

بررسی اثر محیط کشت حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی بر نارسایی حاد کلیوی ناشی از سیس پلاتین در موش صحرایی

سارا طالب گلستانی^{۱*}، مهناز آذرنیا^۲ Ph.D.، منصور جمالی^۳ Ph.D.، فریبرز معیر^۴ Ph.D.

۱- کارشناس ارشد تکوینی جانوری، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، تهران، ایران

۳- گروه پاتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: golestani_sara64@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۹

چکیده

هدف: سیس پلاتین یکی از موفق ترین داروها برای مقابله با بسیاری از سرطان ها است، اما میزان سمیت حاد کلیوی بالای آن، تجویز این دارو را محدود می کند. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر فاکتورهای ترشحي سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی بر نارسایی حاد کلیوی ناشی از سیس پلاتین در موش صحرایی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه از موش صحرایی نر، نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند و در هر گروه شش حیوان قرار گرفت. یک گروه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که هیچ تزریقی در حیوانات این گروه صورت نگرفت. سه گروه دیگر سیس پلاتین را به صورت داخل صفاقی با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم یک بار در ابتدای آزمایش دریافت کردند. سپس به یکی از این سه گروه محیط کشت رویی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی و به گروه دیگر محیط کشت فاقد فاکتورهای ترشحي به صورت داخل صفاقی به مدت سه روز متوالی تزریق شد. پنج روز بعد از تزریق سیس پلاتین، نمونه های کلیه و خون حیوانات مورد آزمایش برای بررسی های بافت شناسی و بیوشیمیایی جمع آوری گردید.

نتایج: نتایج کاهش معنی داری در میزان آسیب بافت کلیه، میزان اوره و کراتینین سرم خون نشان داد. همچنین افزایش معنی داری در میزان وزن بدن در گروه دریافت کننده محیط کشت رویی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی نسبت به گروه سیس پلاتین و گروه دریافت کننده محیط کشت فاقد فاکتورهای ترشحي مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش پیشنهاد می کند که فاکتورهای ترشحي سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی می توانند در برابر سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین اثر محافظتی داشته باشند.

واژگان کلیدی: سیس پلاتین، نارسایی حاد کلیوی، فاکتورهای ترشحي

مقدمه

کلیه اولین و مهم ترین راه دفع مواد زاید سمی و یکی از اندام های متعادل کننده الکترولیت ها می باشد. به علاوه دفع متابولیت های حاصل از اختلالات سایر اندام ها نیز از طریق آن انجام می پذیرد. بیماری های کلیوی یکی از مهم ترین علل مرگ و میر در سراسر جهان هستند. بیماری های کلیوی شدید به دو دسته نارسایی کلیوی حاد و مزمن تقسیم می شوند. نارسایی حاد را می توان به صورت یک کاهش سریع در میزان فیلتراسیون گلومرولی تعریف کرد (۱ و ۲). یکی از عوامل القا کننده نارسایی کلیوی حاد، داروی سیس پلاتین است (۳). با این که سیس پلاتین از جمله داروهای شیمی درمانی موثر در برابر تومورهای متراکم مانند تومور تخمدان، سر و گردن است، سمیت کلیوی ناشی از آن مهم ترین عارضه جانبی و محدود کننده مصرف آن در درمان می باشد. سمیت کلیوی سیس پلاتین در توبول ها و گلومرول های کلیه به ویژه توبول پروگزیمال ایجاد می گردد (۴).

از دست رفتن شدید عمل کرد کلیه، چه به طور حاد و چه به طور مزمن، تهدیدی برای زندگی بوده و نیاز به خارج کردن فرآورده های زاید سمی و بازگرداندن حجم و ترکیب مایعات بدن به سوی میزان طبیعی دارد. در حال حاضر دو روش اصلی برای درمان نارسایی مورد استفاده قرار می گیرد: یک روش پیوند کلیه است که به علت تعداد کم اهدا کنندگان در مقابل تعداد متقاضیان محدود می شود. روش دیگر دیالیز است که آن نیز با محدودیت هایی همراه است، زیرا دیالیز نمی تواند جایگزین تمام اعمال چندگانه کلیه باشد و از طرف دیگر ممکن است مشکلات اقتصادی-اجتماعی برای بیماران به همراه داشته باشد (۵). وجود چنین محدودیت هایی در درمان نارسایی های کلیوی منجر به جست و جوی روش های درمانی دیگر شده است. استفاده از سلول های بنیادی برای درمان نارسایی کلیوی در جانوران مدل، نتایج امیدوار کننده ای به دنبال داشته اند (۶، ۷، ۸ و ۹) سلول های مشتق از مغز استخوان درجه شگفت انگیزی از انعطاف پذیری دارند و می توانند به انواع سلول های اندام های مختلف بدن متمایز شوند (۱۰-۱۴). بر این اساس، پیشنهاد شده است که این سلول ها می توانند در تولید سلول های اپی تلیال جدید بعد از آسیب کلیوی شرکت کنند (۱۵ و ۱۶). مشخص شده که استفاده از جمعیت های انتخاب شده از سلول های مشتق از مغز استخوان مانند سلول های بنیادی مزانشیمی نتیجه بهتری دارند (۱۷، ۱۸ و ۱۹). شواهد اخیر پیشنهاد می کنند که حفاظت در مقابل

آسیب می تواند بدون تمایز سلول های بنیادی نیز صورت بگیرد و این سلول ها می توانند ترمیم سلول های موجود در محل آسیب را از طریق برهمکنش های سلول-سلول یا آزاد سازی فاکتورهای پاراکرین هنگام عبور از بافت آسیب دیده پیش ببرند (۲۰-۲۳). در این مطالعه، با توجه به نتیجه بهتر درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی نسبت به سایر سلول های بنیادی و وجود فاکتورهای ترشحی سلول ها در محیط کشت رویی آن ها، اثر محیط کشت رویی سلول های بنیادی مزانشیمی بر نارسایی حاد کلیوی ناشی از سیس پلاتین بررسی شد.

مواد و روش ها

حیوانات: در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد ویستار، با محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم، پرورش یافته در اتاق حیوانات دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی تهران استفاده گردید. حیوانات در اتاق با تهویه مناسب، دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد، سیکل نوری ۱۲ ساعته و با دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس های مخصوص نگهداری شدند. آزمایشات بر روی تمام گروه های مورد بررسی در شرایط کاملاً یکسان و مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت.

تهیه محیط کشت: در این مطالعه از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان استفاده شد. برای تهیه محیط کشت رویی، بعد از این که سلول های بنیادی مزانشیمی کاملاً سطح فلاسک ۱۵۰ سانتی متر مربع را پر کردند (Confluency صد درصد)، ۲۰ میلی لیتر محیط کشت تازه α -MEM (Cat No. 22571-020, alpha MEM, Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جنینی (Fetal bovine serum: FBS) (Cat No. SH30070.03, Thermo Scientific,) و USA و ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین (Cat No. 15070-063, Gibco) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 در روی سلول ها انکوبه گردید. با اتمام زمان انکوباسیون محیط رویی سلول ها جهت تیمار حیوانات استفاده شد. به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، محیط کشت حاصل از 5×10^6 سلول برای هر حیوان در نظر گرفته شد و به صورت داخل صفاقی به آن ها تزریق گردید.

روش مطالعه: حیوانات به طور تصادفی در چهار گروه (در هر گروه شش حیوان) به صورت زیر قرار گرفتند:

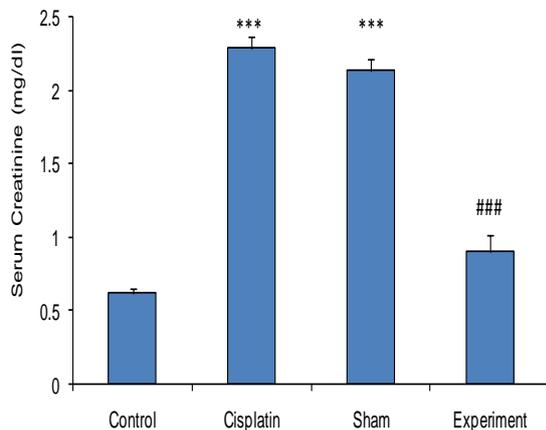
قرار گرفتند. میزان آسیب تبولی، گلومرولی و کست هیالین مطابق نمودارهای ۱، ۲ و ۳ کمی شد.

آنالیزهای آماری: در این مطالعه نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و جهت مقایسه نتایج از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) با تست Post Hoc Tukey استفاده و مقادیر با $p \leq 0.05$ به عنوان تفاوت معنی دار گزارش شدند.

نتایج

تاثیر hMSC-CM بر میزان BUN و کراتینین سرم خون

در این مطالعه مقادیر اوره و کراتینین سرم خون در تمام گروه ها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که سیس پلاتین سبب افزایش معنی دار میزان هر دوی این فاکتورها ($p \leq 0.001$) در گروه سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل شده است. میزان اوره و کراتینین در گروه تجربی نسبت به گروه سیس پلاتین کاهش معنی داری ($p \leq 0.001$) را نشان داد. میزان این دو فاکتور در گروه سیس پلاتین و گروه شم تفاوت معنی داری را نشان نداد (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱: بررسی اثر hMSC-CM بر میزان کراتینین سرم خون. سیس پلاتین سبب افزایش معنی دار سطح کراتینین سرم خون نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین hMSC-CM سبب کاهش معنی دار کراتینین سرم خون نسبت به گروه سیس پلاتین و شم شده است. $p \leq 0.001$ *** میزان معنا داری اختلاف از گروه کنترل و $p \leq 0.001$ ### میزان معنی داری از گروه سیس پلاتین را نشان می دهد. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سراسر است.

human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium: (hMSC-CM)

۱. گروه کنترل (Control Group): در این گروه هیچ تزریقی صورت نگرفت.

۲. گروه سیس پلاتین (Cisplatin Group): این گروه تنها سیس پلاتین را به میزان ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت تک دوز دریافت کردند.

۳. گروه شم (Sham group): در این گروه تزریق سیس پلاتین مانند گروه دوم انجام شد، به علاوه تزریق محیط کشت فاقد فاکتورهای ترشحی سلولی (Non Conditioned Medium or NCM) نیز به مدت سه روز متوالی صورت گرفت. آغاز تزریق NCM با تزریق سیس پلاتین همزمان بود.

۴. گروه تجربی (Experimental group): در این گروه نیز تزریق سیس پلاتین به روش گروه دوم انجام شد، سیس تزریق hMSC-CM (human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium) مانند تزریق NCM در گروه سوم صورت گرفت.

تمام تزریقات به صورت داخل صفاقی انجام شد. میزان تزریق NCM به تناسب hMSC-CM تعیین شد. پنج روز بعد از تزریق سیس پلاتین، ابتدا تمام حیوانات وزن شده و فعالیت فیزیکی آن ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس با محلول کتامین و زایلزین بی هوش شدند و پس از خون گیری از قلب، کلیه آن ها جدا و جهت مطالعات بافت شناسی درون محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد.

سنجش فعالیت فیزیکی: فعالیت فیزیکی حیوانات به صورت تغییر در فعالیت حرکتی حیوانات مطابق روش Castellani و Adams (۲۴ و ۲۵) به صورت زیر ارزیابی و کمی شد:

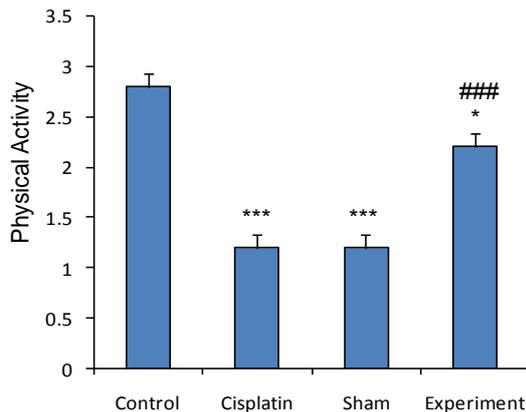
۱: حرکت آهسته (lazy)، ۲: حرکت متوسط (intermediate)، ۳: حرکت سریع (searching)

آزمون های بیوشیمیایی: در این مطالعه از دستگاه اتو آنالیزر (Hitachi 736-60, japan) برای اندازه گیری میزان اوره و کراتینین سرم خون به عنوان معیاری جهت تعیین آسیب کلیوی استفاده گردید.

مطالعات بافت شناسی: نمونه های بافتی مطابق روش های معمول پردازش شده و پس از قالب گیری با پارافین، برش هایی با ضخامت ۴ تا ۶ میکرون از آن ها تهیه شد. اسلایدهای تهیه شده با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده و مورد بررسی

تاثیر hMSC-CM بر میزان فعالیت فیزیکی

نتایج کاهش معنی داری را در فعالیت فیزیکی حیوانات در گروه دریافت کننده سیس پلاتین ($p \leq 0/001$) نسبت به گروه کنترل و نیز نسبت به گروه تجربی نشان داد. همچنین نتایج کاهش معنی داری را در فعالیت فیزیکی حیوانات گروه تجربی ($0/05 \leq p$) نسبت به گروه کنترل نشان داد (نمودار ۴).

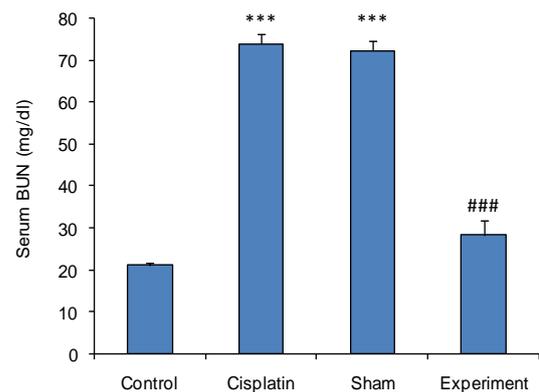


نمودار ۴: بررسی اثر hMSC-CM بر میزان فعالیت فیزیکی. سیس پلاتین سبب کاهش معنی دار فعالیت فیزیکی نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین hMSC-CM سبب افزایش معنی دار وزن و فعالیت فیزیکی نسبت به گروه سیس پلاتین و شام شده است. $p \leq 0/001$ و $0/05 \leq p$ * میزان معنی داری از گروه کنترل و $0/001 \leq p$ ## میزان معنی داری از گروه سیس پلاتین را نشان می دهد. human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium: (hMSC-CM)

تاثیر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه

نتایج بررسی های بافت شناسی انجام شده حاکی از این است که سیس پلاتین موجب القای تورم حاد سلولی، از بین رفتن هسته و تورم گلومرولی در قشر (شکل ۱، A) و تشکیل کست هیالین در مدولا شده است (شکل ۱، B)، تمام این تغییرات به همین میزان در کلیه حیوانات گروه شام نیز مشاهده شد (شکل ۱، C و D). در حیوانات تیمار شده با CM-hMSC میزان نکروز مانند گروه سیس پلاتین و شام مشاهده شد اما تورم حاد سلول های توپولی و از بین رفتن هسته سلول های توپولی، تورم گلومرولی و تعداد کست های هیالین تخفیف یافته است (شکل ۱، E و F).

بررسی های کمی نیز تغییر معنی داری را در میزان نکروز گروه های سیس پلاتین، شام و تجربی نشان ندادند، اما کاهش معنی داری در میزان تورم حاد سلولی، از بین رفتن هسته سلول های جدار توپول ها و تورم گلومرولی در گروه تجربی

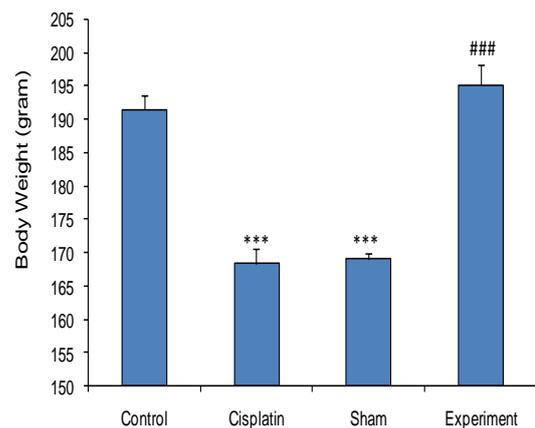


نمودار ۲: بررسی اثر hMSC-CM بر میزان اوره. سیس پلاتین سبب افزایش معنی دار سطح اوره نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین hMSC-CM سبب کاهش معنی دار اوره نسبت به گروه سیس پلاتین و شام شده است. $p \leq 0/001$ * میزان معنی داری از گروه کنترل و $0/001 \leq p$ ## میزان معنی داری از گروه سیس پلاتین را نشان می دهد.

human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium: (hMSC-CM), Blood Urea Nitrogen (BUN)

تاثیر hMSC-CM بر میزان وزن بدن

نتایج نشان داد که سیس پلاتین سبب کاهش معنی دار وزن بدن ($p \leq 0/001$) نسبت به گروه کنترل شده است. وزن بدن در گروه تجربی نسبت به گروه سیس پلاتین افزایش معنی داری ($p \leq 0/001$) را نشان داد. وزن بدن در گروه سیس پلاتین و گروه شام تفاوت معنی داری را نشان نداد (نمودار ۳).

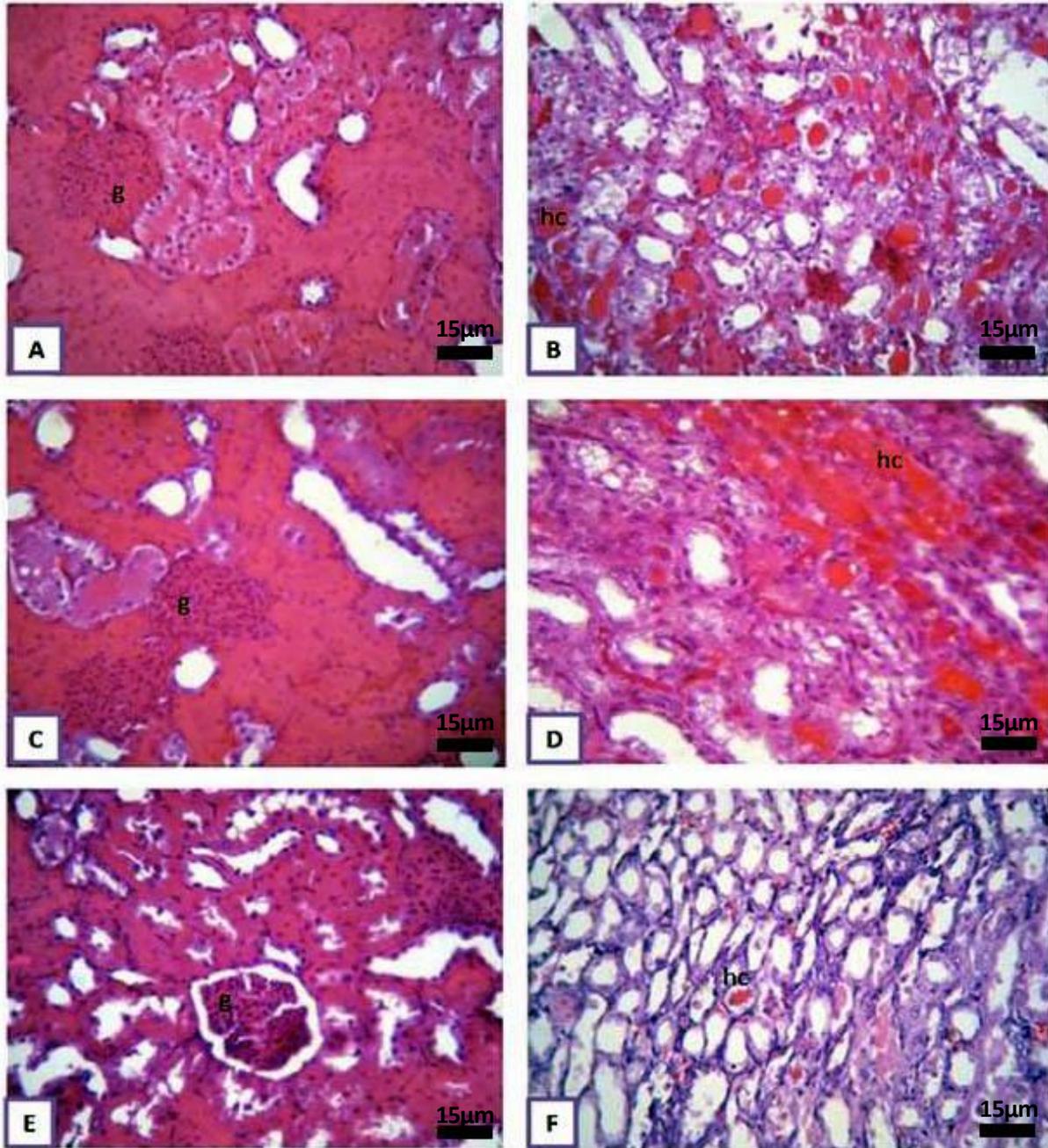


نمودار ۳: بررسی اثر hMSC-CM بر میزان وزن بدن. سیس پلاتین سبب کاهش معنی دار وزن بدن نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین hMSC-CM سبب افزایش معنی دار وزن نسبت به گروه سیس پلاتین و شام شده است. $p \leq 0/001$ * میزان معنی داری از گروه کنترل و $0/001 \leq p$ ## میزان معنی داری از گروه سیس پلاتین را نشان می دهد.

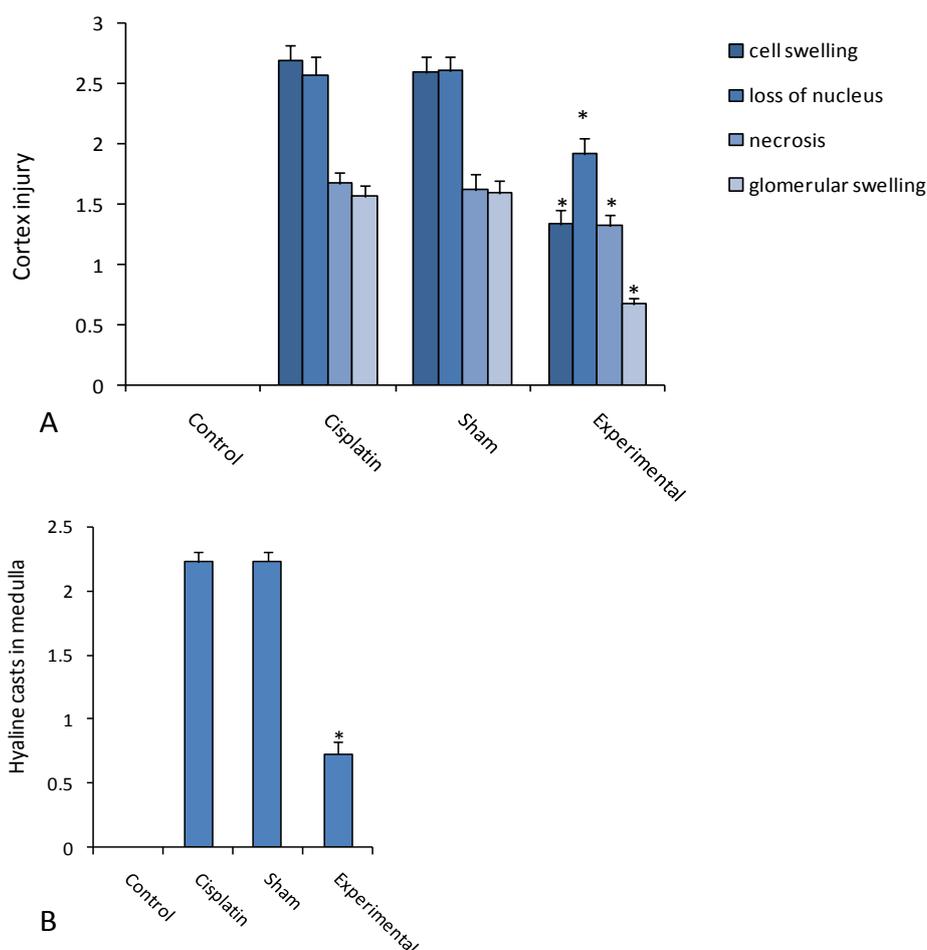
human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium: (hMSC-CM)

معنی داری را در گروه تجربی ($p \leq 0.001$) نسبت به گروه های سیس پلاتین و شم نشان داد (شکل ۲، B).

نسبت به گروه های سیس پلاتین و شم مشاهده شد (شکل ۲، A). همچنین تعداد کست های هیالین کاهش



شکل ۱: بررسی اثر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه. A و C: میکروگراف نوری از قشر کلیه حیوانات گروه سیس پلاتین و شم؛ تورم حاد سلولی، از بین رفتن هسته سلول های توبولی و تورم گلومرولی به میزان قابل توجهی مشاهده می شود. E: میکروگراف نوری از قشر کلیه حیوانات گروه تجربی؛ میزان تورم حاد سلولی، از بین رفتن هسته سلول های توبولی و تورم گلومرولی به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. B و D: میکروگراف نوری از مدولای کلیه حیوانات گروه سیس پلاتین و شم؛ کست هیالین در توبول های جمع کننده تشکیل شده است. F: میکروگراف نوری از مدولای کلیه حیوانات گروه تجربی؛ تعداد کست های هیالین به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرده است. برای اندازه گیری از لنز چشمی مدرج Optical Graticule Lens و برای آنالیز تصاویر تهیه شده از نرم افزار Scion Image استفاده شده است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، بزرگنمایی $\times 400$). (hc: hyaline cast ; g: glomerule ; hMSC-CM: human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned medium)



شکل ۲: بررسی اثر CM-hMSC بر درجه تغییرات بافتی کلیه. A. نمودار درجه آسیب در کورتکس؛ CM-hMSC موجب کاهش معنی دار تورم سلولی، از بین رفتن هسته سلول های توبولی و تورم گلومرولی شده است. B. نمودار درجه آسیب در مدولا؛ CM-hMSC موجب کاهش معنی دار تعداد کست های هیالین در مدولا شده است. $p \leq 0.001$ * میزان معنی داری اختلاف از گروه سیس پلاتین را نشان می دهد.
(human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned medium. hMSC-CM)

فاز اول، اسملاپتیه ادرار در طول ۲۴ تا ۴۸ ساعت اول پس از تزریق سیس پلاتین کاهش می یابد و این پلی اوری اولیه معمولاً خود به خود بهبود می یابد. فاز دوم افزایش حجم ادرار و کاهش اسملاپتیه بین ۷۲ تا ۹۶ ساعت بعد از تجویز سیس پلاتین رخ می دهد. این فاز با کاهش ماندگار GFR همراه است و به داروها پاسخ نمی دهد. به این ترتیب سیس پلاتین با کاهش حجم مایع در بدن موجب کاهش وزن بدن می شود (۲۶).

آسیب بافت کلیه با مرگ سلولی مشخص می شود که یک ویژگی هیستوپاتولوژیکی عمومی سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین است. تحت این شرایط، مرگ سلولی به هر دو صورت نکروزیس و آپاپتوزیس شناسایی شده است. نکروز می تواند مستقیماً توسط آسیب سمی شدید القا شود؛ همچنین می تواند نتیجه ای پس از آپاپتوزیس باشد که نکروز ثانویه نامیده می شود. مشخص شده که

بحث

سمیت حاد کلیوی ناشی از مصرف سیس پلاتین در بیماران مبتلا به سرطان از جمله عوارض جانبی مهم این دارو می باشد که باعث محدودیت مصرف آن می شود (۲ و ۳). در این مطالعه مشخص گردید که محیط کشت حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی اثرات محافظتی در برابر سمیت حاد کلیوی ناشی از سیس پلاتین در مدل حیوانی موش صحرایی دارد. به علاوه نشان داده شد که محیط کشت فاقد فاکتورهای ترشچی این سلول ها از سلول های کلیه در برابر سیس پلاتین محافظت نکرد و بنابراین اثر محافظتی توسط فاکتورهای ترشچی سلول های بنیادی مزانشیمی اعمال شده است.

تجویز سیس پلاتین با پلی اوری (پر ادراری) همراه می شود. پلی اوری ناشی از سیس پلاتین در دو فاز مجزا رخ می دهد: در

می شوند که این پروتئین AKT را فسفریله و فعال می کند (۴۱ و ۴۲). AKT می تواند فاکتورهای پروآپتوتیک مانند BAD را فسفریله و مهار کند (۴۳ و ۴۴). همچنین می تواند جابه جایی فاکتورهای پروآپتوتیک خانواده Forkhead به هسته را محدود کند و فعال سازی فاکتورهای آنتی آپتوتیک NF-kB و Mdm2 را پیش ببرد (۴۵)

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار با محیط کشت حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی موجب تخفیف آسیب کلیوی حاد القا شده به وسیله سیس پلاتین شده و به صورت معنی داری اکثر شاخص های بافتی را بهبود می بخشد. محیط کشت رویی این سلول ها احتمالاً با دارا بودن فاکتورهای آنتی آپتوتیک و پروآنژیوژنیک از پیشرفت آسیب بافتی و اختلال عمل کردی کلیه جلوگیری می کند.

با توجه به نتایج حاصل از سایر مطالعات و همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر و تایید اثرات محافظت کنندگی محیط کشت حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی در سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین، پیش بینی می شود که در آینده بتوان از آن به عنوان دارویی جهت کاهش عوارض کلیوی سیس پلاتین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مراتب سپاس خود را از زحمات فراوان خانم اعظم عابدی و خانم مرضیه قاسمی در انجام این پروژه ابراز می دارند.

منابع

1. Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol*, 1999; 12(2): S142-51.
2. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*, 2004; 114(1): 5-14.
3. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet*. 2005; 365(9457): 417-30.
4. Satoh M, Kashihara N, Fujimoto S, Horike H, et al. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(3): 1183-90.
5. Hammerman MR. Tissue engineering the kidney. *Kidney Int* 2003; 63(4): 1195-204.

سیس پلاتین موجب آزاد سازی پروتئین های پروآپتوتیک Bax و Bak می شود. این پروتئین ها سبب ایجاد آسیب پرمفندی بر غشای خارجی میتوکندری و در نتیجه آزاد شدن فاکتورهای آپتوتیک از برخی اندامک ها می شوند. مکان های عمده آسیب و مرگ سلولی در سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین، توپول های کلیه هستند (۲۷). همچنین مطالعات متعدد نشان داده است که در سمیت حاد کلیوی علائمی مانند افزایش اوره و کراتینین پلاسما ایجاد می شود (۲۸) که نتایج حاصل از مطالعه حاضر تایید کننده این موضوع می باشد. در این مطالعه، علاوه بر آسیب توپولی، آسیب گلوامرولی نیز مشاهده شد. مطالعات انجام شده توسط Dursun و همکارانش (۲۹) نشان داد که سیس پلاتین می تواند موجب الفای نکروزیس و آپتوزیس در سلول های اندوتلیال کشت داده شده گردد، اما تاکنون مطالعات صورت گرفته بر جانوران زنده آسیب گلوامرولی را در سمیت کلیوی حاد ناشی از سیس پلاتین گزارش نکرده اند. تفاوت بین مشاهدات مطالعه حاضر با سایر مطالعات ممکن است به علت تفاوت شرایط آزمایش یا بازتاب واکنش های آپتوزی در بافت های گلوامرولی باشد.

اگرچه برخی مطالعات نشان می دهند که چگونه سلول های بنیادی به بافت آسیب دیده مهاجرت می کنند (۳۰ و ۳۱) اغلب محققان الحاق این سلول ها به بافت آسیب دیده یا تمایزشان به سلول های اپی تلیال را تایید نکردند (۳۲، ۳۳ و ۳۴). به نظر می رسد مهاجرت سلولی تنها به علت اثرات اندوکراین-پاراکراین، ترمیم را تسهیل می کند و این خود سلول های کلیه هستند که اپی تلیوم توپولی را بازسازی می نمایند (۲۲، ۳۵ و ۳۶). اگر اثرات محافظتی به واسطه عمل کرد اندوکرینی سلول ها باشد، تزریق خود سلول ها ضروری به نظر نمی رسد، بلکه فاکتورهای ترشحی آن ها هستند که باید هنگام آسیب در محل حاضر باشند. نتایج حاصل از این مطالعه منعکس کننده اثرات محافظتی سلول های بنیادی مزانشیمی به واسطه عمل کرد اندوکرینی آن ها می باشد (۳۶).

سلول های بنیادی مزانشیمی فاکتورهای متنوعی را ترشح می کنند که شامل فاکتورهای رشد پروآنژیوژنیک مانند EGF, IGF-1, VEGF, HGF و پروستاگلاندین ها مانند PGE2، سیتوکین هایی مانند G-CSF، SCF، M-CSF می باشند (۳۷-۴۰). مشخص شده که EGF و IGF-1، VEGF و phosphatidylinositol-3-kinase پروتئین

6. Behr L, Hekmati M, Fromont G, Borenstein N, et al., Intra renal arterial injection of autologous mesenchymal stem cells in an ovine model in the postischemic kidney. *Nephron Physiol.* 2007; 107(3): p65-76.
7. Chen J, Park HC, Addabbo F, Ni J, et al., Kidney-derived mesenchymal stem cells contribute to vasculogenesis, angiogenesis and endothelial repair. *Kidney Int.* 2008; 74(7): 879-89.
8. Curtis LM, Chen S, Chen B, Agarwal A, et al., Contribution of intrarenal cells to cellular repair after acute kidney injury: subcapsular implantation technique. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295(1): F310-4.
9. Kinomura M, Kitamura S, Tanabe K, Ichinose K, et al. Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. *Cell Transplant.* 2008; 17(1-2): 143-58.
10. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001; 105(3): 369-77.
11. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2896-902.
12. Spyridonidis, A, et al. Stem cell plasticity: the debate begins to clarify. *Stem Cell Rev.* 2005; 1(1): 37-43.
13. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000; 6(11): 1229-34.
14. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003; 102(10): 3483-93.
15. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest.* 2003; 112(1): 42-9.
16. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 2001; 195(2): 229-35.
17. Sagrinati C, Ronconi E, Lazzeri E, Lasagni, L, et al. Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells. *Trends Mol Med.* 2008; 14(7): 277-85.
18. Eliopoulos N, Zhao J, Bouchentouf M, Forner K, et al. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299(6): F1288-98.
19. Morigi M, Intron M, Imberti B, Corna D, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 2008; 26(8): 2075-82.
20. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1176: 101-17.
21. Mishra PK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation? *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2008; 9(2): 122-8.
22. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(1): F31-42.
23. Togel F, Zhang P, Hu Z. VEGF is a mediator of the renoprotective effects of multipotent marrow stromal cells in acute kidney injury. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(8B): 2109-14.
24. Castellani S, Adams PM. Acute and chronic phencyclidine effects on locomotor activity, stereotypy and ataxia in rats. *Eur J Pharmacol.* 1981; 73(2-3): 143-54.
25. Gheisari Y, Ahmadbeigi N, Naderi N, Nasiri M, et al., Stem cell-conditioned medium does not protect against kidney failure. *Cell Biol Int.* 2011; 35(3): 209-13.
26. Meyer, KB, Madias NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab.* 1994; 20(4): 13-201.
27. Wei Q, Dong G, Franklin J, Dong Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2007; 72(1): 53-62.
28. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* 2005; 76(18): 2125-35.
29. Dursun B, He Z, Somerset H, Oh DJ, et al. Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291(3): F578-87.
30. Lange C, Togel F, Ittrich H, Clayton F, et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 2005; 68(4): 1613-7.
31. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(7): 1794-804.

32. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest.* 2005; 115(7): 1743-55.
33. Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest.* 2005; 115(7): 1756-64.
34. Duffield JS, Bonventre JV. Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury. *Kidney Int.* 2005; 68(5): 1956-61.
35. Broekema M, Harmsen MC, Koert JA, Petersen AH, et al. Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. *Kidney Int.* 2005; 68(6): 2572-81.
36. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(9): 2486-96.
37. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(5): p. 1188-99.
38. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006; 98(5): 1076-84.
39. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol.* 2005; 33(8): 928-34.
40. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 105(4): 1815-22.
41. Dai C, Yang J, Liu Y. Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(2): 411-22.
42. Logar CM, Brinkkoetter PT, Krofft RD, Pippin JW, et al. Darbepoetin alfa protects podocytes from apoptosis in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 2007; 72(4): 489-98.
43. Kiley SC, Thornhill BA, Tang SS, Ingelfinger JR, et al. Growth factor-mediated phosphorylation of proapoptotic BAD reduces tubule cell death in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 2003; 63(1): 33-42.
44. Ortega A, Ramila D, Ardura JA, Esteban V, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17(6): 1594-603.
45. Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest.* 2005; 115(10): 2618-24.

Effect of Conditioned Medium of Human Mesenchymal Stem Cells on Acute Renal Failure Induced by Cisplatin in Rat

Taleb Golestani S, M.Sc.^{1*}, Azarnia M, Ph.D.², Jamali M, Ph.D.³, Moayer M, Ph.D.⁴

1. Kharazmi (Tarbiat Moallem) University, Tehran, Iran
2. Kharazmi (Tarbiat Moallem) University, Tehran, Iran
3. Department of Pathology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj, Iran

* Email corresponding author: golestani_sara64@yahoo.com

Received: 28 Jan. 2013

Accepted: 8 Oct. 2013

Abstract

Aim: Cisplatin is one of the most successful drugs to fight many cancers, but its nephrotoxicity limits its administration. The aim of this study is investigation of the effect of human mesenchymal stem cells secretory factors on Cisplatin-induced acute renal failure in rats.

Material and Methods: In this study, male wistar rats were used. Animals were randomly divided into four groups and six animals were in each group. One group was considered as control which this group received no injections. Other three groups were treated with intraperitoneal 5 mg/kg Cisplatin once at the beginning of the experiment. Then one of these three groups was injected with conditioned medium of human mesenchymal stem cells and other groups were injected with medium without secretory factors intraperitoneally for three consecutive days. After five days Cisplatin injection, kidney and blood samples from all of examined animals were collected for histological and biochemical studies.

Result: Results showed significant decrease in the kidney injury level, blood serum BUN and creatinine amount. Also

Also body weight increasing significantly was observed in conditioned medium of human mesenchymal stem cells receiver group in comparison with treated Cisplatin and non secretory factors receiver groups.

Conclusion: Results of this research suggest that human mesenchymal stem cells secretory factors can be affect against Cisplatin-induced nephrotoxicity.

Keywords: Cisplatin, Acute renal failure, Secretory factors