

بررسی اثر محیط کشت حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی بر آسیب حاد کلیوی ناشی از جنتامایسین در موش صحرایی

اعظم عابدی کوشالشاھی ^۱M.Sc.*، مهناز آذرنیا ^۲Ph.D.، منصور جمالی ^۳Ph.D.، فریبرز معیر ^۴Ph.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

۴- گروه پاتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: abedimasoomah@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۹

چکیده

هدف: هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر فاکتورهای ترشحی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی بر آسیب حاد کلیوی ناشی از جنتامایسین در موش صحرایی می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق ابتدا آزمایشی جهت دستیابی به مدل حیوانی استاندارد طراحی شد. سپس حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. یک گروه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که هیچ تزریقی در حیوانات این گروه صورت نگرفت، سه گروه دیگر جنتامایسین را به صورت داخل صفاقی با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم درشش روز متوالی 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 ترشحی به صورت داخل صفاقی و به مدت سه روز متوالی تزریق شد. در نهایت در روزهای سوم، پنجم و هشتم بعد از تزریق جنتامایسین، نمونه های کلیه و خون حیوانات جمع آوری و مورد بررسی های بافت شناسی و بیوشیمیایی قرار گرفت.

نتایج: نتایج گرچه به جز در موردی خاص، هیچ کاهش معنی داری در میزان بیومارکرهای خونی حیوانات در گروه دریافت کننده محیط کشت رویی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی نسبت به دو گروه دیگر نشان نداد. اما بهبودی آسیب بافتی در تعدادی از روزهای مورد بررسی مشاهده شده است.

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر پیشنهاد می کند که فاکتورهای ترشحی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی می توانند در برابر آسیب بافتی ناشی از جنتامایسین اثر محافظتی داشته باشند.

واژگان کلیدی: آسیب حاد کلیوی، جنتامایسین، فاکتورهای ترشحی

مقدمه

کلیه یک اندام با پیچیدگی بالا می باشد که بیش از ۳۰ نوع سلول مختلف را در بخش های متفاوت می سازد و دارای دو وظیفه مهم می باشد: یکی پاک کردن بدن از مواد زائد که یا خورده می شوند یا توسط متابولیسم تولید می شوند، عمل دوم که به ویژه جنبه حیاتی دارد کنترل حجم و ترکیب مایعات بدن است زیرا تعادل آب و املاح تمام الکترولیت ها در بدن بین مقدار ورودی و خروجی تا حدود زیادی توسط کلیه ها حفظ می شود (۱ و ۲). بیماری های کلیوی در میان مهم ترین علل مرگ و معلولیت در بسیاری از کشورها در سراسر جهان می باشند. آسیب کلیوی حاد (AKI) یک بیماری سخت و معمولاً با یک نسبت مرگ و میر بالا می باشد که توسط مسمومیت یا ایسکمی ناشی از شیمی درمانی، آنتی بیوتیک ها و شوک ایجاد شده توسط عفونت و جراحی های مهم اتفاق می افتد (۳، ۴ و ۵). AKI می تواند منجر به ناکار آمدی و آپوپتوزیس و همچنین نکرورز در سلول های اپی تلیال توبولار کلیوی، همچنین کاهش در سلول های اندوتلیال کلیوی شود (۵). در کل AKI با یک کاهش سریع در نسبت فیلتراسیون گلومرولی شناخته می شود که توسط کاهش هم در فاکتورهای رگی و هم توبولار تعیین می شود و شامل افزایش انبساط رگی کلیوی، کاهش خود تنظیمی و انسداد توبولار می باشد (۶ و ۷). آسیب کلیوی حاد بطور بالقوه یک بیماری قابل برگشت است. در اکثریت بیماران، AKI به طور موثری بهبود می یابد و هیچ گونه پیامد بالینی ندارد، اما در تعداد معدودی از بیماران، AKI به طور ناقص بهبود یافته و این بیماران یا دیالیز می کنند و یا به سوی بیماری کلیوی مزمن (CKD) پیشرفت می کنند که هم AKI و هم CKD دارای هزینه بالا و بار بهداشتی برای جامعه هستند. هفت درصد کل بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه به دلیل AKI بوده است (۸)، به همین جهت جستجو برای ایجاد روش های نوین درمان AKI صورت گرفته است. مطالعات اخیر، تکنولوژی بر پایه سلول های بنیادی را مورد آزمایش قرار داده اند که جنبه های جالبی از درمان قدرتمند اندام های آسیب دیده شدید به وسیله خاصیت منحصر به فرد سلول های بنیادی را ایجاد کرده است (۹، ۱۰ و ۱۱). که در این بین سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول های با قابلیت کاربردهای درمانی و ترمیمی بالا برای بافت های آسیب دیده می باشند که شامل درمان AKI نیز می شود (۱۲ و ۱۳). همچنین محققان دریافتند که MSCs یک تعداد از فاکتورهایی که به عنوان فاکتورهای محافظت کننده کلیه

شناخته می شوند را ترشح می کنند و بدین وسیله مکانیسم های پاراکرین و اندوکرین را ایجاد می کند که احتمالاً از همین طریق سلول های بنیادی مزانشیمی اثرات تحریک کننده ترمیمی را اعمال می کنند (۱۴، ۱۵ و ۱۶). تعدادی از این فاکتورها شامل فاکتور رشد اپیدرمال (EGF)، فاکتور رشد هیپاتوسیت (HGF)، فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-1)، فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) و غیره می باشند (۱۷ و ۱۸). این فاکتورهای بیواکتیو موجب سرکوب سیستم ایمنی موضعی، مهار فیبروز و آپاپتوز، افزایش (Angiogenesis) و تحریک تکثیر و تمایز می شوند (۱۹). چندین مطالعه توسط فاکتورهای رشد پلی پپتید در حمایت از ترمیم کلیوی انجام شده است. در یک مطالعه محیط کشت مفید (Conditioned medium) را از سلول های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان موش جداسازی و به موش های دارای AKI القا شده با (Cisplatin) تزریق شد، مشاهده کردند که (Conditioned medium) بهبود دهنده عمل کرد کلیوی، افزایش دهنده تکثیر سلولی توبولار و محدود کننده آپوپتوزیس سلول های کلیوی می باشند (۱۵). Togel و همکارانش (۲۰) نیز معتقدند سلول بنیادی مزانشیمی ممکن است در حفاظت از توبول کلیوی شرکت کند بدون این که به طور مستقیمی در ترمیم توبول دخالت کند. آن ها نتیجه گرفتند تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی می تواند فاکتور رشد هیپاتوسیت (HGF)، فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-1) را ترشح کند که می تواند داخل مویرگ های ریز آسیب دیده جایگزین شود و آپوپتوزیس را مهار کند. این یک جنبه مهم از محافظت القا شده توسط MSC protective در برابر (ARF (ischemia/reperfusion و AKI از طریق عمل پاراکرین می باشد. شناسایی فاکتورهای protective خاص ترشح شده به وسیله MSCs با استفاده از روش های ژنومیک یا پروتئومیک ممکن است فرصت هایی را برای کشف راه های درمانی جدید و توسعه درمان های مولکولی و دارویی جدید فراهم آورد (۲۱).

توانایی کلیه ها برای تغلیظ و متابولیسم مواد شیمیایی باعث می شود کلیه ها به طور ویژه ای مستعد آسیب توکسیک باشند. آنتی بیوتیک جنتامایسین از خانواده آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید می باشد که به طور وسیعی در درمان انواعی از عفونت ها که توسط باکتری های گرم منفی و (Endocarditis) ایجاد می شوند به کار می رود. با این حال، ارزش درمانی آن به وسیله نفروتوکسیستی محدود می شود و این اتفاق در ۲۰ تا

۲۵۰ گرم استفاده گردید. یک گروه شش‌تایی از موش‌ها به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که در این گروه هیچ تزریقی صورت نگرفت. در گروه دوم ده عدد موش قرار گرفت که برای شش روز متوالی به آن‌ها داروی جنتامایسین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از این دوره هر روز یک موش جهت خون‌گیری از قلب با تزریق محلول کتامین و زایلازین بی‌هوش شد و با تهیه سرم خون جانور میزان کراتینین (Cr) و نیتروژن اوره خون (BUN) حیوان به‌مدت ده روز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین کلیه حیوانات برای مطالعات هیستولوژیکی خارج و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند. (به‌دلیل برداشت کلیه در گروه‌ها و مرگ و میر حیوانات نمونه‌گیری از این حیوانات لحظاتی قبل از مرگ صورت گرفت). در گروه مدل آزمایشات با شش بار تکرار صورت پذیرفت. درنهایت با بررسی میزان نیتروژن اوره خون (BUN)، کراتینین (Cr) و نسبت بین این دو، بالاترین میزان آن‌ها را طی دوره ده روزه به‌دست آورده و به‌عنوان روز اوج اثر داروی جنتامایسین در نظر گرفته شد که نشان دهنده بیشترین میزان آسیب جاندار در این روز می‌باشد و به‌عنوان دوره حاد بیماری تعریف می‌شود (با بررسی نتایج در این مطالعه روز سوم به‌عنوان روز اوج اثر جنتامایسین در نظر گرفته شد).

تیمار حیوانات دارای آسیب حاد کلیوی با استفاده از محیط کشت مفید حاصل سلول‌های بنیادی مزانشیمی

(*MSCs-conditioned medium*) پس از ایجاد مدل حیوانی استاندارد، حیوانات به چهار گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد که هیچ تزریقی در آن‌ها صورت نگرفت و به گروه دوم برای ایجاد مدل نارسایی حاد کلیوی تنها جنتامایسین تزریق شد که این دو گروه در بخش مدل سازی توضیح داده شدند. گروه سوم به‌عنوان گروه تجربی در نظر گرفته شد. در گروه تجربی علاوه بر تزریق جنتامایسین، *MSCs-conditioned medium* ۲۴ ساعت قبل از تزریق جنتامایسین و در سه روز متوالی به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. در گروه چهارم که شش نامیده شد، حیوانات جنتامایسین و کنترل مدیا (محیط کشت فاقد فاکتورهای ترشحی) را نیز مانند گروه قبل به‌صورت داخل صفاقی ۲۴ ساعت قبل از تزریق جنتامایسین و در سه روز متوالی دریافت کردند. شایان ذکر است در این مطالعه در تمام گروه‌هایی که جنتامایسین دریافت کرده‌اند علاوه بر بررسی در روز سوم پس از

۳۰ درصد بیماری که جنتامایسین را دریافت کرده‌اند رخ می‌دهد (۲۲ و ۲۳). از این جهت، برای ساخت مدل‌های نفروتوکسیستی در مطالعات کشت سلول و حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌شود (۲۴، ۲۵ و ۲۶). نفروتوکسیستی جنتامایسین توسط آسیب توبولار پروکسیمال و زوال عمل کردی کلیه شناخته می‌شود و منجر به آپوپتوزیس، نکروز و اتساع توبولار می‌شود (۲۳). در این مطالعه سعی شده است با استفاده از نفروتوکسیک شناخته شده به‌نام جنتامایسین ابتدا مدل تایید شده‌ای از بیماری حاد کلیوی ساخته شود و سپس با تیمار حیوانات بیمار با محیط کشت مفید حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (*MSCs - conditioned medium*) چگونگی تاثیرات این ماده بر روند بیماری حاد در کلیه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی، از رت بالغ نر نژاد ویستار (*wistar rat*) که در اتاق حیوانات دانشگاه خوارزمی نگهداری شده بودند استفاده شد. رت‌ها در اتاق حیوانات با دمای کنترل شده 25 ± 2 سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذای کافی همواره در دسترس آن‌ها قرار داشت. آزمایشات روی تمام گروه‌های مورد بررسی در شرایط کاملاً یکسان و مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت.

تهیه محیط کشت مفید حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی (*hMSC - Conditioned Medium*):

بعد از این‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاملاً سطح فلاسک را پر کردند، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه α -MEM (Cat No. 22571-020, alpha MEM, Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم‌گاو جنینی (Fetal bovine serum: FBS) (Cat No. SH30070.03, Thermo Scientific, USA) و ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین (Cat No. 15070-063, Gibco) به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $5\% \text{ CO}_2$ درصد بر روی سلول‌ها انکوبه شد. با اتمام زمان انکوباسیون محیط روی سلول‌ها جهت تیمار حیوانات مورد استفاده قرار گرفت. برای هر کیلوگرم وزن بدن، محیط کشت حاصل از 1×10^6 سلول، در نظر گرفته شد و به حیوانات تزریق گردید.

ساخت مدل حیوانی: جهت دستیابی به مدل حیوانی استاندارد از تعدادی موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰ تا

تزریق که روز اوج تاثیر جنتامایسین به حساب می آید روز پنجم و هشتم پس از تزریق جنتامایسین نیز مورد مطالعه قرار گرفت (در همه گروه ها آزمایشی شش بار تکرار صورت پذیرفت).

مطالعات بافت شناسی: نمونه های بافتی مطابق روش های معمول پردازش شده و پس از قالب گیری با پارافین، برش های با ضخامت ۴ تا ۶ میکرون از آن ها تهیه شد. اسلایدهای تهیه شده با روش همتوکسیلین _ اتوزین رنگ آمیزی و سپس میزان آسیب بافتی با استفاده از استانداردهای تهیه شده در مطالعات قبلی مطابق با جدول شماره ۱، ۲ و ۳ کمی شد و مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: نحوه امتیازدهی برای تعیین درجه تورم حاد سلولی و نکروز لوله های ادراری

درجه آسیب توبولی	
۰	سلول های جدار لوله های ادرای سالم بوده و هیچ گونه تورم حاد سلولی و نکروز دیده نمی شود
۱	در کمتر از یک سوم لوله های شمارش شده تورم حاد سلولی و نکروز لوله های ادراری دیده می شود.
۲	بین یک سوم تا دو سوم لوله های شمارش شده تورم حاد سلولی و نکروز لوله های ادراری دیده می شود.
۳	در بیشتر از دو سوم لوله های شمارش شده تورم حاد سلولی و نکروز لوله های ادراری دیده می شود

*** در هر مقطع از کلیه ها ۱۵۰ لوله به طور تصادفی شمارش شدند.

جدول ۲: نحوه ارزیابی کست هیالین

کست هیالین	
۰	هیچ کستی داخل لوله ها دیده نمی شود.
۱	در کمتر از یک سوم لوله ها کست وجود دارد.
۲	در یک سوم تا دو سوم لوله ها کست وجود دارد.
۳	در بیشتر از دو سوم لوله ها کست وجود دارد.

*** برای ارزیابی کست هیالین، ۱۰ شان میکروسکوپی شمارش گردید.

جدول ۳: نحوه ارزیابی تجمع سلول های آماسی

تجمع سلول های آماسی	
۰	هیچ تجمعی از سلول های آماسی در فضای بین توبولی دیده نمی شود.
۱	در کمتر از یک سوم فضای بین توبولی تجمع سلول های آماسی تک هسته دیده می شود
۲	بین یک سوم تا دو سوم فضای بین توبولی تجمع سلول های تک هسته دیده می شود
۳	در بیشتر از دو سوم فضای بین توبولی تجمع سلول های تک هسته ای وجود دارد.

*** برای ارزیابی تجمع سلول های آماسی، ۱۰ شان میکروسکوپی شمارش گردید

نتایج

صحت القای مدل

مطالعات داروشناختی روی بیماری های کلیه نیازمند دستیابی به مدل های حیوانی مناسب می باشد که مقلد شرایط پاتوفیزیولوژیک بیماری باشند. از این رو در این مطالعه جهت اطمینان از صحت القای مدل، آزمایشی مطابق آنچه در روش کار ارائه نمودیم طراحی شد. نتایج پس از القای مدل نشان داد که تزریق جنتامایسین با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در یک دوره شش روزه باعث افزایش معنی دار ($P \leq 0/01$) کراتینین

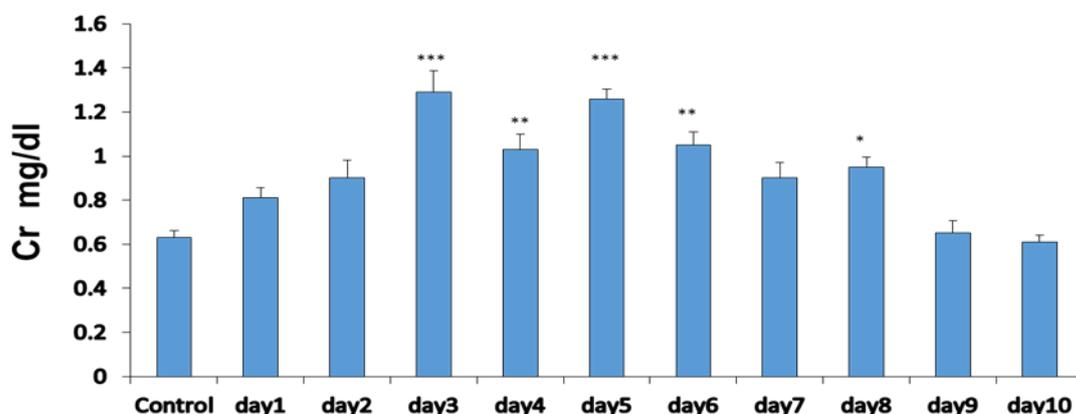
آزمون های بیوشیمیایی سرم: پس از خون گیری و تهیه سرم حیوانات مورد نظر، میزان Cr (کراتینین) و BUN (نیتروژون اوره خون) که از مهم ترین مارکرهای سرمی آسیب کلیوی می باشند با استفاده از کیت های تولیدی شرکت زیست شیمی و دستگاه آنالیزر اندازه گیری شدند.

آنالیزهای آماری: نتایج به دست آمده توسط نرم افزار SPSS.۱۶ و آزمون واریانس یک طرفه با تست Post Hoc Tukey و با سطح معنی داری ($P \leq 0/05$) آنالیز و به صورت (SE) Mean \pm بیان شدند.

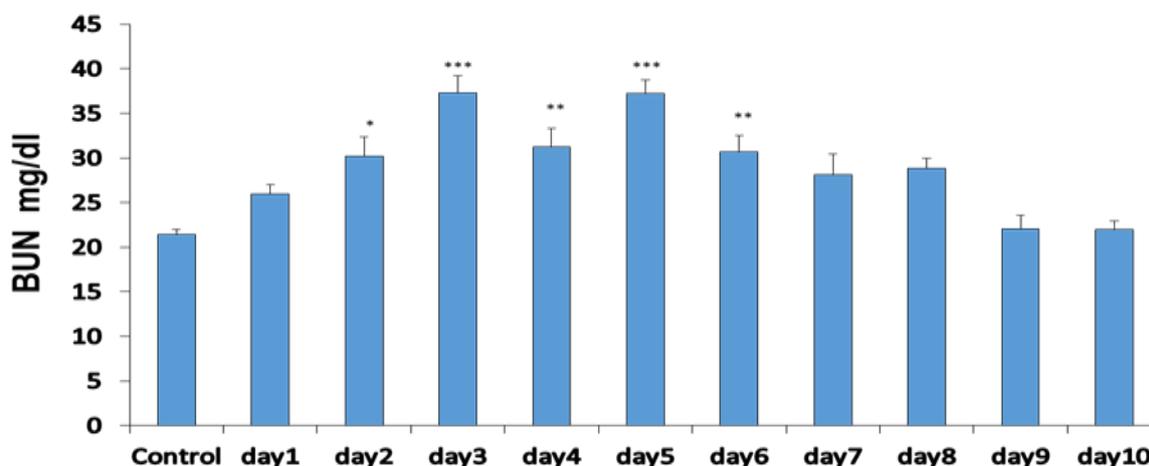
هیالین در گروه مدل (گروه دریافت کننده جنتامایسین) نسبت به گروه کنترل می باشد (شکل ۱: C، D). در حالی که بافت کلیه در گروه کنترل کاملاً طبیعی به نظر می رسد و هیچ آسیبی دیده نمی شد (شکل ۱: A، B). با توجه به مطالعات گذشته در القای مدل حاد کلیوی، نتایج ما نشان دادند این میزان از داروی جنتامایسین می تواند مدل مناسبی از بیماری حاد کلیوی را القا کند. به عبارتی یافته های ما موید صحت روند مدل سازی انجام شده بودند از این رو با القای بیماری به روش آزموده شده در مدل سازی و تیمار حیوانات با hMSC – conditioned medium تاثیر آن بر بیماری حاد کلیوی بررسی شد.

(نمودار ۱) و نیتروژن اوره خون (نمودار ۲) در روزهای سوم و پنجم پس از تزریق جنتامایسین نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین کراتینین در روز هشتم پس از تزریق جنتامایسین دارای سطح معنی دار ($P \leq 0.05$) نسبت به گروه کنترل می باشد (نمودار ۱). لازم به ذکر است با در نظر گرفتن بالاترین مقادیر BUN (نیتروژن اوره خون)، کراتینین و نسبت بین این دو طی دوره ده روزه بررسی پس از تزریق جنتامایسین، روز سوم، روز اوج اثر جنتامایسین بر حیوان می باشد که به عنوان دوره حاد بیماری در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از مارکرهای بیوشیمیایی خون نشان دهنده القای آسیب بودند. مطالعات بافت شناسی نیز حاکی از تورم حاد سلولی، نکروز لوله های ادراری، تجمع سلول های آماسی و کست

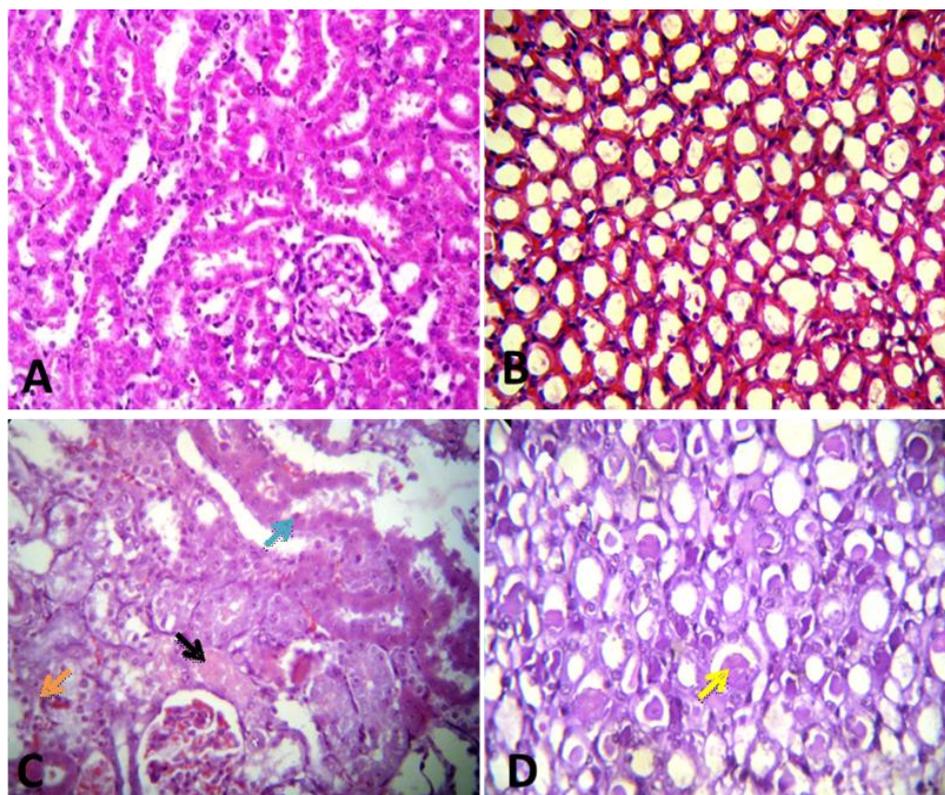


نمودار ۱: میزان تغییرات کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر) سرم خون، طی دوره ده روز پس از تزریق جنتامایسین نسبت به گروه کنترل: ($p < 0.05$)
 (** $p < 0.01$) (***)



نمودار ۲: میزان تغییرات نیتروژن اوره (میلی گرم بر دسی لیتر) سرم خون، طی دوره ده روز پس از تزریق جنتامایسین نسبت به گروه کنترل: ($p < 0.05$)
 (** $p < 0.01$) (***)

(* لازم به ذکر است با در نظر گرفتن بالاترین مقادیر BUN، کراتینین و نسبت بین این دو طی دوره ده روزه بررسی پس از تزریق جنتامایسین، روز سوم روز اوج اثر جنتامایسین بر حیوان می باشد که به عنوان دوره حاد بیماری در نظر گرفته شد.)



شکل ۱: بررسی صحت القای آسیب حاد کلیوی به وسیله آنالیز بافت شناسی کلیه حیوانات مورد آزمایش. A و B: میکروگراف نوری از کلیه حیوانات گروه کنترل، بافت کلیه در قسمت قشر (A) و مدولا (B) کاملاً طبیعی به نظر می رسد و هیچگونه آسیبی مشاهده نمی شود. C و D: میکروگراف نوری از بافت کلیه حیوانات گروه دریافت کننده جنتامایسین (مدل)، نکروز لوله های ادراری (پیکان سیاه)، تورم حاد سلولی (پیکان آبی) و تجمع سلول های آماسی (پیکان نارنجی) در بخش قشری کلیه (شکل C) و همچنین کست هیالین (پیکان زرد) در بخش مدولا کلیه (شکل D) به وضوح قابل مشاهده می باشد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی $\times 400$.

در گروه تجربی دارای کاهش با سطح معنی داری ($P < 0.001$) نسبت به گروه جنتامایسین و شم می باشد (نمودار ۳).

بررسی اثر محیط کشت مفید حاصل از سلول های بنیادی مزانشیم انسانی بر تغییرات بافتی کلیه بعد از تیمار با جنتامایسین

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 ئوزین رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند. میزان تورم حاد سلولی، نکروز لوله های ادراری، تجمع سلول های آماسی و کست هیالین مطابق جداول ۱، ۲ و ۳ کمی شد.

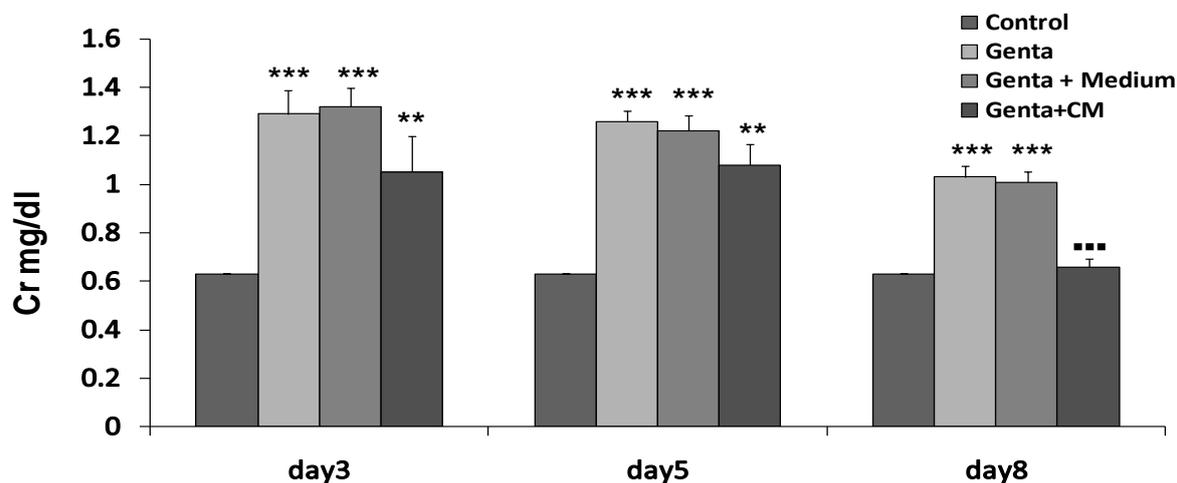
برطبق مطالعات، کلیه سالم در گروه کنترل بدون هیچ گونه آسیب بافتی در تمام قسمت های نفرون شامل گلومرول، لوله های پروکسیمال و دیستال در ناحیه قشری _ مرکزی می باشد (شکل ۱: A, B). بررسی های بافت شناسی در روز سوم پس از

بررسی اثر محیط کشت مفید حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی (hMSC-conditioned medium) بر میزان نیتروژن اوره خون (BUN) و کراتینین (Cr) سرمی بعد از تیمار با جنتامایسین

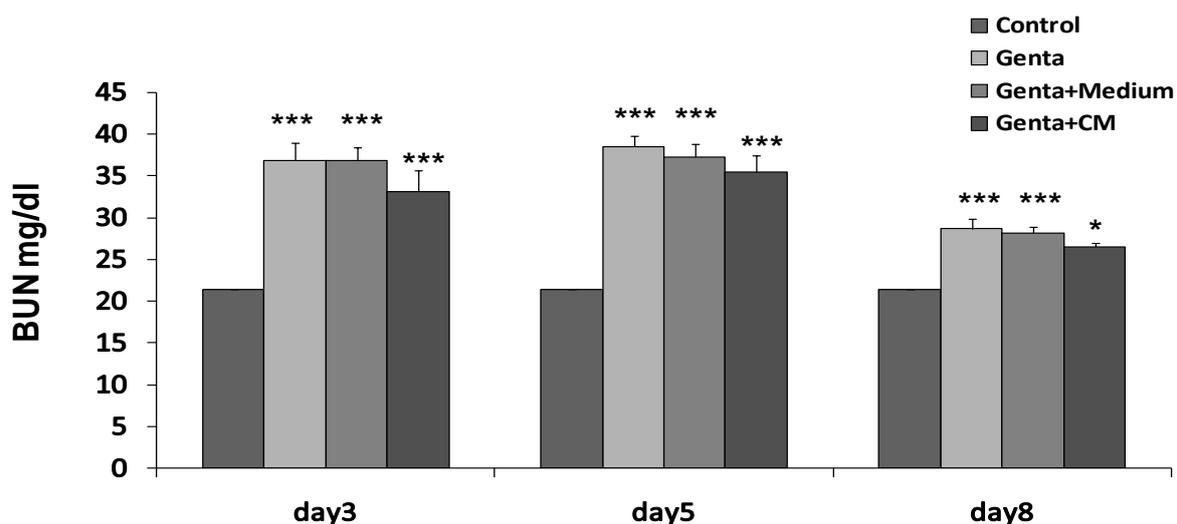
بررسی در گروه های آزمایشی در روز سوم پس از تزریق جنتامایسین نشان داد گرچه در گروه تجربی (جنتامایسین + محیط کشت مفید) کاهش اندکی در میزان Cr سرم خون نسبت به گروه مدل (جنتامایسین) و شم صورت پذیرفته است. اما فاقد سطح معنی دار می باشد (نمودار ۳). تغییرات BUN نیز در روز سوم مطالعه گویای این مطلب می باشد (نمودار ۴). در روز پنجم بعد از تزریق جنتامایسین نیز هیچ کاهش معنی داری در میزان BUN و Cr سرم خون نسبت به گروه مدل و شم دیده نشد (نمودار ۳ و ۴). همچنین مطالعه در روز هشتم پس از تزریق جنتامایسین در چهار گروه آزمایشی نشان داد میزان BUN در گروه تجربی نسبت به گروه جنتامایسین و شم بدون هیچ گونه تغییر معنی دار می باشد (نمودار ۴). اما میزان کراتینین سرم خون

آزمایشی در این روز تغییر چندانی را نشان نمی‌دهد. اما کست هیالین در گروه تجربی دارای کاهش معنی دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه جنتامایسین و شم می‌باشد (نمودار ۵ و شکل ۲).

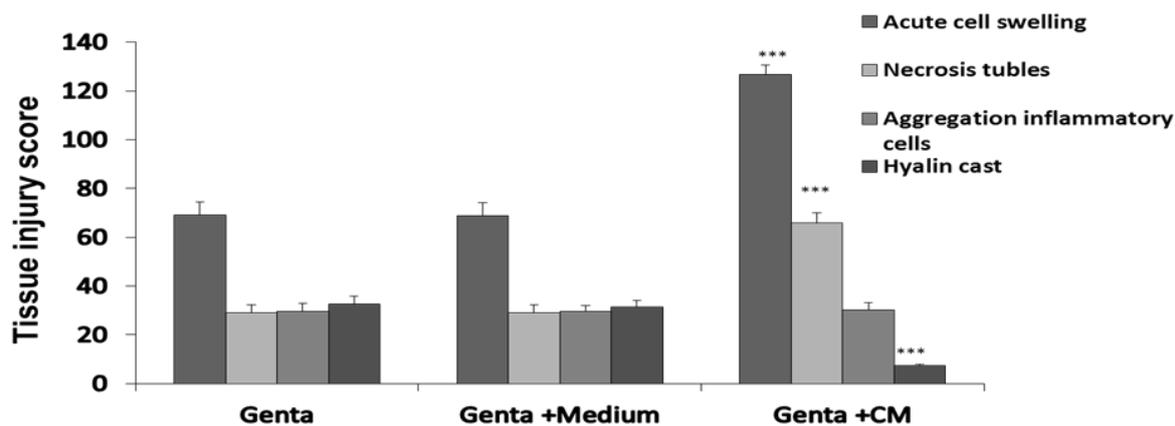
تزریق جنتامایسین در گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد که در گروه تجربی برخلاف انتظار، تورم حاد سلولی و نکروز لوله‌های ادراری دارای افزایش معنی‌دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه مدل و شم می‌باشد. در حالی که تجمع سلول‌های آماسی در گروه‌های



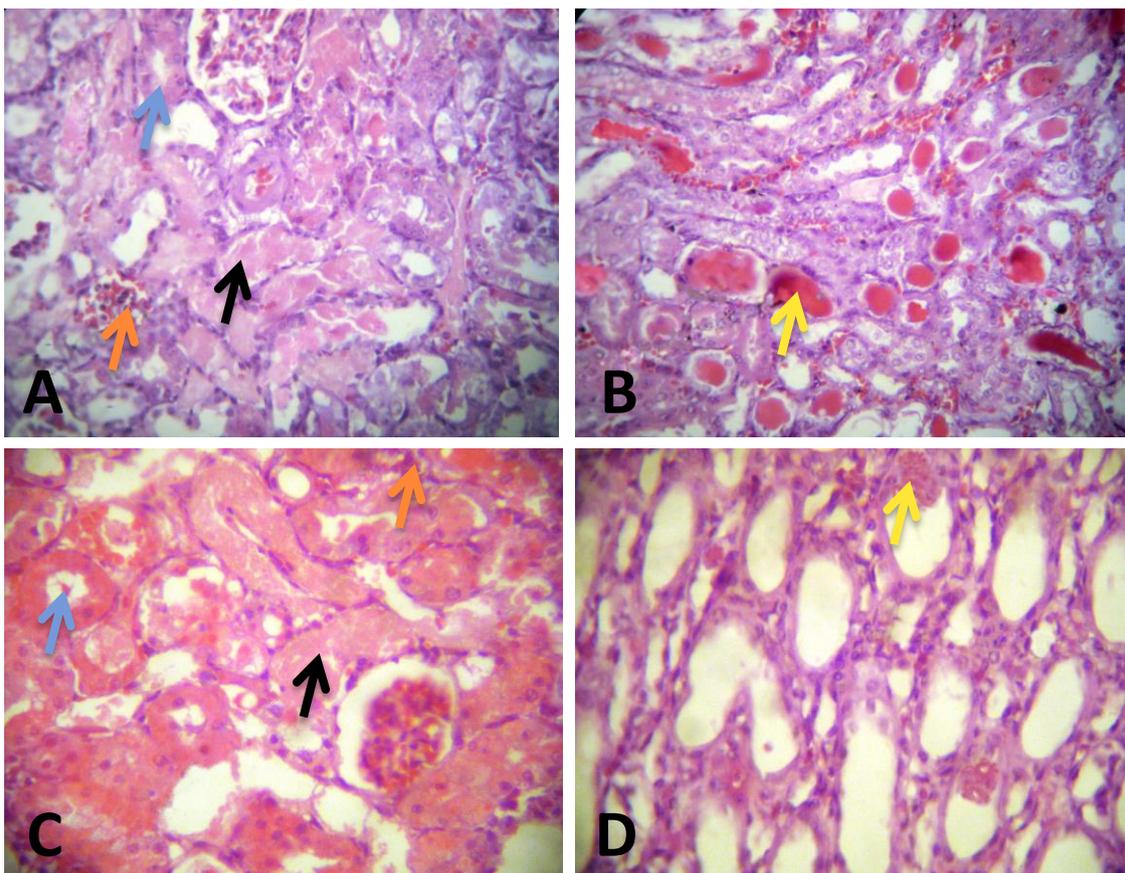
نمودار ۳: بررسی اثر hMSC-CM بر میزان تغییرات کراتینین (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در روزهای سوم، پنجم و هشتم پس از تزریق جنتامایسین: hMSC-CM فقط در روز هشتم پس از تزریق جنتامایسین سبب کاهش کراتینین با سطح معنی‌داری ($p < 0.001$) در گروه تجربی نسبت به گروه جنتامایسین و شم شده است. در روزهای سوم و پنجم هیچ کاهش معنی‌داری در گروه تجربی نسبت به گروه شم و کنترل مشاهده نمی‌شود. ($p < 0.001$) و ($p < 0.001$) سطح معنی‌داری گروه‌های آزمایشی را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.



نمودار ۴: بررسی اثر hMSC-CM بر میزان تغییرات نیتروژن اوره (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در روزهای سوم، پنجم و هشتم پس از تزریق جنتامایسین: hMSC-CM در هیچ‌کدام از روزهای سوم، پنجم و هشتم پس از تزریق جنتامایسین منجر به کاهش معنی‌داری در سطح BUN (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) سرم خون در گروه تجربی نسبت به گروه جنتامایسین و شم نشده است. ($p < 0.05$)، ($p < 0.001$) سطح معنی‌داری گروه‌های آزمایشی را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.



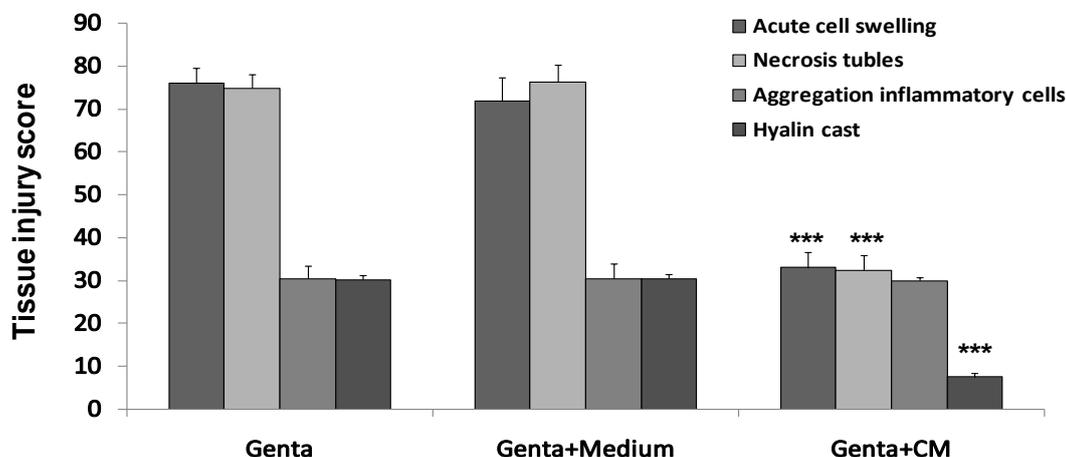
نمودار ۵: بررسی اثر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه در روز سوم پس از تزریق جنتامایسین: در گروه تجربی برخلاف انتظار تورم حاد سلولی و نکروز لوله های ادراری دارای افزایش معنی دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه مدل و شم می باشد. در حالی که تجمع سلول های آماسی در گروه های آزمایشی در این روز تغییر چندانی را نشان نمی دهد. اما کست هیالین در گروه تجربی دارای کاهش معنی دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه جنتامایسین و شم می باشد.



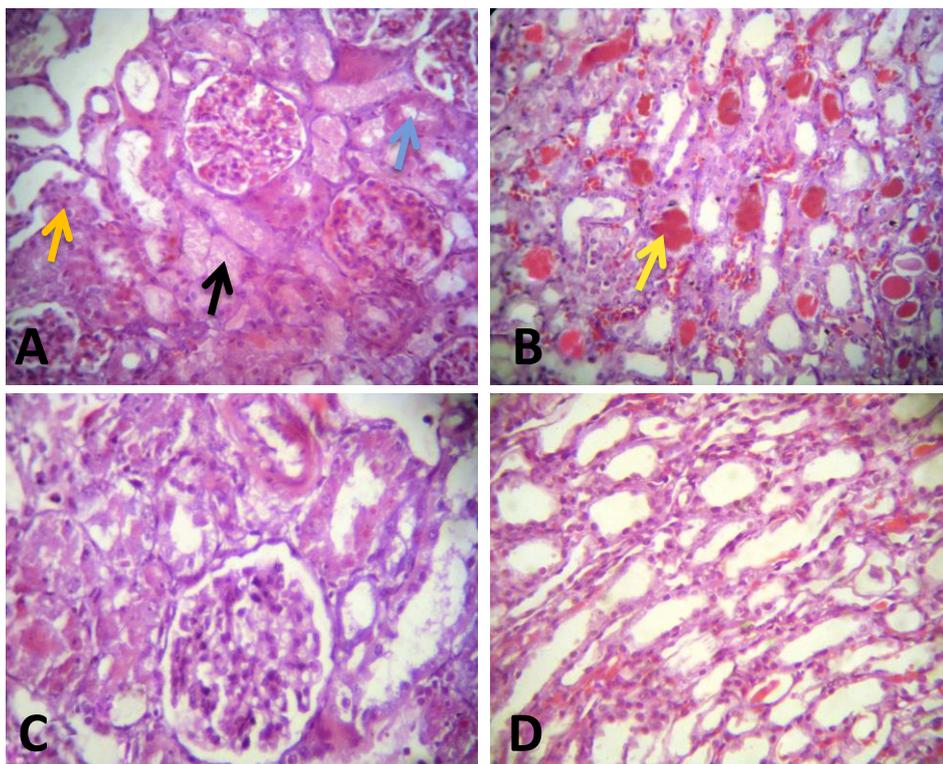
شکل ۲: تاثیر CM-hMSC بر تغییرات بافتی کلیه در حیوانات مدل آسیب حاد کلیوی القا شده با جنتامایسین در روز سوم مطالعه. A و B: فتومیکروگراف از بافت کلیه در گروه جنتامایسین تیمار نشده با CM-hMSC، نکروز لوله های ادراری، تورم حاد سلولی و تجمع سلول های آماسی در بخش قشر کلیه (A) و همچنین کست هیالین در قسمت مدولا (B) در این روز مشهود می باشد. C و D: فتومیکروگراف از بخش قشر و مدولا بافت کلیه در گروه تجربی که تنها نشان دهنده کاهش معنی داری در میزان کست هیالین در بخش مدولا در روز سوم مطالعه می باشد. نکروز لوله های ادراری (پیکان سیاه)، تورم حاد سلولی (پیکان آبی)، تجمع سلول های آماسی (پیکان نارنجی) و کست هیالین (پیکان زرد) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی $400\times$.

یافته است. درحالی که تجمع سلول های آماسی در گروه های آزمایشی در این روز هیچ گونه تغییر معنی دار را نشان نمی دهد (نمودار ۶ و شکل ۳).

بررسی های بافت شناسی در روز پنجم پس از تزریق جنتامایسین در گروه های آزمایشی نشان می دهد که تورم حاد سلولی، نکروز لوله های ادراری و کست هیالین در گروه تجربی نسبت به گروه های مدل و شم با سطح معنی داری ($P < 0.001$) کاهش



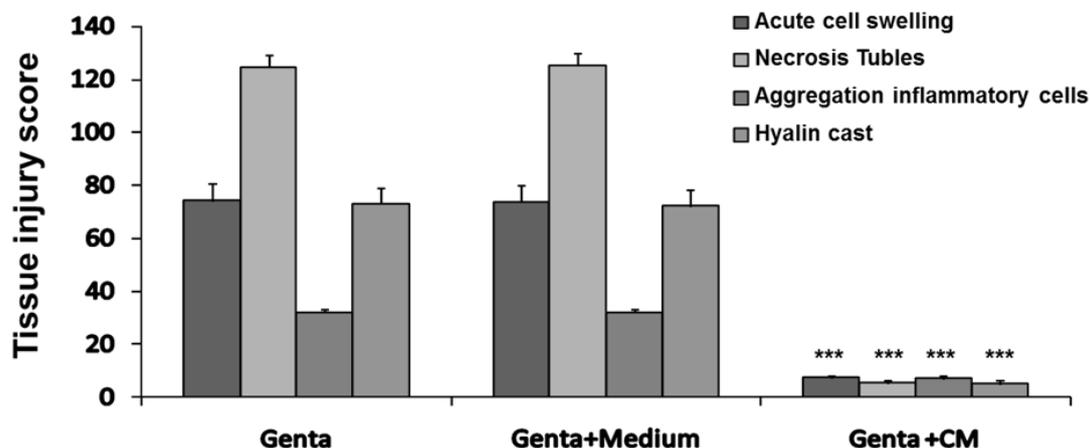
نمودار ۶: بررسی اثر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه در روز پنجم پس از تزریق جنتامایسین: تورم حاد سلولی، نکروز لوله های ادراری و کست هیالین در گروه تجربی نسبت به گروه های مدل و شم با سطح معنی داری ($P < 0.001$) کاهش یافته است. اما در تجمع سلول های آماسی در گروه های آزمایشی در این روز هیچ گونه تغییر معنی داری مشاهده نشده است.



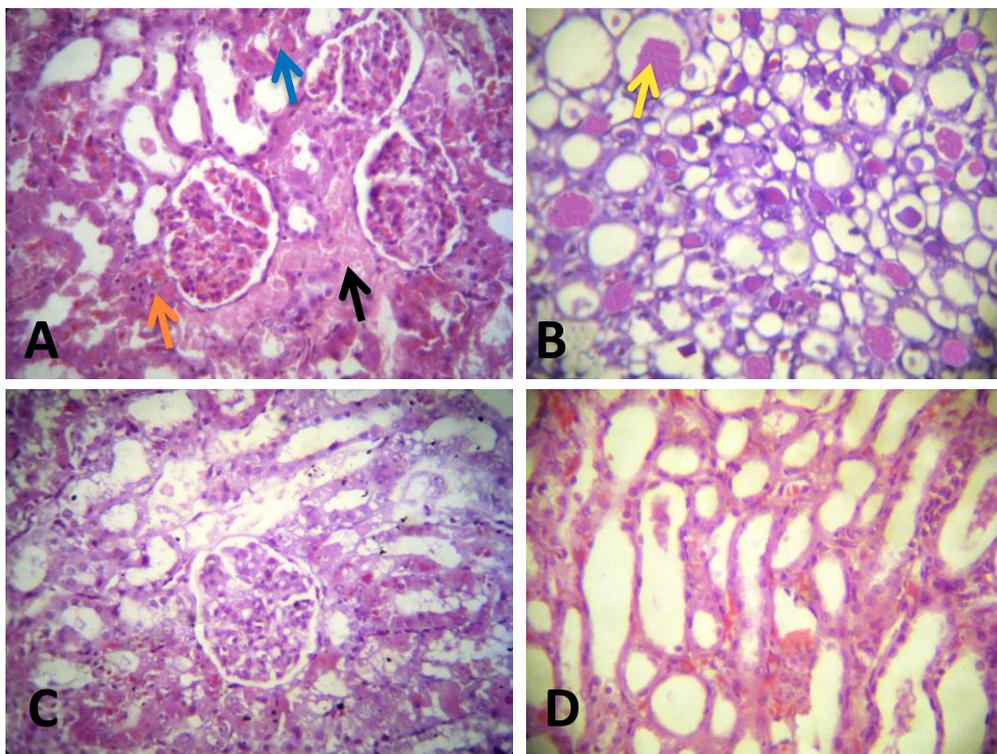
شکل ۳: تاثیر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه در حیوانات مدل آسیب حاد کلیوی القاء شده با جنتامایسین در روز پنجم مطالعه. A و B: فتومیکروگراف از بافت کلیه در گروه جنتامایسین تیمار نشده با hMSC-CM، نکروز لوله های ادراری، تورم حاد سلولی و تجمع سلول های آماسی در بخش قشر کلیه (A) و همچنین کست هیالین در قسمت مدولا (B) مشهود می باشد. C و D: فتومیکروگراف از بخش قشر و مدولا بافت کلیه گروه تجربی را نشان می دهد که می توان کاهش قابل ملاحظه ای در میزان تورم حاد سلولی و نکروز لوله های ادراری در بخش قشر کلیه و کست هیالین در لوله های جمع کننده ادراری نسبت به گروه مدل در روز پنجم مطالعه مشاهده کرد. نکروز لوله های ادراری (پیکان سیاه)، تورم حاد سلولی (پیکان آبی)، تجمع سلول های آماسی (پیکان نارنجی) و کست هیالین (پیکان زرد). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، بزرگمایی $400\times$.

این نتایج در روز سوم پس از تزریق جنتامایسین در گروه تجربی بهبودی قابل توجه در بافت کلیه مشاهده نشده است. اما بافت کلیه در روزهای پنجم و هشتم پس از تزریق جنتامایسین در گروه تجربی نسبت به گروه جنتامایسین و شم ترمیم یافته است.

در روز هشتم پس از تزریق جنتامایسین نیز تورم حاد سلولی، نکروز لوله های ادراری، تجمع سلول های آماسی و کست هیالین با سطح معنی داری ($p < 0.001$) در گروه تجربی نسبت به گروه مدل و شم کاهش یافته است (نمودار ۷ و شکل ۴). با توجه به



نمودار ۷: بررسی اثر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه در روز هشتم پس از تزریق جنتامایسین: تورم حاد سلولی، نکروز لوله های ادراری، تجمع سلول های آماسی، کست هیالین با سطح معنی داری ($p < 0.001$) در گروه تجربی نسبت به گروه مدل و شم کاهش یافته است.



شکل ۴: تاثیر hMSC-CM بر تغییرات بافتی کلیه در حیوانات مدل آسیب حاد کلیوی القا شده با جنتامایسین در روز هشتم مطالعه. A و B: فتومیکروگراف از بافت کلیه در گروه جنتامایسین تیمار نشده با hMSC-CM نکروز لوله های ادراری، تورم حاد سلولی و تجمع سلول های آماسی در بخش قشر کلیه (A) و همچنین کست هیالین در قسمت مدولا (B) در روز هشتم مطالعه مشهود می باشد. C و D: فتومیکروگراف از بخش قشر و مدولا بافت کلیه گروه تجربی را نشان می دهد که می توان کاهش معنی دار در تمام معیارهای آسیب بافتی را در این گروه نسبت به گروه مدل در روز مورد بررسی مشاهده کرد. { نکروز لوله های ادراری (پیکان سیاه)، تورم حاد سلولی (پیکان آبی)، تجمع سلول های آماسی (پیکان نارنجی) و کست هیالین (پیکان زرد) }. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگمایی $\times 400$.

بحث

سمیت حاد کلیوی ناشی از مصرف جنتامایسین در بیماران مبتلا به انواعی از عفونت‌ها به‌عنوان مثال عفونت های چشمی، ریوی و روده‌ای از جمله عوارض جانبی مهم این دارو می‌باشد که باعث محدودیت مصرف آن می‌شود (۲۳). علی‌رغم اثرات سمی ناخوشایند جنتامایسین، به‌دلیل ثبات شیمیایی آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید، اثرات ضد باکتریایی شدید، کاربرد توام با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر، مقاومت کم و هزینه درمانی اندک برای بیماران هنوز هم به‌طور وسیعی به‌کار می‌روند (۲۷).

در این مطالعه برطبق تعدادی تحقیقات و مطالعات گذشته انتظار می‌رفت که محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثرات محافظتی در برابر سمیت حاد کلیوی ناشی از جنتامایسین در مدل حیوانی موش صحرایی داشته باشد. با اینکه محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجب ترمیم بافتی در روزهای پنجم و هشتم پس از تزریق جنتامایسین در گروه تجربی شدند. اما تقریباً هیچ تأثیر معنی‌داری در کاهش بیومارکرهای شیمیایی سرم خون در روزهای مورد بررسی نداشتند. اما ترمیم بافت کلیوی در روزهای مورد نظر در گروه تجربی را می‌توان نشانه اثرات مثبت و ترمیم‌کنندگی محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بافت کلیه دارای نارسایی حاد کلیوی ناشی از جنتامایسین دانست. به‌علاوه نشان داده شد که محیط کشت فاقد فاکتورهای ترشحی این سلول‌ها از سلول‌های کلیه در برابر جنتامایسین محافظت نمی‌کنند.

آمینوگلیکوزیدها متابولیزه نمی‌شوند و اساساً توسط فیلتراسیون گلوبولی دفع می‌شوند. به‌طور نسبی مقادیر بالا از دوز تزریق داخل رگی (حدود ۱۰ درصد) در کورتکس کلیه تجمع می‌یابد. درحالی‌که توزیع کمی از آمینو گلیکوزیدها داخل بافت‌های دیگر گزارش شده است (۲۸). در کل مسمومیت توبولار جنتامایسین به‌دو صورت ظاهر می‌شود یا جنتامایسین موجب مرگ در سلول‌های اپی‌تلیال توبولار می‌شود که همراه با تولید ترکیبات التهابی می‌باشد یا باعث اختلال در عمل‌کرد ترکیبات کلیدی سلولی که درگیر در نقل و انتقال آب و مواد محلول هستند می‌شود (۲۹ و ۳۰). در واقع جنتامایسین با القا نکروز و آپوپتوزیس در سلول‌های اپی‌تلیال توبولار منجر به کاهش عملکرد توبولار و نقص در بازجذب مایع و الکترولیت‌ها می‌گردد. این رخداد گرچه منجر به هیچ کاهش مستقیمی در GFR (نسبت فیلتراسیون گلوبولی) نمی‌شود. اما به‌طور مستقیم

از طریق فعال‌سازی مکانیسم TGF (ضریب تصفیه گلوبولی) موجب کاهش در سطوح GFR می‌شود. از آن‌جا که فرآورده‌های زاید متابولیک برای دفع به فیلتراسیون گلوبولی وابسته هستند. هر گاه GFR به میزان ۵۰ درصد کاهش یابد. کلیه‌ها به صورت گذرا فقط نیمی از کراتینین را تصفیه و دفع می‌کنند. بنابراین کراتینین در مایعات بدن تجمع یافته و غلظت پلاسمایی آن بالا می‌رود. در بیماران مبتلا به بیماری‌های کلیوی که دچار کاهش زیادی در GFR هستند غلظت اوره پلازما به‌طور بارزی افزایش می‌یابد. به این ترتیب جنتامایسین با کاهش GFR موجب افزایش کراتینین و BUN در خون می‌شود (۳۱).

تعدادی از مطالعات پیشین مشخص نموده است که تجویز فاکتورهای رشد قبل و بعد از آسیب کلیوی در مدل‌های جانوری، موجب بهبود آسیب و افزایش ترمیم کلیوی می‌شود. علت آن می‌تواند اثرات آنتی آپوپتوتیک، Proliferative و پروآنژیوژنیک آن‌ها باشد (۳۲ و ۳۳). اثبات شده است که محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی فعال‌کننده مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT می‌باشد که کاهش دهنده آپوپتوزیس و افزایش دهنده بقا سلول‌های اپیتلیال توبولار پرکسیمال می‌باشد (۳۴). به‌عنوان مثال فاکتور رشد هپاتوسیت، فاکتور رشد اندوتلیال رگی، IGF-1، EGF پروتئین phosphatidylinositol-3-kinase را فسفریله و فعال می‌کنند که آن نیز AKT را فسفریله و فعال می‌کند AKT سیگنال‌های بقا را توسط چند مکانیسم مستقل فراهم می‌کند (۳۵، ۳۶ و ۳۷). در این مطالعه ما فرض کردیم اگر فاکتورهای لازم برای ترمیم در هنگام بروز آسیب در محل حضور داشته باشند بیشتر می‌توانند مفید واقع شوند. از طرف دیگر تزریق محیط کشت مفید پیش از تزریق جنتامایسین احتمالاً می‌تواند موجب افزایش پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک و پروآنژیوژنیک نسبت به پروآپوپتوتیک و آنتی‌آنجیوژنیک شود که ممکن است این افزایش که از قبل ایجاد شده در هنگام تزریق جنتامایسین مفید واقع شود و از اثرات سمی آن بکاهد.

در زمان حاضر مشخص نمی‌باشد که چطور فاکتورهای ترشح شده به‌وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند محافظت کلیوی را ارائه دهند. شناسایی و پالایش این فاکتورها مسیر جدیدی را برای درمان دارویی AKI فراهم می‌آورد و بدین‌وسیله از تزریق یک حجم زیادی از MSC-conditioned medium جلوگیری می‌کند (۳۸). با اینحال با وجود همه

روزهای مورد بررسی در کلیه واجد آسیب بافتی ناشی از القا جنتامایسین می‌شود.

تشکر و قدردانی

مولفین مراتب سپاس خود را از زحمات فراوان خانم سارا طالب گلستانی و خانم مرضیه قاسمی در انجام این پروژه ابراز می‌دارند.

منابع

1. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83(1): 253-307.
2. Guyton A, Hall J. Test book of Medical physiology, 11th Ed, Volume 1, Translated by: Farrokh shadan, M.D. Tehran, Chehr co, 2006.
3. Bagshaw SM. Short- and long-term survival after acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 2126-2128.
4. Humes HD, Szczytko MS. Advances in cell therapy for renal failure. *Transpl Immunol* 2004; 12(3-4): 219-227.
5. Patschan D, Plotkin M, Goligorsky MS. Therapeutic use of stem and endothelial progenitor cells in acute renal injury: *caira. Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 176-183.
6. Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol*. 1999; 12(suppl 2): S142-S151.
7. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004; 114(1): 5-14.
8. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units—causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med*. 1996; 24: 192-198.
9. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*. 2005; 23(7): 845-856.
10. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*. 2006; 441(7097): 1094-1096.
11. Aejaz HM, Aleem AK, Parveen N, et al. Stem cell therapy—Present status. *Transplant Proc*. 2007; 39: 694-699.
12. Brooke G, Cooka M, Blair C, Han R, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18(6): 846-858.

اطلاعاتی که در جریان مطالعات به دست آمده هنوز نمی‌توانیم یک نتیجه نهایی به دست آوریم. که آیا اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی درگیر در تر میم کلیه به‌طور مستقیم به‌وسیله تمایز سلولی می‌باشند یا ناشی از امتزاج بین این سلول‌ها و سلول‌های آسیب دیده است. یا این‌که به‌طور غیر مستقیم توسط اثرات پاراکرینی- اندوکرینی متنوع ایجاد شده به‌وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی سلول‌های توبولار می‌باشد (۳۹، ۴۰ و ۴۱). اگر اثرات محافظتی به‌واسطه عمل کرد اندوکرینی سلول‌ها باشد، تزریق خود سلول‌ها ضروری به‌نظر نمی‌رسد، بلکه فاکتورهای ترشحی آن‌ها هستند که باید هنگام آسیب در محل حاضر باشند. نتایج حاصل از این مطالعه منعکس کننده اثرات محافظتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به واسطه عمل کرد اندوکرینی آن‌ها می‌باشد (۱۵) که با تعدادی از مطالعات پیشین مطابقت دارد. به گونه ای که Hui Zhang و همکارانش (۴۲) تحت یک مطالعه بیان کردند فاکتورهای سلول‌های بنیادی و فاکتورهای تحریک کننده کلنی ماکروفاژ- گرانولوسیت به‌طور جزئی موجب تحریک سلول‌های مغز استخوان و ایجاد اثرات درمانی در نکرور توبولار حاد ناشی از جنتامایسین می‌شوند. در پژوهشی دیگر Parekkadan و همکارانش (۴۳) حضور فاکتورهای رشد IGF-1، HGF، VEGF و مولکول‌های آنتی‌آپوپتوتیک دیگر را در MSC-Conditioned medium آشکار کردند و نشان دادند این مولکول‌های بیواکتیو منجر به افزایش درصد بقا حیوانات دریافت کننده می‌گردد. گرچه Gheisari و همکارانش (۴۴) اثرات درمانی Conditioned media حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش (MSC) و سلول‌های بنیادی سوماتیک طناب خونی نافی انسانی (USSC) را بر نارسایی حاد کلیوی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه هیچ اثر سودمندی برای Conditioned media مشتق شده از این دو نوع سلول بر بهبودی نروپاتی القا شده با سیس پلاتین مشاهده نشد (۴۴).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار با محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی گرچه موجب کاهش در بیومارکرهای شیمیایی سرم خون در کلیه دارای نارسایی حاد کلیوی با جنتامایسین (به جز در کراتینین سرم خون روز هشتم) نمی‌شود، اما تقریباً باعث بهبودی بافت کلیه در تعدادی از

13. Bussolati B, Hauser PV, Carvalhosa R, Camussi G. Contribution of stem cells to kidney repair. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009; 4(1): 2–8.
14. Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292: F1626-F1635.
15. 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): 2486–2496.
16. Humphreys BD, Duffield JD, Bonventre JV. Renal stem cells in recovery from acute kidney injury. *Minerva Urologica e Nefrologica.* 2006; 58:13–21.
17. Fervenza FC, Tsao T, Rabkin R. Response of the intrarenal insulin-like growth factor-I axis to acute ischemic injury and treatment with growth hormone and epidermal growth factor. *Kidney Int.* 1996; 49(2): 344–354.
18. Hise MK, Li L, Mantzouris N, et al. Differential expression of insulin-like growth factor system during renal injury and hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 269 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 38. 1995; F817–F824.
19. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98(5): 1076–1084.
20. Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F31–F42.
21. Julie A, William L. Stanford (eds), *Stem Cells in Regenerative Medicine: Methods and protocols*, vol. 482; 2009 Humana Press, a part of Springer Science+ Business Media. DIO: 10.1007/978-1-59745-060-18 Springerprotocols.com.
22. Chen LF, Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(4): 1053–1075.
23. Nakakuki M, Amasaki FY, Shinkawa T, Kudo M, et al. Protective effect of human ulinastatin against gentamicin-induced acute renal failure in rats. Fuji Central Research Laboratory, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., 722 Jimba-aza-Uenohara, Gotemba, Shizuoka 412, Japan. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1996; 74: 104–111.
24. Laurent G, Carlier MB, Rollman B, et al. Mechanism aminoglycoside induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol.* 1982; 31(23): 3861–3870.
25. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 1990; 40: 2383–2392.
26. Kacew S, Bergeron MG. Pathogenic factors in aminoglycoside induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 1990; 51(3): 241–25.
27. Edson RS, Terrell CL. The aminoglycosides. *Mayo Clin Proc.* 1999; 74(5): 519–528.
28. Nagai J, Takano M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab. Pharmacokineti.* 2004; 19, 159–170.
29. Li J, Li QX, Xie XF, et al. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin induced renal tubular toxicity in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009; 620: 97–104.
30. El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, et al. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 665–675.
31. Jose M, Lopez-N, Yaremi Q, Laura V, et al. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney International.* 2010; 79(1): 33–45; doi:10.1038/ki.2010.337.
32. Hammerman MR. Growth factors and apoptosis in acute renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998; 7(4): 419–424.
33. Hammerman MR. New treatments for acute renal failure: growth factors and beyond. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997; 6:7–9.
34. Kuwana H, Terada Y, Kobayashi T, Okado T, et al. The phosphoinositide-3 kinase gamma-Akt pathway mediates renal tubular injury in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2008; 73(4): 430–445.
35. 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: 411–422.
36. 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: 489–498.
37. Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest.* 2005; 115(10): 2618–2624.

38. Fangming Lin. Renal repair: role of bone marrow stem cells-PediatrNephrol. 2008; 23: 851–861 DOI 10.1007/s00467-007-0634-8.
39. Patrick C. Baer and Helmut Geiger-Renal repair: role of bone marrow stem cells-PediatrNephrol. 2008; 23: 851–861 DOI 10.1007/s00467-007-0634-8.
40. Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. J Clin Invest. 2004; 113: 1266-1270.
41. Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. Nat Med. 2004; 10: 744-748.
42. Zhang Hui, Haitao Bai, Zhuwen Yi, Xiaojie He, et al. Effect of Stem Cell Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Bone Marrow Stem Cell Mobilization on Recovery from Acute Tubular Necrosis in Rats Renal Failure. 2012; 34(3); 350–357, Copyright © Informa Healthcare USA, Inc. ISSN0886-022Xprint/1525-6049online. DOI:10.3109/08 86022X.2011.647340.
43. Parekkadan B, Van PD, Suganuma K, Carter EA, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. PLoS ONE 2007; 2:e941.
44. Gheisari Y, Ahmadbeigi N, Naderi M, Nassiri S, et al. Stem Cell Conditioned Medium Can Not Protect Against Kidney Failure. Cell Biology International Immediate Publication. Publishe on 18 Oct 2010 as manuscript CBI20100183. DOI: 10.1042/ CBI20100183.

Effect of Conditioned Media from Human Mesenchymal Stem Cells on Acute Kidney Injury Induced by Gentamicin in Rat

Abedi A, MSc.^{1*}, Azarnia M, Ph.D.², Jamali M, Ph.D.³, Moayer F, Ph.D.⁴

1. MSc, Kharazmi (TarbiatMoallem) University, Tehran, Iran

2. Kharazmi (TarbiatMoallem) University, Tehran, Iran

3. Department of Pathology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran

4. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj, Iran

* Email corresponding author: abedimasoomah@yahoo.com

Received: 28 Jan. 2013

Accepted: 20 August. 2014

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the effect of secretory factors of human mesenchymal stem cells on gentamicin-induced acute kidney injury in rats.

Material and Methods: Firstly, an experiment was designed to achieve a standard animal model. Animals were randomly divided into four groups. One group was considered as control which received no injection. Three other groups were treated with intraperitoneal 100 mg/kg gentamicin for six consecutive days. Then one of the three groups was injected with conditioned media of human mesenchymal stem cells and other group was injected with medium without secretory factors intraperitoneally for three consecutive days. Finally, in the third, fifth and eighth days after gentamicin injection, kidney and blood samples from all animals were collected for histological and biochemical analysis.

Result: Results, except in the special case, showed no significant decrease in the amount of blood biomarkers of animals in the group receiving the condition media of human mesenchymal stem cells compared to two another groups. The improvement of tissue damage, however, has been observed in the number of days.

Conclusions: These findings suggest that secretory factors of human mesenchymal stem cells have a protective effect against gentamicin-induced nephrotoxicity

Keywords: Acute kidney injury, Gentamicin, Secretory factors