فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۳ ص. ۷۱-۶۳

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمنیوتیک، به صورت مستقیم و غیرمستقیم در نارسایی کلیوی القا شده با ایسکمی حاد قلبی در رت‌های نر نژاد ویستار

امیر اکبری آرمند[۱]، مهسا آل ابراهیم[۲*]، نوشین باریک رو[۱]، فاطمه روح الله[۱]

[۱] گروه علوم سلولی و مولکولی، علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲*] گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): mahsa.alebrahim@yahoo.com

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۳

چکیده

مقدمه: بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ایسکمی قلبی و همچنین نارسایی کلیوی متعاقب آن شیوع بسیار بالایی دارند و روش‌های درمانی موجود برای این بیماران، پرخطر و هزینه بر می‌باشند. دانشمندان با انتقال سلول‌های بنیادی مزانشیمی امیدوارند بتوانند بافت‌های مرده را جایگزین کرده و سبب فعالیت دوباره قسمت‌های آسیب‌دیده قلب و در نتیجه بافت کلیه گردند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمنیوتیک با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری پرداخته شد. رت‌ها به ۳ گروه ۱۲ تایی، شامل نارسایی قلبی (HF) به عنوان گروه شاهد، HF+ hAMSCs تزریق به قلب و HF+ hAMSCs تزریق به کلیه، تقسیم شدند. سپس با روش بستن LAD، مدل ایسکمی حاد قلبی در رت‌ها ایجاد کرده و سلول‌ها به قلب آسیب دیده و بافت کلیه به طور جداگانه تزریق شدند، سپس بعد از ۲ روز و ۳۰ روز با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی TNF- در بافت کلیه بررسی گردید و مقادیر سرمی اوره وکراتینین در روز ۲ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث: ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط فلوسایتومتری تایید گردید. سپس در فاز حیوانی اثرات سلول‌ها بر روی قلب و کلیه رت‌ها بررسی شدند، با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF- در روز ۲، در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود نداشت ($P>0.05$) و در روز ۳۰، گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنا دار داشته است ($P<0.05$). مقادیر سرمی اوره و کراتینین در روز ۲ بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($p<0.05$) و در روز ۳۰ بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل اختلاف معنا داری وجود داشته است ($P<0.05$). همان طور که انتظار می‌رود درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و آسیب کلیوی متعاقب آن، اثر درمانی معناداری نسبت

به گروه کنترل نداشته است، اما پس از ۳۰ روز گروه‌های درمانی به خصوص گروه تزریق سلول به کلیه، توانسته است سبب کاهش التهاب، بهبود ناحیه ی آسیب دیده و کاهش فیبروز در بافت کلیه گردد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، غشای آمنیوتیک، ایسکمی حاد قلبی، نارسایی کلیه، رت نر نژاد ویستار.

مقدمه

نارسایی قلبی پس از انفارکتوس قلبی اتفاق می‌افتند و می‌تواند به مرگ ناگهانی منجر شوند و در واقع هیچ دارویی برای درمان قطعی بیماری نارسایی قلبی وجود ندارد. انفارکتوس میوکارد موجب کاهش پیشرونده در عملکرد کلیه می‌شود؛ با این حال مطالعات کمی در مورد پاتوفیزیولوژی آن وجود دارد [۱]. انفارکتوس میوکارد فرآیندی است که در اثر توقف یا کاهش خون رسانی در عروق کرونر به دنبال انسداد یکی از شاخه‌های عروق کرونر و توقف ناگهانی جریان خون و کمبود اکسیژن به عضله قلب ایجاد می شود. انفارکتوس میوکارد یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده زندگی است که ممکن است از طریق استرس اکسیداتیو و التهاب منجر به اختلالات کلیوی شود. به طور کلی، قلب و کلیه‌ها از نظر فیزیولوژیکی و هورمونی تعاملات پیچیده‌ای دارند. به عبارت دیگر، اختلال در عملکرد قلب بر کلیه‌ها و بالعکس تأثیر می‌گذارد. اختلال عملکرد کلیه در میان بیماران نارسایی قلبی شایع است و با افزایش بستری شدن در بیمارستان و مرگ و میر همراه است. به طور گسترده‌ای شناخته شده است که مکانیسم‌های کمک‌کننده به پاتوژنز نارسایی قلبی شامل یک تعامل پیچیده دو طرفه بین کلیه و قلب است، همچنین محققان دریافتند که بیماری حاد نارسایی قلبی می‌تواند باعث آسیب حاد کلیه شود همچنین نارسایی مزمن قلبی اغلب منجر به بیماری مزمن کلیه می‌شود [۲, ۳].

بیماران با نارسایی پیشرفته کلیه که تحت دیالیز (همودیالیز یا دیالیز صفاقی) قرار می‌گیرند، علیرغم بهبود توسط روش‌های تکنیکی و درمان آنمی با اریتروپویتین و کنترل وضعیت الکترولیتی بدن، همچنان در معرض بیماری‌های کاردیوواسکولر، نوروپاتی اتونوم و محیطی، بیماری‌های استخوان، اختلال در فعالیت‌های جنسی و ناتوانی در انجام فعالیت‌های روزانه خود هستند و برای بیشتر بیماران با نارسایی کلیه، پیوند کلیه بهترین و بزرگ‌ترین اقدام درمانی برای برگشت به زندگی عادی تلقی می‌شود [۴]. امروزه علوم مهندسی بافت برای درمان آسیب‌های بافتی و انواع مختلفی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی و کلیوی مورد توجه محققان قرار گرفته است. برای این منظور با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تحت تأثیر فاکتورهای مختلف رشد در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی، بدون وابستگی به بدن موجود زنده و به طور مستقل طراحی بافت انجام می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل خاصیت تمایز و تکثیر، منبع مناسبی برای بازسازی سلول‌های عضله‌ی قلب و همچنین کلیه می‌باشند. به نظر می‌رسد درمان به وسیله‌ی سلول‌های بنیادی یک سری فرآیندهای درونی بازسازی را فعال می‌کند که موجب تحریک بازسازی سلول‌ها می‌شوند [۵]. سلول‌های مزانشیمی جدا شده از غشاء آمنیوتیک نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از دیگر منابع، قدرت تمایزی بیشتری دارند. شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از آمنیوتیک مدت زمان کوتاه‌تری، برای بازسازی بافت در مقایسه با سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از منابع دیگر نیاز دارد [۶, ۷].

در این طرح از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از غشاء آمنیوتیک برای درمان آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی حاد قلبی به صورت غیر مستقیم (تزریق سلول به قلب) و به صورت مستقیم (تزریق سلول به کلیه) استفاده شد و اثرات سلول‌درمانی ایسکمی قلب بر روی کلیه رت‌ها از طریق بررسی سرمی کراتینین، اوره و بررسی پروتئین TNF-α بررسی گردید. مقادیر سرمی کراتینین، اوره و BUN محصولات جانبی متابولیسم عضله و شاخص عملکرد کلیه هستند. فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) یک سایتوکین التهابی است که نقش مهمی در پاتوژنز عملکرد قلب و عروق و کلیه دارد. در جریان التهاب نیز، میانجی‌های مختلفی توسط سلول‌های سیستم ایمنی، همانند سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α ترشح می‌شود که باعث تشدید پاسخ ایمنی می‌گردد [۸, ۹]. هدف از این مطالعه مقایسه‌ی اثرات درمانی استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمنیوتیک به صورت مستقیم و غیر مستقیم در نارسایی کلیوی القا شده با ایسکمی حاد قلبی در رت‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

تهیه و تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشاء آمنیوتیک

سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمنیوتیک از مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران تهیه شدند. سلول‌ها جهت انجام کار آزمایشگاهی به آزمایشگاه مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی انتقال یافتند. در محیط آزمایشگاه تا پاساژ ۷ کشت داده شدند. جهت تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جمله CD105، CD90، CD73، CD34 وCD45 توسط فلوسایتومری بررسی شدند.

مدل حیوانی

تعداد ۴۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) با محدوده وزنی ۳۰۰-۳۵۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و به اتاق حیوانات بیمارستان شهید رجایی تهران منتقل شدند. حیوانات در قفس‌های فایبرگلاس به ابعاد ۳۵×۳۰×۱۵ سانتی‌متر و تحت شرایط استاندارد با درجه حرارت ۲ ±۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد نگه‌داری شدند.

گروه بندی و القای ایسکمی حاد قلبی

گروه ایسکمی: در این گروه نارسایی قلبی ایجاد شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات به عنوان حامل سلول (به تنهایی و بدون سلول) در محل ضایعه قلبی تزریق شد (n=۱۲).

گروه ایسکمی + سلول تزریق به قلب: در این گروه نارسایی قلبی ایجاد شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات به عنوان حامل سلول به همراه سلول بنیادی مزانشیمی (تعداد دو میلیون سلول) در پاساژ۵ به محل ضایعه قلبی تزریق شدند (n=۱۲).

گروه ایسکمی + سلول تزریق به کلیه: در این گروه نارسایی قلبی ایجاد شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات به عنوان حامل سلول به همراه سلول بنیادی مزانشیمی (تعداد دو میلیون سلول) در پاساژ ۵ بدون به صورت مستقیم به بافت کلیه تزریق شدند (n=۱۲).

ابتدا هر حیوان با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین (۸۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و به حالت خوابیده به پشت بر روی تخت مخصوص جراحی رت تثبیت شدند. سپس موهای ناحیه سینه‌ای با تیغ اصلاح تراشیده شد. سپس با استفاده از اتوسکوپ شماره ۳ و آنژیوکت سبز حیوان اینتوبه و به دستگاه ونتیلاتور وصل شد. سپس قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای سوم و چهارم با استفاده از قیچی به طول ۱۰ میلی‌متر برش داده شد. با این برش، رگ left anterior descending (LAD) به صورت یک spike ضربان‌دار قرمز روشن که در قسمت میانی دیواره قلب از زیر دهلیز چپ تا رأس قلب جریان دارد مشخص شد. رگ LAD به کمک نخ بخیه پلی پروپیلن ۰/۶ به اندازه ۲-۱ میلی‌متر پائین تر از نوک دهلیز چپ بسته شد و با زدن دو گره در این نقطه کاملا مسدود شد. در نتیجه القاء ایسکمی با این روش، ایجاد ایسکمی در دیواره قدامی بطن چپ به صورت تغییر رنگ ناگهانی (بیرنگ شدن) میوکارد تایید شد. بلافاصله بعد از ایجاد ایسکمی، درمان انجام شد. سپس لایه‌های عضلانی با استفاده از نخ بخیه پرولن ۰/۵ دوخته شد. و پوست حیوان با نخ بخیه نایلون ۰/۴ یا پرولن ۰/۳ بخیه زده شد.

سنجش فاکتورهای خونی

اوره و کراتینین فرآورده‌های جانبی زائد و حاصل سوخت و ساز در بدن هستند و چون فقط توسط کلیه‌ها دفع میشوند در واقع سطح خونی آنها معیار عملکرد نرمال کلیه‌ها می‌باشد. زمانی که به هر دلیلی در عملکرد کلیه‌ها اختلال ایجاد شود میزان کراتینین و اوره بعلت عملکرد ضعیف کلیه‌ها در تصفیه خون، افزایش می‌یابد. از این رو میتوان افزایش غیرعادی اوره و کراتینین را هشدار در مورد عملکرد ضعیف یا نارسایی کلیه دانست [۱۰].

تکنیک ایمونوهیستوشیمی

نمونه با PBS(P4417-Sigma) در۳ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول‌ها به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها با PBS شستشو داده شدند و سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۴۵ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی‌بادی ثانویه به نمونه‌ها اضافه گردید. آنتی‌بادی اولیه رقیق شده۱ به ۱۰۰ با PBS

را بر روی نمونه‌ها ریخته و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت ظرف حاوی بافت از یخچال خارج و ۴ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. سپس آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل و بعد از ۳ بار شستشو، به آنها DAPI (D9542- Sigma) اضافه گردید. پس از 20دقیقه نمونه با PBS شستشو داده شد. محلول گلیسرول و PBS را بر روی نمونه ریخته و لامل به منظور عکس‌برداری فلورسنت با میکروسکوپ (Olympus) برای تایید مارکرها قرار داده شدند.

ملاحظات اخلاقی

در تمام موارد، مسائل اخلاقی بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران رعایت گردید و کد اخلاق دریافت گردید (IR.IAU.PS.REC). حیوانات طبق مقررات در حیوان‌خانه مرکز قلب و عروق شهید رجائی نگهداری شدند. همچنین حیوانات در حین کار کاملا بیهوش می‌شدند تا دردی احساس نکنند. برای کاهش درد و عفونت بعد از جراحی از مرفین و پماد تتراسایکلین استفاده می شد. در حین عمل، چشم حیوان با پماد چشمی استریل ویتامین A مرطوب می‌گردید تا از خشکی و کدورت قرنیه بعد از عمل جلوگیری شود.

تحلیل آماری

تمام آزمایشات حداقل با سه بار تکرار انجام شد و در این مطالعه برای توصیف داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. برای مقایسه میانگین دو گروه مستقل از آزمون T-test و برای مقایسه میانگین بیش از دو گروه از آزمون One-way ANOVA استفاده گردید و نتایج به صورت p-value< 0.05 از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

نتایج بخش *in vitro*

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، با تکنیک فلوسایتومتری بررسی شدند. با توجه به نتایج به دست آمده از بیان مارکرهای CD73, CD29 ,CD44 و CD105 که مثبت بوده و CD34 و CD45 که بیان منفی داشتند، نشان دهنده‌ی این است که سلول‌های استفاده شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده‌اند (شکل ۱).

نتایج بخش in vivo

نتایج بررسی بیوشیمیایی کراتینین و اوره سرم خون

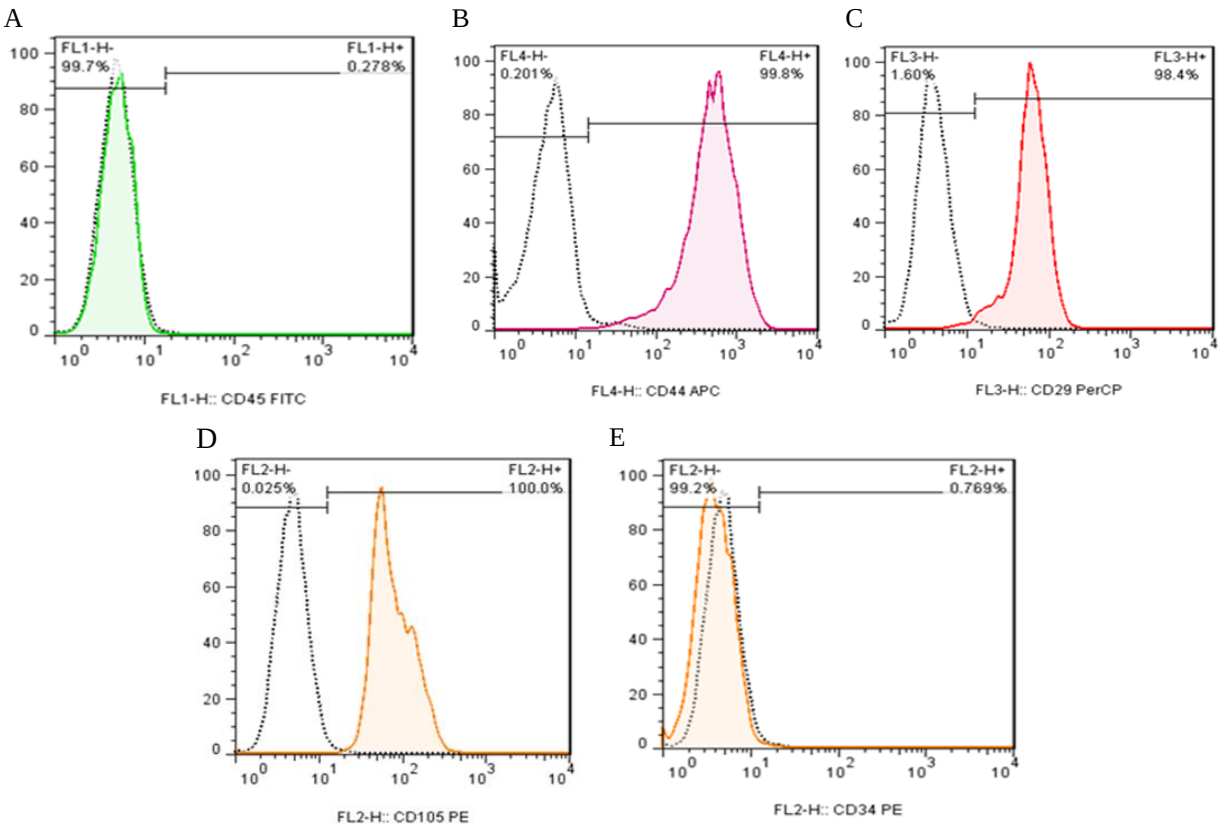
آنالیز سطح سرمی کراتینین و اوره پس از ۲ و ۳۰ روز انجام گردید (شکل ۲)، با توجه به نتایج، میزان سطح کراتینین و اوره پس از ۲ روز در گروه درمانی با گروه کنترل، تفاوت معناداری نداشته است اما میزان سطح کراتینین و اوره ۳۰ روز پس از القای ایسکمی در گروه درمانی تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است ($P<0.05$).

نتایج بررسی پروتئین TNF- با ادستفاده از ایمونوهیستوشیمی

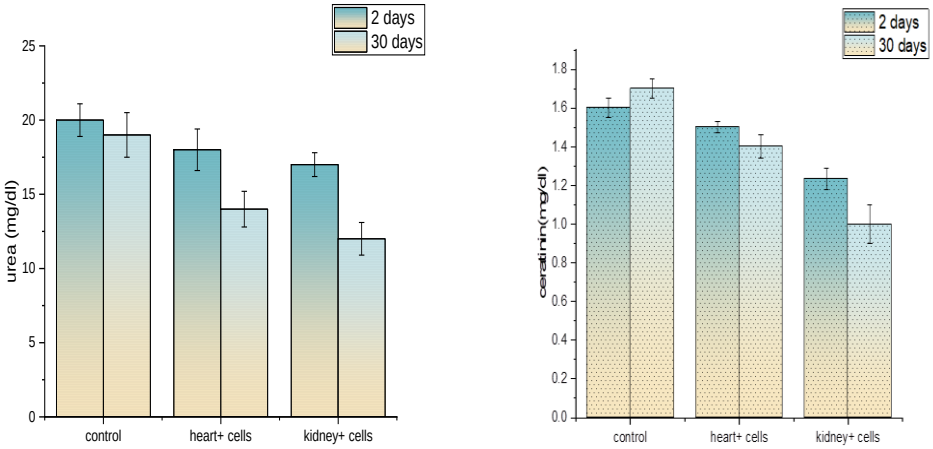
بیان پروتئین TNF- در بافت کلیه در روز ۲ و روز ۳۰ توسط تکنیک ایمنوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی میزان التهاب در گروه‌های درمانی تزریق سلول به قلب، گروه درمانی تزریق سلول به کلیه و گروه کنترل، پروتئین TNF- مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳).

بحث:

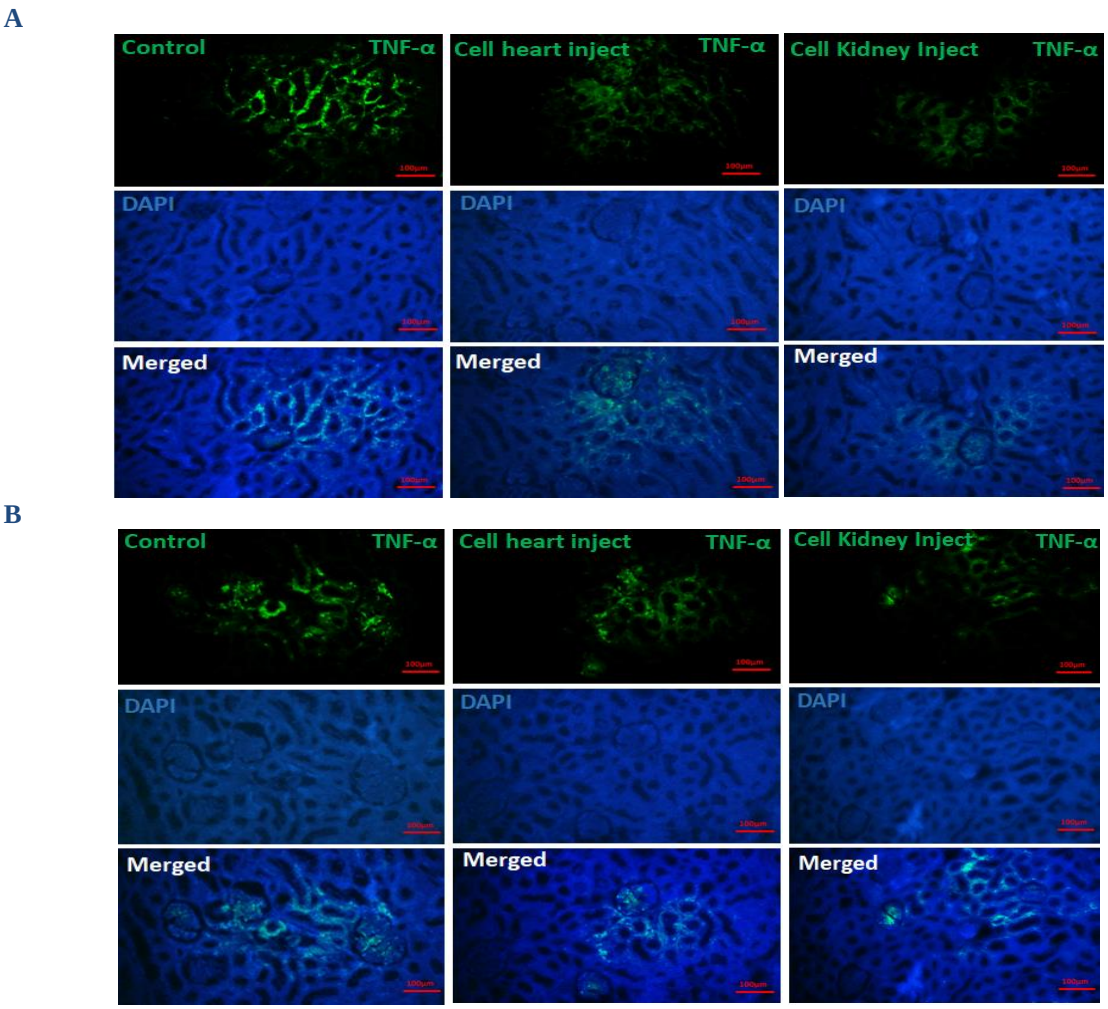
بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ایسکمی قلبی و همچنین نارسایی کلیوی متعاقب آن شیوع بسیار بالایی دارند و روش‌های درمانی مورد استفاده در این بیماران پرخطر و هزینه بر می‌باشند [۱۱]. از دست رفتن شدید عملکرد کلیه، چه به طور حاد و چه به طور مزمن، تهدیدی برای زندگی بوده و نیاز به خارج کردن فرآورده‌های زاید سمی و بازگرداندن حجم و ترکیب مایعات بدن به‌سوی میزان طبیعی دارد. در حال حاضر دو روش اصلی برای درمان نارسایی مورد استفاده قرار می‌گیرد: یک روش پیوند کلیه است که به‌علت تعداد کم اهدا کنندگان در مقابل تعداد متقاضیان محدود می‌شود، روش دیگر دیالیز است که آن نیز با

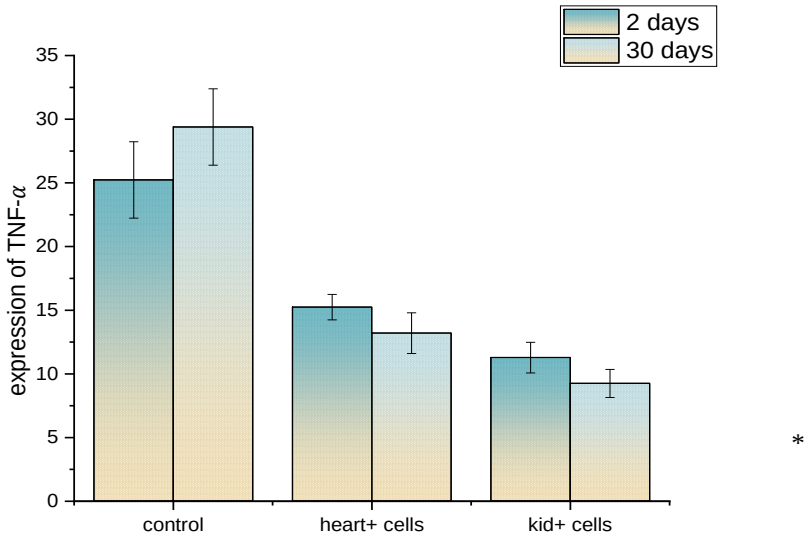


شکل ۱- بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمنیوتیک، با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری: هیستوگرام (A) بیان آنتی‌ژن CD45 =۰/۲۷%، هیستوگرام (B) بیان آنتی‌ژن CD44 =۹۹/۸%، هیستوگرام (C) CD29 =۹۸/۴% هیستوگرام (D) بیان آنتی‌ژن CD105 =۱۰۰ % هیستوگرام (E) بیان آنتی‌ژن CD34 = ۰/۷۶%، باتوجه به نمودارهای فوق، سلول‌های استفاده شده در این طرح، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند.



شکل ۲- اندازه‌گیری اوره سرم در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($p>0.05$). اندازه‌گیری اوره سرم در روز ۳۰ پس از القای ایسکمی قلبی بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل اختلاف معناداری وجود داشته است ($p<0.05$*). اندازه‌گیری کراتینین سرم در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($p<0.05$). اندازه‌گیری کراتینین سرم در روز ۳۰ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل، اختلاف معناداری وجود داشته است ($p<0.001$***). بین گروه تزریق سلول به کلیه و قلبی در روز ۳۰ اختلاف معناداری وجود داشته است ($p<0.05$#).





شکل۳- نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، A- بررسی بیان TNF-α پس از ۲ روز، در گروه‌های کنترل، گروه‌های تزریق سلول به قلب، گروه‌های تزریق سلول به کلیه. با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF-α در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود نداشت($P>0.05$) .B- بررسی بیان TNF-α پس از ۳۰ روز، در گروه‌های کنترل، گروه‌های تزریق سلول به قلب، گروه‌های تزریق سلول به کلیه. با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF-α در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنا دار داشته است($P<0.05$*). Scale bar =100 μm.

محدودیت‌هایی همراه است [۲]. وجود چنین محدودیت‌هایی در درمان نارسایی‌های کلیوی منجر به جست و جوی روش‌های درمانی دیگر شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان نارسایی کلیوی در جانوران مدل، نتایج امیدوار کننده‌ای به‌دنبال داشته‌اند. در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به نقش تعدیل‌کننده سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چند ظرفیتی هستند که به انواع مختلفی از سلول‌ها مانند استخوان، بافت چربی، استروما تبدیل می‌شوند و نیز باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌گردند [۱۲-۱۵].

MSCها بر انواع سلول‌های ایمنی بدن نظیر لنفوسیت‌هایT، لنفوسیت‌هایB، سلول‌های کشنده‌ی طبیعی (NK) و سلول‌های دندریتیک اثر مهاری داشته و در نهایت سبب کاهش و تنظیم پاسخهای ایمنی می‌شوند. علاوه بر این، MSCها بیان MHC کلاس II، CD11، CD83 و مولکول‌های کمک محرک را بر سطح مونوسیت‌ها کاهش می‌دهند. بنابراینMSC ها باعث کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی از جمله TNF-α و IL-12 12-14می‌شوند[۱۶]. در حالتی که ایسکمی قلبی رخ می‌دهد فاکتورهای NFK-β در ناحیه ی آسیب دیده‌ی قلبی و همچنین کلیه (به دلیل وارد شدن آسیب متعاقب از ایسکمی قلبی) افزایش می‌یابد، افزایش مسیر سیگنالینگ استرس اکسیداتیو که باعث افزایش افزایش NFK-β شده و افزایش این ژن در هسته سبب بیان ژن‌های التهابی دیگر نظیر TNF-α می‌شود، زمانی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ناحیه‌ی ایسکمی قلبی تزریق می‌شوند می‌توانند سبب مهار NFK-β و کاهش TNF-α شوند. در نتیجه می‌توانند باعث کاهش التهاب و بهبود در کلیه‌ی آسیب دیده شوند [۱۷, ۱۸].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق فعال کردن همین مسیر AKT می‌توانند سبب افزایش مهاجرت سلولی به ناحیه ایسکمی قلبی شده و با فعال کردن مسیر AKT/ PI3K می‌توانند سبب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به VEGF شود و از همین طریق باعث بهبود عملکرد قلب شده و از طریق افزایش خون‌رسانی و ترشح یک سری بیومولکول‌ها و سایتوکین‌ها می‌توانند باعث بهبود کلیه‌ی آسیب دیده شوند [۱۷, ۱۹].

Mohammad Maram Ghartavol و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی اثر ایسکمی قلبی ایجاد شده در رت توسط ایزوپرنالین بر عملکرد کلیه پرداختند که با اندازه‌گیری سطح سرمی کراتینین و بررسی پروتئین TNF-α توسط ایمونوهیستوشیمی، شاهد بروز آسیب و کاهش عملکرد کلیوی بودند و مشاهده کردند که ایسکمی قلبی اثر منفی مستقیم بر کلیه دارد و می تواند موجب بروز نارسایی کلیه شود (۹].

Srikanth Yandrapalli و همکاران در سال ۲۰۲۲ به بررسی آسیب حاد و مزمن کلیوی، که به دنبال انفارکتوس حاد میوکارد بوجود می‌آید، پرداختند. تفاوت‌ها را در گروه‌های بیماران بدون آسیب کلیوی پس از انفارکتوس میوکارد، تجزیه و تحلیل کردند. در نتیجه، از هر۴ بازمانده انفارکتوس میوکارد، ۱نفر نارسایی حاد یا مزمن کلیوی داشت. وجود هر شکلی از نارسایی کلیوی باعث افزایش قابل توجهی در بستری شدن و مرگ و میر بیماران قلبی دارد [۲۰].

با توجه به نتایج مطالعه ی فوق که در جهت نتیجه‌ی طرح حاضر بوده، ایسکمی قلبی میتواند سبب بروز آسیب کلیوی گردد که در این طرح به درمان آن توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته شد.

در طرح حاضر پس از تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط تکنیک فلوسایتومتری و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوان و چربی در قسمت *IN VIVO* ، از این سلول‌ها جهت درمان آسیب‌های کلیوی ناشی از ایسکمی قلبی حاد در رت‌ها استفاده شد. با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی میزان بیان پروتئین TNF-α و همچنین مقادیر سرمی اوره وکراتینین در روز ۲ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

در راستای این تحقیقات Yubo Peng و همکاران در سال ۲۰۲۰ به مطالعه‌ی اثرات درمانی دوزهای متفاوت نیترات بر آسیب کلیه متعاقب از نارسایی قلبی پرداختند. آن‌ها مشاهده کردند که نفوذ سلول‌های التهابی به سلول‌های بینابینی و اطراف آن و گلومرول کلیوی و نکروز توبولار در تمام گروه‌های درمانی به درجات مختلف کاهش یافت و نتیجه گرفتند که بهبود سلول‌های عضله‌ی قلب می‌تواند سبب بهبود عملکرد کلیه شود [۲۱].

با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF-α ، ۲روز پس از شروع درمان در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما اختلاف معناداری

بین گروه‌ها وجود نداشت (P>0.05) . همچنین بررسی بیان TNF-α پس از ۳۰ روز، میزان بیان پروتئین TNF-α در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشته است (P<0.05). همان طور که انتظار می‌رود سلول‌های بنیادی مزانشیمی بتوانند سبب مهار NFK-β و کاهش TNF-α در بافت‌های تزریق شده شوند؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های درمانی تزریق سلول به قلب و کلیه توانسته‌اند سبب کاهش فاکتور TNF-α گردند، که گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشته است و سبب کاهش التهاب شده‌اند.

نتایج اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم، در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نشان می‌دهد که بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری وجود نداشته است (p>0.05) و اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم، در روز ۳۰ پس از القای ایسکمی قلبی بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل اختلاف معناداری وجود داشته است (p<0.05). همان طور که فرض می‌شد تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت مستقیم به بافت کلیه بتواند اثر درمانی بیشتری در بافت کلیه آسیب دیده داشته باشد، نتایج بررسی اوره و کراتینین سرم، در تایید فرضیه فوق می‌باشد، در گروه‌های درمانی تزریق مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت کلیه، میزان اوره و کراتینین کاهش معنادار پیدا کرده است.

نتیجه‌گیری:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل خاصیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی، عدم رد پیوند در میزبان و هم چنین به دلیل داشتن خاصیت خودنوزایی و تمایز می‌توانند منبع مناسبی برای سلول‌درمانی و درمان نارسایی کلیه باشند، همچنین مقدار مناسب جهت تزریق سلول‌ها به قلب و کلیه رت‌ها، ۲ میلیون سلول بود و بهترین زمان تزریق سلول‌ها، بلافاصله پس از ایجاد ایسکمی می باشد.

Refrence:

[1] Mokhtari B, Aboutaleb N, Nazarinia D, Nikougoftar M, Razavi Tousi SMT, Molazem M, et al. Comparison of the effects of intramyocardial and intravenous injections of human mesenchymal stem cells on cardiac regeneration after heart failure. Iran J Basic Med Sci. 2020; 23(7): 879-85.

[2] Zakeri R, Burnett JC, Jr., Sangaralingham SJ. Urinary C-type natriuretic peptide: an emerging biomarker for heart failure and renal remodeling. Clin Chim Acta. 2015;443:108-13.

[3] Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Balby-Rocha MTA, Lira ÁdO, Rangel ÉB. Mesenchymal stem cell therapy in acute kidney injury (AKI): review and perspectives. 2020.

[4] Missoum A. Recent Updates on Mesenchymal Stem Cell Based Therapy for Acute Renal Failure. 2020.

[5] Dergilev KV, Shevchenko EK, Tsokolaeva ZI, Beloglazova IB, Zubkova ES, Boldyreva MA, et al. Cell Sheet Comprised of Mesenchymal Stromal Cells Overexpressing Stem Cell Factor Promotes Epicardium Activation and Heart Function Improvement in a Rat Model of Myocardium Infarction. Int J Mol Sci, 2020; 21(24).

[6] Jiao H, Shi K, Zhang W, Yang L, Yang L, Guan F, et al. Therapeutic potential of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells in APP transgenic mice. Oncol Lett. 2016; 12(3):1877-83.

[7] Ra K, Oh HJ, Kim EY, Kang SK, Ra JC, Kim EH ,et al. Comparison of Anti-Oxidative Effect of Human Adipose- and Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Mouse Preimplantation Embryo Development. Antioxidants (Basel). 2021; 10(2).

[8] Deicher A, Seeger T. Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Model System for Heart Failure. Curr Heart Fail Rep. 2021;18(1):1-11.

[9] Ghartavol MM, Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Babaei G, Hossein Farjah G, Hassan Khadem Ansari M. The protective impact of betaine on the tissue structure and renal function in isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. Mol Genet Genomic Med. 2019; 7(4): e00579.

[10] Hafazeh L, Changizi-Ashtiyani S, Ghasemi F, Najafi H, Babaei S, Haghverdi F. Stem Cell Therapy Ameliorates Ischemia-reperfusion Induced Kidney Injury After 24 Hours Reperfusion. 2019.

[11] Ou H, Teng H, Qin Y, Luo X, Yang P, Zhang W, et al. Extracellular vesicles derived from microRNA-150-5p-overexpressing mesenchymal stem cells protect rat hearts against ischemia/reperfusion. Aging (Albany NY). 2020; 12(13): 12669-83.
[12] Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 2019; 10(1):1.
[13] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. Cell Transplant. 2015; 24(3): 339-47.
[14] Steichen C, Erpicum P. Combining cell-based therapy and normothermic machine perfusion for kidney graft conditioning has gone one step further. 2021.
[15] Huang J, Kong Y, Xie C, Zhou L. Stem/progenitor cell in kidney: characteristics, homing, coordination, and maintenance. 2021.
[16] Bai M, Zhang L, Fu B, Bai J, Zhang Y, Cai G. IL-17A improves the efficacy of mesenchymal stem cells in ischemic-reperfusion renal injury by increasing Treg percentages by the COX-2/PGE2 pathway. 2018 (93): 814–25.
[17] Zhang J, McCullough PA. Lipoic Acid in the Prevention of Acute Kidney Injury. 2016.
[18] Grange C, Skovronova R, Marabese F, Bussolati B. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Kidney Regeneration. 2019.
[19] Shukla A, Choudhury S, Chaudhary G, Singh V, Prabhu SN, Pandey S, et al. Chitosan and gelatin biopolymer supplemented with mesenchymal stem cells (Velgraft(R)) enhanced wound healing in goats (Capra hircus): Involvement of VEGF, TGF and CD31. J Tissue Viability. 2021; 30(1): 59-66.
[20] Yandrapalli S, Christy J, Malik A, Wats K, Harikrishnan P, Aronow W, et al. Impact of Acute and Chronic Kidney Disease on Heart Failure Hospitalizations After Acute Myocardial Infarction. Am J Cardiol. 2022; 165: 1-11.
[21] Peng Y, Li Y, Chen M, Song J, Jiang Z, shi S. High-dose nitrate therapy recovers the expression of subtypes α1 and β adrenoceptors and Ang II receptors of the renal cortex in rats with myocardial infarction-induced heart failures. 2020.

Comparison of the therapeutic effects of amniotic membrane mesenchymal stem cells, directly and indirectly, in renal failure induced by acute cardiac ischemia in male Wistar rats

Akbari Armand A.[1], Ale-Ebrahim M.[2*], Barikrow N.[1], Rohollah F.[1]

[1] Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2*] Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): mahsa.alebrahim@yahoo.com

Received: Aguste 2024 Accepted: December 2024

Abstract

Cardiac ischemia and subsequent renal failure are very common. The researchers found that with the transfer of stem cells, dead tissues can be replaced and cause the damaged parts of the heart and thus the kidney tissue to function again. Materials and methods: Mesenchymal stem cells (MSCs) of amniotic membrane were analyzed by flow cytometry. The rats were divided into 3 groups of 12, including heart failure (HF) as a control, HF+ hAMSCs injected into the heart, and HF+ hAMSCs injected into the kidney. Then, with LAD closure method, an acute cardiac ischemia model was created in rats and cells were injected into the damaged heart and kidney tissue separately, after 2 and 30 days using immunohistochemistry, TNF-α in kidney tissue and urea and creatinine serum levels was investigated. Results and discussion: the effects of the cells on the heart and kidneys of rats were investigated, according to the immunohistochemical results, the level of TNF-α protein expression was significantly decreased on day 30, in the group of cells injected into the kidney compared to the control ($P<0.05$). There was a significant difference in the serum urea and creatinine values between the kidney cell injection and control on day 30 ($P<0.05$). Treatment with MSCs on the 2nd day after the induction of cardiac ischemia and subsequent kidney damage did not have a significant therapeutic effect compared to the control, but on the 30th day, the treatment groups, especially the kidney cell injection group, were able to reduce inflammation, improve the damaged area and decrease Fibrosis in kidney tissue.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Amniotic Membrane, Acute cardiac ischemia, male Wistar rats.