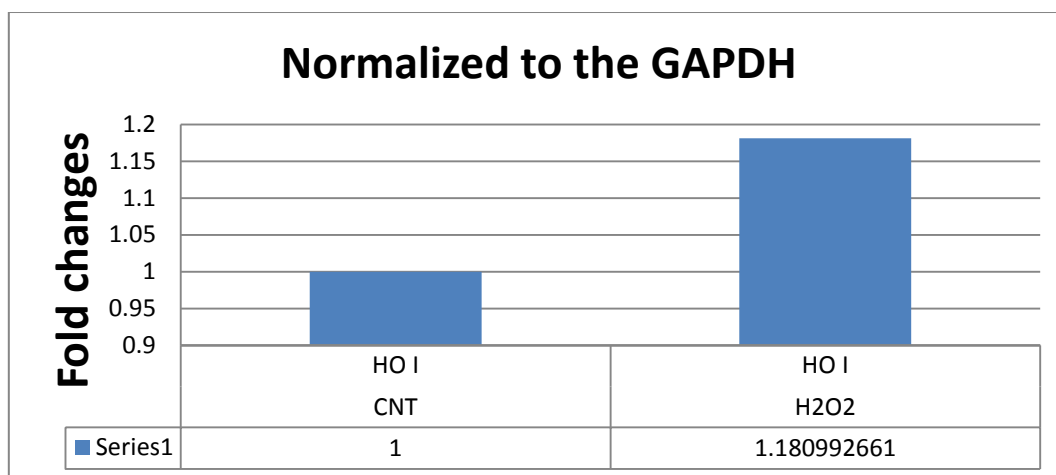
به منظور اطمینان از تکثیر اختصاصی پرایمرها بخصوص نمونه ژن کنترل یا رفرنس که زن *hous keeping* هم خواهده می شود که در اینجا ژن *GAPDH* می باشد در آخرین چرخه واکنش منحنی ذوب ترسیم شد. همانطور که در شکل دیده می شود وجود پیک قوی و شارپ مربوط به همه نمونه ها نشان دهنده تکثیر اختصاصی می باشد.



شکل ۷: نمونه منحنی ذوب پس از تیمار سلول‌ها و انجام *Real Time PCR*. وجود باندهای تک نشان دهنده تکثیر اختصاصی و بدون مشکل می‌باشد. تعدادی کمی از نمونه‌ها باند کوچک اضافی را نشان می‌دهد که به خاطر پرایمر دایمر و عدم تکثیر می‌باشد که بدلیل نمونه‌های کنترل منفی بدون *CDNA* الگو می‌باشد.



شکل ۸: نمودار میزان بیان ژن *nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تحت تاثیر آب اکسیژنه و بدون تیمار. بصورت تکی بمدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش *Real time PCR* مورد سنجش قرار گرفت. (اعداد بدست آمده میانگین ۳ بار تکرار می‌باشند). همانطور که نشان داده شده است میزان بیان ژن *nrf2* در تیمار با آب اکسیژنه و تحت شرایط استرسی به میزان ۳ برابر بیشتر از نمونه کنترل شده است.



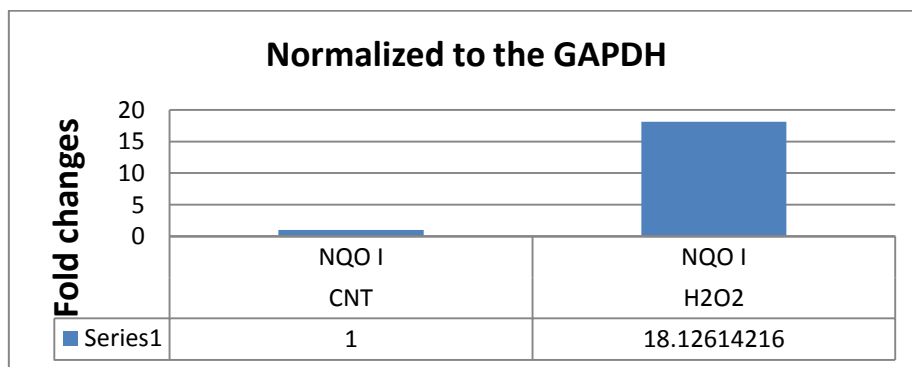
شکل ۹: نمودار میزان بیان *ho1* در سلول‌های بنیادی تحت تاثیر استرس اکسیداتیو القائی. سلول‌ها بمدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش *Real time PCR* مورد سنجش قرار گرفت. (اعداد بدست آمده میانگین ۳ بار تکرار می‌باشند). همه *CT* ها نسبت به ژن *GAPDH* نرمالایز شده است.

MSCs مغز استخوان را در *in vivo* و *in vitro* به سلول های عصبی، سلول های عضله اسکلتی و کاردیومیوسیت ها نشان دادند [۱۱]. با این وجود، وجود سلول های بنیادی پیوندی نمی توانند در محیط ایسکمیک پیوند که سرشار از رادیکال های آزاد اکسیژن و سایتوکاین های التهابی می باشد، به مدت زیادی دوام بیاورند و در همان روزهای ابتدایی قسمت اعظم سلول های بنیادی دچار مرگ سلولی می شوند که کارایی شان را در درمان سلولی بسیار محدود می کند [۲۵]. در مطالعه دیگری Cao و همکاران از وکتور *NRF2/pIRESneo* به منظور توانمندسازی سلول ها در برابر استرس اکسیداتیو استفاده کردند [۷]. آقای حامد بشیری نهنجی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ در تحقیقی تحت عنوان پیش شرطی کردن سلول های بنیادی مزانشیمال با غلظت های بهینه H_2O_2 به منظور افزایش بقای سلولی و افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو انجام دادند به این نتیجه رسیدند که پیش شرطی کردن سلول های مزانشیمی با H_2O_2 موجب افزایش بقا و مقاومت آنها در برابر استرس اکسیداتیو کشنده در مقایسه با سلول های کنترل پیش شرطی نشده می شود بدون اینکه تاثیر منفی در قابلیت تمایز آنها داشته باشند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۱]. آقای علی حسینی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ در مطالعه ای تحت عنوان تاثیر اتوفاژی بر بقای سلول های بنیادی مزانشیمال پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که القای اتوفاژی در MSCs موجب افزایش حساسیت در برابر استرس اکسیداتیو و مهار اتوفاژی باعث

به منظور شناسایی مسیر دقیق مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو توسط سلول های بنیادی مجبور به مطالعه ژن دیگری بنام *nqoi* شدیم که یکی از ژن های انتی اکسیداتی دخیل در مسیر استرس اکسیداتیو سلولی می باشد. نتایج آنالیز داده های حاصل از بیان این ژن نشان داد استرس اکسیداتیو میتواند مسیر سیگنالینگ سلولی *nrf2|nqoi* را فعال کند. همه *CT* ها نسبت به ژن *GAPDH* نرمالایز شده است. نسبت بیان ژن *nqoi* در نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل ۱۸ برابر بیشتر بوده که نشان می دهد این مسیر مسیر مقاومت به استرس اکسیداتیو در این سلول ها محسوب می گردد.

بحث

نتایج آنالیز داده های حاصل از بیان این مطالعه نشان داد استرس اکسیداتیو می تواند مسیر سیگنالینگ سلولی *nrf2|nqoi* را فعال کند و سلول های بنیادی از طریق این مسیر استرس را مهار نمایند سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل جداسازی آسان و توانایی تمایز مناسب، کاربردهای موثری در پزشکی دارند. با این وجود طی فرآیندهای جمع-آوری، کشت و پردازش، آسیب های متعددی به سلول های بنیادی مزانشیمی وارد می شود که بقا و عملکرد آن ها را کاهش می دهد بنابراین مطالعه های متعددی در زمینه افزایش بقای سلول های بنیادی مزانشیمی صورت رفته است [۱۹]. در همین راستا مطالعه های دیگری ظرفیت تمایزی



شکل ۱۰: نمودار میزان بیان *nqoi* در سلول های بنیادی تحت تاثیر استرس اکسیداتیو القایی. سلول ها بمدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش *Real time PCR* مورد سنجش قرار گرفت. (اعداد بدست آمده میانگین ۳ بار تکرار می باشند).

نقش دارند. در همین رابطه Robey و همکارانش در سال ۲۰۰۸ 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 که با مطالعه ما همخوانی دارد [۳۰] Qiao و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه خود بیان کردند که *Nrf2* و *HIF-1α* از عوامل بسیار مهم در فرآیندهای حفاظت سلولی هستند که افزایش بیان آن‌ها اثر مضاعفی بر مقاومت سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف دارد [۲۸]. Xiang و همکاران با مجاورت محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های عضلانی قلب که در شرایط کمبود اکسیژن تیمار شده بودند، نشان دادند که اثر ترشحي سلول‌های بنیادی مزانشیمی منجر به محافظت از سلول‌های عضله قلب می‌گردد [۳۷]. محمدرزاده و همکاران گزارش کردند که افزایش بیان ژن *Nrf* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بیان *SOD1&2* در این سلول‌ها و افزایش مقاومت سلولی و کاهش آپوپتوز آن‌ها می‌شود [۲۲]. مطالعه دیگر Cao و همکاران در سال ۲۰۰۵ از افزایش بیان *Nrf 2* به منظور توانمندسازی سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو استفاده کردند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۷]. نتایج نشان دادند که استرس اکسیداتیو می‌تواند مسیر سیگنالینگ سلولی *Nrf2-Ngoi* را فعال کند و سلول‌های بنیادی می‌توانند از طریق مسیراسترس را مهار نمایند. بنابراین باید برای تقویت این مسیر از طریق آنتی‌اکسیدانت‌های غذایی و مکمل به منظور افزایش کارایی سلول درمانی اقدام نمود.

سپاسگذاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم پریسا بوستانی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب می‌باشد. بدینوسیله از تمامی کسانی که در این پژوهش ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

مقاومت MSCs نسبت به استرس اکسیداتیو و افزایش میزان بقای MSCs در مقایسه با سلول‌ها کنترل شد [۲]. با توجه به عملکرد *Nrf2* در تنظیم باتری ژن‌هایی که برای سم زدایی از داروهای سرطانی و یا کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دارو عمل می‌کنند، بیان بیش از حد *Nrf2* ممکن است در افزایش مقاومت به درمان نقش داشته باشد [۱۸]. آپوپتوز یک مکانیسم شناخته شده از مرگ سلولی است که روی زنده بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مؤثر است. از طرف دیگر، یکی از عملکردهای مشهور *Nrf2* اثر ضد آپوپتوز آن است. با توجه به این، ما پیشنهاد کردیم که بیان *Nrf2* توسط MSCها ممکن است از فعال شدن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های حساس جلوگیری کند. دو مکانیسم احتمالی برای مقاومت *Nrf2*-MSCs در برابر تنش‌های مختلف وجود دارد. اول، سیگنالینگ *Nrf2* ممکن است برخی از ژن‌های ضد آپوپتوز را تنظیم کند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۸]. مکانیسم محافظت کننده دیگر *Nrf2* ممکن است با ترشح فاکتورهای رشد، اثرات پاراکرین را درگیر کند [۲۳]. Kim و همکاران در مطالعات خود بیان کردند که *Nrf2* در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو در اکثر انواع سلولی القا می‌شود و به سرعت به سطح پایه خود برمی‌گردد و بیان مداوم آن می‌تواند برای سلول‌ها مضر باشد [۱۸]. به دلیل قرار گرفتن در معرض مداوم سلول‌ها در برابر عوامل اکسید کننده آسیب‌پذیر، موجودات وابسته به اکسیژن برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو با *Nrf2* به عنوان یک پروتئین کلیدی در پاسخ به استرس سلولی مکانیسم بسیار محافظت شده‌ای ایجاد کرده‌اند [۶]. Surh و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در مطالعات خود بیان کردند که عامل ۲ هسته‌ای مربوط به فاکتور هسته‌ای (*Nrf2*) E2 یک فاکتور رونویسی برای محافظت در برابر استرس‌های الکتروفیلیک و اکسیداتیو است که با مطالعه ما همخوانی دارد [۳۵]. *Nrf2* باعث رونویسی آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های سم زدایی متنوع می‌شود که در نهایت نقش مهمی در تقویت صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌ها ایفا می‌کنند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد [۲۸]. عوامل متعددی در مرگ زودرس MSCs در ریز محیط پیوندی

- [11] Chandra K, Syed Salman A, Abid M, Sweety R, Najam A. 2015, "Protection Against FCA Induced Oxidative Stress Induced DNA Damage as a Model of Arthritis and in vitro Anti-arthritis Potential of *Costus speciosus* Rhizome Extract". *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7 (2): 383-389.
- [12] Fukuda K. 2001, Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Journal of Artificial Organs*, 25(3): 187-1893
- [13] Gems D, Partridge L. 2008, Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metabolism*, 7 (3): 200-203
- [14] Inoue F, Ahituv N. 2015, Decoding enhancers using massively parallel reporter [13] assays *Genomics*.;106(3):159-164
- [15] Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, et al. 2005, Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Journal of Cardiovascular Research*, 66(3): 543-551
- [16] Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. 2004, Cytotoxicity and antimicrobial assessment of *Euphoria hebecarpa*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3(2): 75-82
- [17] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. 2007, Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-*Nrf2*-ARE pathway. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 47: 89-116.
- [18] Kilroy EG, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, et al. 2007, Cytokine profile of human adiposederived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of Cellular Physiology*, 212(3): 702-709.
- [19] Kim YJ, Baek SH, Bogner PN, Ip C, Rustum YM, Fakhri MG, et al. 2007, Targeting the *Nrf2*-Prx1 pathway with selenium to enhance the efficacy and selectivity of cancer therapy. *Journal of Molecular Cancer*, 3(2):37-43.
- [۱] بشیری نهنجی، ح.، حبیبی، م. ۱۳۹۲، پیش شرطی کردن سلول های بنیادی مزانشیمال با غلظت های بهینه H_2O_2 به منظور افزایش بقای سلولی و افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو، فصلنامه پژوهشی خون، دوره دهم، شماره ی سوم، صفحات ۲۶۶-۲۵۵.
- [۲] حسینی، ع.، حلییان، ر.، حامدی اصل، ژ. ۱۳۹۲، تاثیر اتوفاژی بر بقای سلول های بنیادی مزانشیمال پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو، فصلنامه پژوهشی خون، دوره دهم، شماره ی یکم، صفحات ۵۲-۴۰.
- [3] Aggarwal S, Pittenger MF. 2005, Human mesenchymal stemcells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4): 1815-1822
- [4] Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. 2009, p53 regulates the proliferation differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 315(20): 3598-3610.
- [5] Barry FP, Murphy JM. 2004, Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4): 568-584.
- [6] Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG. 2002, *Nrf2* transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15):5492-5505.
- [7] Cao TT, Ma L, Kandpal G, Warren L, Hess JF, Seabrook GR. 2005, Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells
- [8] against oxidative damage. *Journal of Neurochemistry*, 95(2):406-417.
- [9] Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, Vargas MR, Dowell JA, Williamson TP, et al. 2009, The *Nrf2/ARE* pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(3):497-508.
- [10] Canella R, Benedusi M, Martini M, Cervellati F, Cavicchio C, Valacchi, G. 2018, "Role of *Nrf2* in preventing oxidative stress induced chloride current alteration in human lung cells," *Journal of Cellular Physiology*, 233(8): 6018-6027.

- [20] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. 2004, Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109(12): 15431-1549.
- [21] Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, et al. *Nrf2*, a multi-organ protector?
- [22] Lee KA, Shim W, Paik MJ, Lee SC, Shin JY, Ahn YH, et al. 2009, Analysis of changes in the viability and geneexpression profiles of human mesenchymal stromal cells over time. *Cytotherapy*, 11(6): 688-697.
- [23] Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirzadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, et al. 2012, *Nrf-2* overexpression in mesenchymal stem cells cytotoxicity. *cell stress chaperones journal*, 17(5): 553- 565.
- [24] Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, et al. 2008, Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *stem cells journal*, 26(8):2075-2082.
- [25] Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. 1989, A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *Journal of Cell Science*, 92(3): 513-518.
- [26] Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, et al. 2003, Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(5): 879-888.
- [27] Parellada M, Moreno C, Mac-Dowell K, Leza JC, Giraldez M, Bailón C, et al. 2012, Plasma antioxidant capacity is reduced in Asperger syndrome. *Journal of Psychiatric Research*, 46: 394-401.
- [28] Peterson SM, Freeman JL. 2009, RNA Isolation from Embryonic Zebrafish and cDNA Synthesis for Gene Expression Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, (30): 1470.
- [29] Qiao W L, Yin H. 2009, Genetic ablation of *Nrf2* enhances susceptibility to acute lung injury after traumatic brain injury in mice. *Experimental Biology and Medicine*, 234(2):181-189.
- [30] Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, Klaassen CD. 2009, Increased *Nrf2* activation in livers from *keap1*- knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*, 108(1): 35-47.
- [31] Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. 2008, Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(4): 567-581.
- [32] Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. 2005, Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 140(1): 138-143
- [33] Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. 2010, Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5(2): 103-110.
- [34] Segal AW. 2005, How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology Journal*, 23 (5): 197223.
- [35] Schwartz L, Maitournam H, Stolz JM, Ho Ba Tho MC, Halphen B. 2003, Growth and cellular differentiation: a physicochemical conundrum? The example of the hand. *Journal of Medical Hypotheses*, 61(1): 45-51.
- [36] Surh YJ, Kundu JK, Na HK. 2008, *Nrf2* as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*, 74(13):1526-1539.
- [37] JA, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, et al. 2008, Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(1): 74-82.

[42] Xiang MX, He AN, Wang JA, Gui C. 2009, Protective paracrine effect of mesenchymal stem

cells on cardiomyocytes. Journal of Zhejiang University Science B, 10(8): 619-24

Study of the effect of oxidative stress on *Nrf-2* cell signaling pathway in mesenchymal stem cells (MSCs)

Bostani P.¹, Khojaste E.², Ahmadizadeh Ch.^{2*}

¹ Department of biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran

² Department of biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Alavi Moghaddam F. S.¹, Hashemi M.^{2*}, Siyasi E.³

* Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

Received: July 2020

Accepted: January 2020

Abstract

The study of mesenchymal stem cells showed that induction of autophagy in MSCs increased sensitivity to oxidative stress. Autophagy induced resistance of MSCs to oxidative stress and increased survival of MSCs compared to control cells. The aim of this study was to investigate the effect of oxidative stress on the *Nrf2* cell signaling pathway in mesenchymal stem cells. The present study was conducted at the Pharmaceutical Micro-Technology Research Center of Tabriz Medical Sciences in 2017. In this experimental study, mesenchymal stem cells were cultured in DMEM-F12 medium and after trypsinization, re-culture was performed and the fourth cell passage was selected. Then it was examined using MTT assay method. DNA extraction was performed from treated cells and DNA Ladder assay was performed. After cDNA preparation, the expression of *Nrf2* genes in mesenchymal stem cells was measured by real-time PCR. Data analysis was performed using SPSS software. The results showed that oxidative stress could activate the *Nrf2*-Nrf2 cell signaling pathway and that stem cells could inhibit stress through this pathway. Therefore, it is necessary to strengthen this pathway through dietary antioxidants and supplements to increase the effectiveness of cell therapy.

Keywords: Oxidative Stress, Stem Cells Mesenchymal, *Nrf2*.