بررسی وضعیت اکسیداتیو بافت مغز موش‌های صحرایی نر مبتلا به سپسیس پس از تجویز ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی

فرزانه کیانیان[1]، مهری کدخدایی[1]، بهجت سیفی[1]، فریبا آخوندزاده[1]، کمال عبدالمحمدی[2]، آرش عبدی[1]، مینا رنجبران[1*]

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی.
تلفن: ۶۴۰۵۳۲۶۹-۰۲۱
E-mail: m-ranjbaran@sina.tums.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۰/۰۸/۰۱

زمینه و هدف: فرضیه مورد بررسی در این مطالعه آن است که ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمال (CM) سبب کاهش استرس اکسیداتیو در بافت مغز در موش‌های صحرایی نر مبتلا به سپسیس می‌گردد.

روش بررسی: این مطالعه در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران از شهریور ۱۳۹۷ تا اردیبهشت ۱۳۹۸ انجام شد. ترشحات از سلول‌های بنیادی مزانشیمال بافت چربی موش در پاساژ دوم جمع‌آوری شد. موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (g ۲۵۰-۲۲۰) به سه گروه آزمایشی تقسیم شدند: شم، سپسیس و CM. سپسیس در گروه‌های سپسیس و CM القا شد. دو ساعت پس از القاء سپسیس، حیوانات در گروه CM، ترشحات 5×10^5 سلول بنیادی مزانشیمی را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از درمان، فشار سیستولی و میزان اشباع اکسیژن خون شریانی در حیوانات اندازه‌گیری شد. سپس نمونه خون حیوانات به‌منظور سنجش شاخص‌های التهابی و نمونه بافت مغز به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیداتیو گردآوری گردید.

یافته‌ها: در حیوانات سپتیک، کاهش معنادار در فشارخون سیستولی، درصد اشباع اکسیژن خون شریانی و فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز مشاهده گردید (P<۰/۰۵). در این گروه، افزایش معنادار در سطوح شاخص‌های التهابی و محتوای مالون دی‌آلدهید مغزی نسبت به گروه شم دیده شد (P<۰/۰۵). استفاده از CM سبب بهبود معنادار فشارخون سیستولی، درصد اشباع اکسیژن خون شریانی، شاخص‌های التهابی پلاسما و پارامترهای اکسیداتیو مغزی گردید (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که استفاده از ترشحات سلول‌های بنیادی سبب بهبود وضعیت التهابی و اکسیداتیو در موش‌های مبتلا به سپسیس می‌گردد و ممکن است بتوان آن را به‌عنوان یک درمان موثر در بیماران مبتلا به سپسیس در آینده به‌کار برد.

کلمات کلیدی: ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمال، التهاب، استرس اکسیداتیو، سپسیس.

مقدمه

در سال‌های گذشته سپسیس (Sepsis) به‌عنوان پاسخ التهابی تشدید شده میزبان و افت فشارخون، گاهی به‌صورت برگشت‌ناپذیر، در پاسخ به عفونت شناخته می‌شد، اما امروزه سپسیس به‌عنوان اختلال در واکنش میزبان تعریف شده که منجر به نارسایی اندام‌های متعدد و مرگ می‌شود.[1] در حال حاضر، درمان دارویی موثری برای این بیماری وجود ندارد و در این گونه موارد بیشتر درمان علامتی مانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و تزریق کاتکول‌آمین‌ها توصیه می‌شود.[2]

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

در فرد مبتلا به سپسیس، هایپوکسی بافتی و پاسخ التهابی سیستمیک پدیدار می‌گردد که این پاسخ‌ها در آسیب به ارگان‌ها و پدیدار شدن اختلال در عملکرد آنها به‌طور زودرس نقش دارند.[۳و۴] در مراحل ابتدایی سپسیس، Nuclear factor kappa B (NF-κB) با به راه‌اندازی آبشار التهابی سبب تولید انبوه سایتوکین‌های پیش‌برنده التهاب مانند فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (Tumor necrosis factor alpha, TNF-α) توسط ماکروفاژها و مونوسیت‌ها می‌گردد. فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا به نوبه خود می‌تواند سبب القاء تولید سایر فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین‌ها شده و در نهایت، سبب اختلال در عملکرد ارگان‌ها و مرگ گردد.[۵]

به هنگام سپسیس، عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها سبب بروز استرس اکسیداتیو می‌گردد. مطالعات پیشین پیشنهاد می‌کنند که ناتوانی سلول در مصرف اکسیژن و عملکرد نامناسب میتوکندری‌ها نقش مهمی در پاتوژنز سپسیس ایفا می‌کنند. طی سپسیس تولید فزاینده اکسیدان‌ها نیز در تشدید وضعیت اکسیداتیو موثر است.[۶] مالون دی‌آلدهید (Malondialdehyde, MDA) یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدهاست که به‌عنوان شاخص آسیب استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود.[۷]

مغز یکی از ارگان‌های اصلی است که متاثر از شرایط سپتیک می‌باشد. در طی سپسیس، تولید محیطی سایتوکین‌های پیش‌برنده التهاب و گونه‌های فعال اکسیژن سبب تغییرات ساختاری در سد خونی- مغزی می‌گردد. بنابراین افزایش نفوذپذیری این سد منجر به فعال شدن میکروگلیاها و تولید مدیاتورهای توکسیک می‌گردد که به نوبه خود سبب آسیب بیشتر سد خونی- مغزی می‌گردد.[۸]

طی دهه گذشته، استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان یک روش درمانی جدید برای اختلالاتی مانند سپسیس و شوک سپتیک معرفی شد.[۹] در این راستا سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells, MSCs) جذابترین کاندیدا برای کاربردهای آزمایشگاهی و بالینی محسوب می‌شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی در دسترس بوده و قابل جداسازی از بافت‌های مختلف از جمله مغز استخوان، بافت چربی، خون بندناف، خون سیستمیک، مایع آمنیوتیک و همچنین جفت و برخی منابع دیگر می‌باشند. این سلول‌ها به راحتی قابل کشت بوده و عملکردهای بیولوژیک ویژه MSCs، آنها را به کاندیدای شناخته شده‌ای برای سلول درمانی در مطالعات پیش‌بالینی و آزمایشات بالینی تبدیل کرده است.[۲و۱۰] در ابتدا تصور می‌شد که این سلول‌ها توسط جایگزینی سلول‌های آسیب دیده، سبب تسهیل ترمیم آسیب در ارگان‌ها و بافت‌ها می‌گردند اما امروزه تصور بر این است که این سلول‌ها در پاسخ به آسیب بافتی، به محل آسیب مهاجرت کرده و با تولید فاکتورهای تروفیک از جمله فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها سبب ترمیم آسیب می‌گردند.[۱۱] یکی از تکنیک‌های کاهنده التهاب، استفاده از ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Conditioned Medium, CM) در شرایطی است که التهاب در ایجاد آن شرایط از جمله شوک سپتیک نقش مهمی ایفاء می‌کند.[۱۲]

با توجه به مطالب فوق‌الذکر، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات تجویز داخل صفاقی ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CM) بر آسیب اکسیداتیو مغزی ناشی از سپسیس در موش‌های صحرایی نر می‌باشد. به‌منظور اطمینان از القاء شوک سپتیک، فشارخون سیستولی و میزان اشباع اکسیژن خون شریانی در حیوانات اندازه‌گیری شد. از آنجا که در شوک سپتیک، افزایش مخرب سایتوکین‌ها مشاهده می‌شود، بنابراین اثر حفاظتی این ترشحات بر غلظت پلاسمایی سایتوکین‌هایی نظیر فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦ مدنظر قرار گرفت. در این مطالعه همچنین وضعیت شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز در شرایط سپسیس و پس از تجویز ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CM) نیز بررسی گردید.

روش بررسی

این مطالعه پژوهشی از شهریور ۱۳۹۷تا اردیبهشت ۱۳۹۸در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید. تحت شرایط استریل، سلول‌های بنیادی مزانشیمی نمونه‌های بافت چربی از پدهای چربی اینگوینال شش موش کشته شده توسط استنشاق CO_2 گردآوری شد. بافت چربی به قطعات کوچک تقسیم و در محلول کلاژناز نوع ۱ (غلظت نهایی ۰/۱٪، Invitrogen Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ قرار داده شد. مخلوط هضم شده با ٤ ml در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ سرم گاوی (FBS, Gibco, USA) رقیق و سپس در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا بخش سلولی از

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

سلول‌های بافت چربی جدا شود. مایع رویی دور ریخته شد و پلت سلولی از طریق مش نایلونی ۲۰۰ µm به‌منظور حذف بافت‌های هضم نشده فیلتر شد و در DMEM-HG حاوی ۱۵٪ سرم گاوی (FBS)، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و سپس در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 انکوبه شد. اولین تعویض محیط حدود دو روز پس از شروع کشت انجام شد که در آن سلول‌های غیرچسبان حذف شدند. تعویض محیط هر ٤٨ یا ٧٢ ساعت تکرار شد. پس از دستیابی به تراکم ۹۰٪-۸۰٪ سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تریپسین ۰/۰۵٪ (Sigma, USA) و EDTA ۰/۰۲٪ برای پاساژ جدید انکوبه شدند و تا پاساژ ۲ کشت داده شدند (شکل ۱).[۱۳]

به‌منظور بررسی تمایز سلول به استخوان، $۱×۱۰^{٤}$ سلول بنیادی مزانشیمی در پلیت‌های ٢٤ خانه (SPL Life Sciences, South Korea) کشت داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند، محیط تمایز به استخوان (دگزامتازون ۱۰۰ mmol، β-گلیسیروفسفات ۱۰ mmol و اسید آسکوربیک ۵ g/mL) هر ۷۲ ساعت به مدت سه هفته به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها با پارافورمالدیید ٤٪ فیکس شدند و مینرالیزاسیون با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S (شکل ۲ الف) تعیین شد.[١٤]

به‌منظور بررسی تمایز سلول به بافت چربی، $۱۵×۱۰^{۳}$ سلول بنیادی مزانشیمی در پلیت‌های ٢٤ خانه (SPL Life Sciences, South Korea) کشت داده شدند و در ۳۷ °C انکوبه شدند. پس از ٢٤ ساعت، محیط تمایز چربی (ایندومتاسین ۱۰۰ mmol، ۳-ایزوبوتیل متیل گزانتین ۰/۵ mmol، دگزامتازون ۲۵۰ mmol و انسولین گاوی ۵ mmol) هر ۷۲ ساعت به سلول‌ها اضافه و به‌مدت دو هفته انکوباسیون صورت گرفت. واکوئل‌های چربی پس از فیکس کردن سلول‌ها در پارافورمالدیید ٤٪ با رنگ‌آمیزی Oil Red O (شکل ۲ ب) شناسایی شدند.[١٤]

به‌منظور جمع‌آوری CM در این مطالعه، ترشحات سلول‌ها پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون سلول‌های بنیادی در پاساژ دوم در محیط کشت بدون سرم جمع‌آوری شد. مایع رویی به‌دست آمده سانتریفیوژ، فیلتر و بلافاصله به حیوانات در گروه CM تزریق شد.[۱۳]

در این مطالعه موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. ۱۸ سر موش به وزن ۲۵۰ g-۲۲۰ در حیوانخانه گروه فیزیولوژی در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت چرخه تاریک و روشنایی و دمای ۲۲ °C-۲۰) نگهداری شدند و در کلیه مراحل به جز به هنگام انجام آزمایشات، دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. کلیه مراحل و روش‌های مراقبت از حیوانات در آزمایشات توسط کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب شد (شماره پروژه: ۳۸۹۲۸، کد اخلاق: IR.TUMS.MEDICINE.REC.1397.605).

تحت بیهوشی با کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg)، یک برش در خط میانی شکم به اندازه ۲ cm ایجاد شد و سکوم با دقت بیرون کشیده شد تا از آسیب به رگ‌های خونی جلوگیری شود. در مرحله بعد، سکوم با نخ بخیه سیلک دقیقا در زیر دریچه ایلئوسکال بسته شد و دو مرتبه با سرسوزن شماره ۱۸ سوراخ و فشرده شد به طوری که مقدار کمی مدفوع از محل سوراخ شدن سکوم خارج شد. سپس، شکم در دو لایه با نخ بخیه سیلک بسته شد و پس از آن احیاء با نرمال سالین (به‌صورت زیر جلدی، ۳ ml به ازای هر ۱۰۰ g وزن بدن) صورت گرفت و حیوان به قفس بازگردانده شد.[۱۵] در صورت لزوم، بی‌دردی با تزریق داخل عضلانی کتورولاک به میزان ۰/۸٦ mg/kg القا شد.

حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه آزمایشی (شش تایی) تقسیم شدند: شم، سپسیس و CM. موش‌های صحرایی در گروه‌های سپسیس و CM تحت القاء سپسیس قرار گرفتند. در گروه شم، حفره شکمی بدون القاء سپسیس باز شد و مجددا بخیه شد. دو ساعت پس از القاء سپسیس به روش CLP، حیوانات در گروه CM، ترشحات $۵×۱۰^{۵}$ سلول بنیادی مزانشیمی (CM) را به‌صورت داخل صفاقی (با حجم ۵ ml-۳) دریافت کردند درحالی‌که گروه‌های شم و سپسیس تنها PBS دریافت کردند. همه موش‌ها در قفس‌های جداگانه نگه داشته شدند. بیست و چهار ساعت پس از درمان و پیش از نمونه‌گیری، فشار سیستولی با استفاده از سیستم پاورلب و میزان اشباع اکسیژن خون شریانی در حیوانات با استفاده از پالس‌اکسیمتر اندازه‌گیری شد. سپس موش‌ها با استفاده از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی بیهوش شدند و نمونه خون به منظور سنجش شاخص‌های التهابی جمع‌آوری گردید. نمونه بافت مغز به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیداتیو در نیتروژن مایع منجمد قرار داده شد. این نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های فوق‌الذکر، در دمای ۸۰ °C- نگهداری شدند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

غلظت پلاسمایی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦ به‌طور جداگانه با استفاده از روش ELISA (Zellbio, Germany) اندازه‌گیری شد. تمام معرف‌ها، استانداردها، نمونه‌های کنترل و آزمایش به‌منظور هم دما شدن با محیط، در دمای اتاق نگهداری شدند و مطابق دستورالعمل کیت آماده‌سازی محلول‌ها صورت پذیرفت. واکنش‌ها توسط جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از یک دستگاه microplate reader (BioTek Instrument, ELX 800, Inc, USA) در طول موج ٤٥٠/٥٧٠ nm قرائت شد.

سطح مالون دی‌آلدهید در بافت مغز با استفاده از روش Esterbauer و Cheeseman و براساس واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. به‌منظور ته‌نشین شدن و رسوب پروتیین‌ها، ۵۰ mg از بافت مغز با ۱ ml از محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰٪ هموژن شد. سپس با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و پس از آن به ۵۰۰ µl از سوپرناتانت حاصله، ۵۰۰ µl محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/٦۷٪ اضافه شد. محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ nm خوانده شد و پس از مقایسه با منحنی استاندارد غلظت آن محاسبه گردید.[16]

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز (Superoxide dismutase, SOD) در بافت مغز، از کیت الایزا (Navand Salamat Co., Iran) استفاده شد. تمامی محتویات کیت الایزا و نمونه‌ها در دمای اتاق قرار داده شد. به ازای ۱۰۰ mg از بافت‌های مذکور، ۵۰۰ µl بافر لیز کننده اضافه و هموژن گردید. سپس محلول حاصله در ۱۲۰۰۰ دور به‌مدت پنج دقیقه در دمای ٤ °C سانتریفیوژ شد و از مایع رویی به‌منظور سنجش فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز استفاده شد. بدین صورت که ابتدا ۵۰ µl از نمونه‌های بافت مغز که غلظت سوپراکسید دیس‌موتاز در آنها مجهول بود به تمامی چاهک‌های میکروتیترپلیت (Micro titer plate) اضافه گردید. به چاهک‌های کنترل، ۵۰ µl آب دیونیزه اضافه شد. در مرحله بعد، ۲۰۰ µl از معرف R1 و سپس ۵۰ µl از معرف R2 به کلیه چاهک‌ها اضافه شد. پس از پنج دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و به دور از نور، جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از الایزا ریدر در طول موج ٤٠٥ nm قرائت شد. در نهایت سطح فعالیت آنزیم با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید.

SOD activity (U/ml or mg protein)=OD Test/OD Control×200

داده‌ها به‌عنوان میانگین± خطای استاندارد میانگین ارایه شدند و با استفاده از Analysis of variance تجزیه و تحلیل شدند. Tukey test به‌عنوان Post hoc test انتخاب شد و P<۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

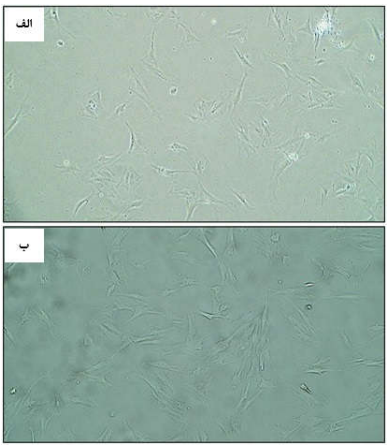
در این مطالعه، میزان بقا در گروه شم ۱۰۰٪ گزارش شد. در مجموع از ١٤ سر موش صحرایی که سپسیس در آنها القا شد، شش سر حیوان به‌مدت ٢٤ ساعت پس از القاء سپسیس زنده ماندند. بقا در حیوانات گروه سپسیس (٤٢/٨٪) کاهش معنادار نسبت به گروه شم نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۱). از هشت سر حیوانی که در گروه CM قرار گرفتند، شش حیوان تا پایان مطالعه زنده ماندند و میزان بقای حیوانات این گروه ۷۵٪ گزارش شد که به‌طور معنادار بالاتر از میزان بقا در گروه سپسیس بود (P<۰/۰۵).

در پایان مطالعه پیش از معدوم کردن حیوانات، فشارخون سیستولی در همه حیوانات اندازه‌گیری شد. افت معنادار فشارخون سیستولی در گروه سپسیس نسبت به گروه شم مشاهده گردید (٦٥/٤±٣/٠٢ در مقابل ١١٦/٤٨±٥/١٣) (P<۰/۰۵) (نمودار ۱). تجویز CM به‌طور معنادار از کاهش فشارخون ممانعت کرد (٩٩/٤±٧/٢٤) (P<۰/۰۵). القاء سپسیس موجب کاهش معنادار درصد اشباع اکسیژن خون شریانی در گروه سپسیس نسبت به گروه شم گردید (P<۰/۰۵) (جدول ۱). تجویز CM سبب افزایش معنادار درصد اشباع اکسیژن خون شریانی نسبت به گروه سپسیس گردید (P<۰/۰۵).

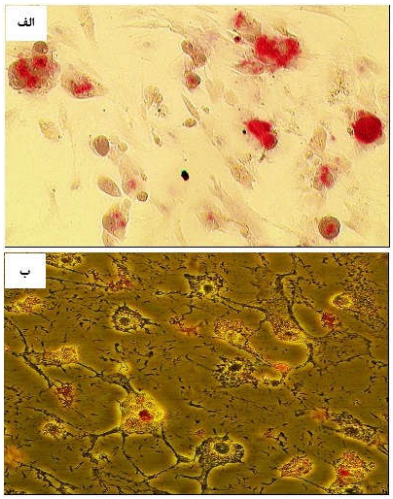
٢٤ ساعت پس از درمان، سطوح پلاسمایی شاخص‌های التهابی (فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦) در گروه سپسیس نسبت به گروه شم افزایش معنادار نشان داد (٢٤٦±٢٠/٧٨ در مقابل ٢٥±٧/٢٤ و ٨٠٣±٤٥/٢٤ در مقابل ٩٧±١١/٢٤، به‌ترتیب) (P<۰/۰۵) (نمودار ۲ الف و ۲ ب). تجویز CM به‌طور معنادار مانع از افزایش سطوح پلاسمایی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦ نسبت به گروه سپسیس گردید (١٠٥±١١/٤٧ و ٣٢٣±٦٧/١٥، به‌ترتیب) (P<۰/۰۵).

القـاء سپسیس موجب افزایش معنادار میزان مالون دی‌آلدهیـد در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

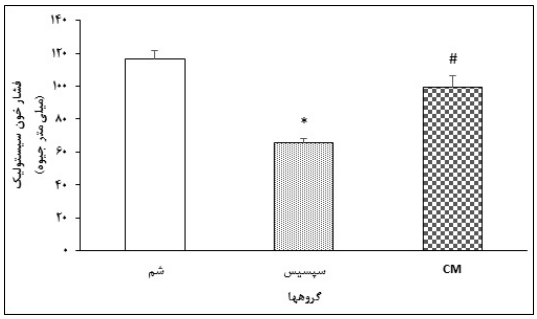


شکل ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل در پاساژ ۱ (شکل ۱ الف) و پاساژ ۲ (شکل ۱ ب). بزرگ‌نمایی عکس‌ها X ۱۰۰



شکل ۲: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت استخوانی (شکل ۲ الف) و بافت چربی (شکل ۲ ب). بزرگ‌نمایی عکس‌ها X ۱۰۰

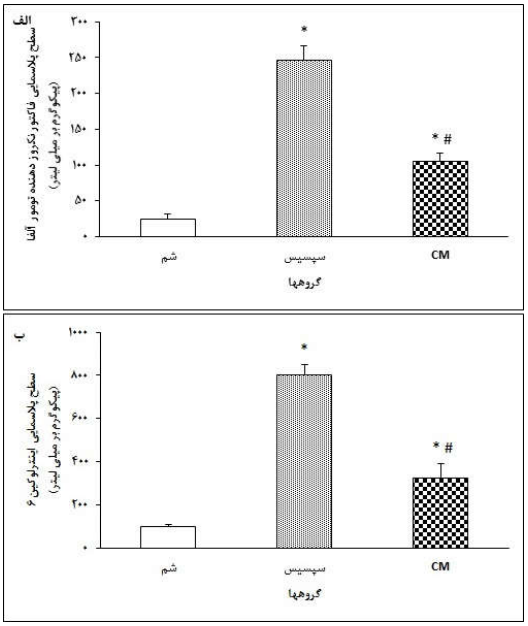
بافت مغز نسبت به گروه شم گردید. (۵٤/٤۷±۸/۱٤) در مقابل (۱۲/۳٤±۳/۹۷) (P<۰/۰۵) (نمودار ۳ الف) درحالی‌که تجویز CM سبب کاهش میزان مالون دی‌آلدهید در مقایسه با گروه سپسیس گردید (۳۳/۹۸±٤/٤۱) (P<۰/۰۵). سپسیس موجب کاهش معنادار



نمودار ۱: تأثیر تجویز CM بر فشارخون سیستولی در سپسیس ناشی از مدل CLP. داده‌ها به‌عنوان میانگین± خطای میانگین استاندارد ارایه شده‌اند (تعداد شش رت در هر گروه).

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شم. # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سپسیس.

سپسیس: سپسیس با بستن و سوراخ شدن سکوم القا شده است، CM: دو ساعت پس از القاء سپسیس، ترشحات ۵×۱۰۵ سلول بنیادی مزانشیمی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

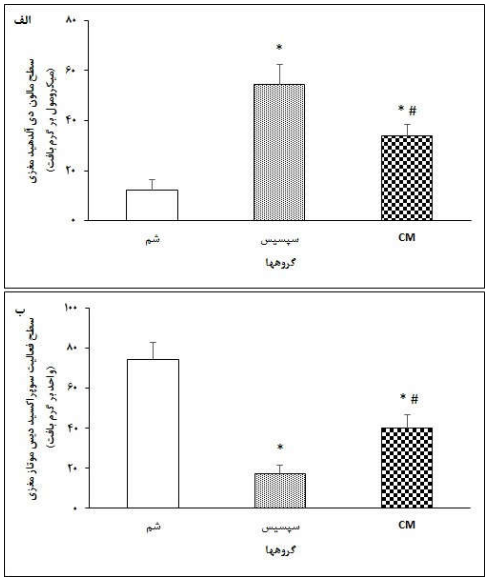


نمودار ۲: تأثیر تجویز CM بر شاخص‌های التهابی پلاسما در سپسیس ناشی از مدل CLP. داده‌ها به‌عنوان میانگین± خطای میانگین استاندارد ارایه شده‌اند. (تعداد شش رت در هر گروه).

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شم. # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سپسیس.

سپسیس: سپسیس با بستن و سوراخ شدن سکوم القا شده است، CM: دو ساعت پس از القاء سپسیس، ترشحات ۵×۱۰۵ سلول بنیادی مزانشیمی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]



نمودار ۳: تاثیر تجویز CM بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز در سپسیس ناشی از مدل CLP. داده‌ها به‌عنوان میانگین± خطای میانگین استاندارد ارایه شده‌اند. (تعداد شش رت در هر گروه).

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شم. # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سپسیس.

سپسیس: سپسیس با بستن و سوراخ شدن سکوم القا شده است، CM: دو ساعت پس از القاء سپسیس، ترشحات ۵×۱۰^۵ سلول بنیادی مزانشیمی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

جدول ۱: تأثیر تجویز CM بر میزان بقا و میزان اشباع اکسیژن خون شریانی در سپسیس ناشی از مدل CLP

	میزان بقا (٪)	میزان اشباع اکسیژن خون شریانی (٪)
شم	۱۰۰	۹۵±۲
سپسیس	٤۲/۸*	۷۸±۲/۵*
CM	۷۵#	۹۱±۲/۷#

میزان بقا به‌صورت درصد عنوان شده است و میزان اشباع اکسیژن شریانی به‌عنوان میانگین± خطای میانگین استاندارد ارایه شده است. (تعداد شش رت در هر گروه).

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شم. # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سپسیس. سپسیس: سپسیس با بستن و سوراخ شدن سکوم القا شده است، CM: دو ساعت پس از القاء سپسیس، ترشحات ۵×۱۰^۵ سلول بنیادی مزانشیمی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز در بافت مغز در گروه سپسیس نسبت به گروه شم گردید (۱۷/۳۰±٤/۲٤ در مقابل ۷٤/۲۵±۸/۷۰) (P<۰/۰۵) (نمودار ۳ ب). اما استفاده از CM سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز در گروه CM در مقایسه با گروه سپسیس گردید (٤۰/۲٤±٦/٦۷) (P<۰/۰۵).

بحث

در مطالعه حاضر، اثرات حفاظتی ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CM) بر برخی از عوارض سپسیس بررسی گردید. برای این منظور، ما ترشحات ۵×۱۰^۵ سلول بنیادی مزانشیمی را به حیوانات گروه CM به‌صورت داخل صفاقی تزریق کردیم. اگرچه نقش‌های بی‌شماری برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده شده است اما مکانیسم‌های اساسی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. در ابتدا فرض می‌شد که این سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است برای ترمیم آسیب‌های اندام به نوع دیگری از سلول‌ها تمایز یابند اما یک دیدگاه در حال گسترش عنوان می‌کند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است به‌صورت پاراکرین عمل کنند و استفاده از ترشحات آنها نقش بیشتری در ایجاد اثرات حفاظتی آنها داشته باشد.[11] در مطالعه حاضر، به منظور اطمینان از القاء سپسیس، فشارخون سیستولی و میزان اشباع اکسیژن خون شریانی اندازه‌گیری شد. سپسیس سبب افت معنادار این دو شاخص در مقایسه با گروه شم گردید. استفاده از CM از کاهش این دو شاخص به‌طور معنادار ممانعت کرد. سپسیس سبب افزایش معنادار سطوح پلاسمایی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦ نسبت به گروه شم گردید. با تجویز CM، کاهش معنادار در سطوح پلاسمایی این سایتوکین‌ها نسبت به گروه سپسیس مشاهده شد. ماکروفاژهای موجود در گردش خون و ماکروفاژهای ثابت بافتی نخستین سد دفاعی بدن در مواجهه با عامل عفونی مهاجم را تشکیل می‌دهند. ماکروفاژهای M1 و M2 فعال شده و دو نوع پاسخ مجزا و کاملا متفاوت با یکدیگر ایجاد می‌کنند. ماکروفاژهای M1 سایتوکین‌های پیش‌برنده التهاب مانند فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦ و گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و نیتروژن را آزاد کرده که در نهایت منجر به آسیب بافتی می‌گردد. درحالی‌که ماکروفاژهای M2 سایتوکین‌های ضدالتهابی ترشح می‌کنند که سبب ترمیم بافتی می‌گردد.[17] به‌نظر می‌رسد طی شرایط سپتیک بیان مارکرهای M1 در مونوسیت‌ها افزایش و همزمان بیان مارکرهای M2 در مونوسیت‌ها کاهش می‌یابد که تولید فزاینده شاخص‌های التهابی را به‌دنبال دارد.[18]

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

در مطالعه حاضر، اثرات حفاظتی CM بر کاهش پاسخ‌های التهابی ناشی از سپسیس مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که اثر ماکروفاژها در ایجاد و تشدید روند التهابی طی سپسیس با تجویز CM، کم رنگ می‌گردد. در مطالعه Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر اثرات ضد التهابی CM تاکید شده است. به‌نظر می‌رسد که ترشحات سلول‌های بنیادی از فعال شدن زیرواحد p65 در NF-κB جلوگیری نموده بنابراین از انتقال آن به هسته ممانعت می‌کند. این امر سبب کاهش تولید سایتوکین‌های پیش‌برنده التهاب از جمله فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین ٦ و در نتیجه کاهش پاسخ‌های التهابی می‌گردد.[۱۹] در راستای تعیین شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز به دنبال القاء سپسیس و بررسی اثر ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر این شاخص‌ها، در این مطالعه، سپسیس سبب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز در بافت مغز گردید. همچنین پراکسیداسیون لیپیدها که با سنجش میزان مالون دی‌آلدهید در مغز سنجیده شد، به طور معنادار افزایش نشان داد. این تغییرات نشان‌دهنده بروز استرس اکسیداتیو در بافت مغز است. در گروه CM، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز افزایش و سطح مالون دی‌آلدهید مغزی کاهش یافت که نشان‌دهنده بهبود وضعیت اکسیداتیو می‌باشد. طی سپسیس افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی، افزایش فعالیت متالوپروتئازها، از بین رفتن اتصالات شکافدار و دژنراسیون سلول‌های اندوتلیال سبب افزایش ورود فاکتورهای التهابی و مدیاتورهای توکسیک به مغز و بروز آسیب‌های عروقی در مغز می‌شود. به‌علاوه سوپراکسیدها و هیدروپروکسیدها سبب بروز استرس اکسیداتیو شده و در نهایت سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و سنتز آدنوزین تری‌فسفات (Adenosine triphosphate, ATP) می‌گردند که به نوبه خود سبب تشدید سیکل آسیب عصبی می‌گردد.[۲۰] در این مطالعه آسیب بافتی ناشی از سپسیس، موجب کاهش آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گردید. کاهش سطح پلاسمایی سوپراکسید دیس‌موتاز پس از سپسیس ممکن است در نتیجه غیرفعال شدن این آنزیم توسط رادیکال‌های لیپید پراکسیل باشد. از سوی دیگر، سایتوکین‌های التهابی مانند فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین‌ها مانند اینترلوکین ۱ سبب مهار فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل سوپراکسید دیس‌موتاز می‌گردند.[۲۱] در این مطالعه، فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز با تجویز CM افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد که ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمال از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد، سبب ممانعت از آسیب بافتی و آزاد شدن اکسیدان‌ها به داخل خون می‌گردد. از CM در مدل‌های مختلف بیماری استفاده شده است و نتایج نشان داده که عملکرد آنها در مواردی مانند حفاظت از سیستم عصبی، سرکوب سیستم ایمنی بدن، ترمیم بافت و اثرات ضد التهابی مشابه عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی است.[۲۲] در این مطالعه از CM متعلق به حدود پانصد هزار سلول بنیادی مزانشیمی استفاده شد. اگرچه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گروه CM، به‌طور معنادار با گروه سپسیس اختلاف دارد اما هنوز هم با مقادیر این پارامترها در گروه شم اختلاف فاحشی دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که استفاده از ترشحات تعداد بیشتر سلول‌ها ممکن است سبب بهبود بیشتر در حال عمومی حیوانات و شاخص‌های اندازه‌گیری شده گردد و آنها را به مقادیر گروه شم نزدیک‌تر کند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای اثرات حفاظتی در آسیب اکسیداتیو مغزی ناشی از سپسیس در موش‌های صحرایی نر می‌باشد و به‌نظر می‌رسد که این عمل با کاهش سطح سایتوکین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو و همچنین تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن میسر است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی اثرات حفاظتی سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شوک سپتیک در موش‌های صحرایی نر" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۱۳۹۷ به کد ۳۸۹۲۸ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

References

1. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):775-87.
2. Laroye C, Gibot S, Reppel L, Bensoussan D. Concise Review: Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Treatment for Sepsis and Septic Shock? *Stem Cells* 2017;35(12):2331-9.
3. Nolt B, Tu F, Wang X, Ha T, Winter R, Williams DL, et al. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. *Shock* 2018;49(2):120-5.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

4. Salomao R, Ferreira BL, Salomao MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: evolving concepts and challenges. *Braz J Med Biol Res* 2019;52(4):e8595.
5. Li Z, Yang M, Peng Y, Gao M, Yang B. Rutaecarpine ameliorated sepsis-induced peritoneal resident macrophages apoptosis and inflammation responses. *Life Sci* 2019;228:11-20.
6. Mantzarlis K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:5985209.
7. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 2017;524:13-30.
8. Danielski LG, Giustina AD, Badawy M, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. *Mol Neurobiol* 2018;55(2):1045-53.
9. Keane C, Jerkic M, Laffey JG. Stem Cell-based Therapies for Sepsis. *Anesthesiology* 2017;127(6):1017-34.
10. Arana M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. *Methods Mol Biol* 2013;1036:47-61.
11. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 2014;15(3):4142-57.
12. Akhondzadeh F, Kadkhodaee M, Seifi B, Ashabi G, Kianian F, Abdolmohammadi K, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Conditioned Medium Attenuate the Memory Retrieval Impairment During Sepsis in Rats. *Mol Neurobiol* 2020;57(9):3633-45.
13. Abdolmohammadi K, Mahmoudi T, Nojehdehi S, Tayebi L, Hashemi SM, Noorbakhsh F, et al. Effect of Hypoxia Preconditioned Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Adv Pharm Bull* 2020;10(2):297-306.
14. Rahbarghazi R, Nassiri SM, Ahmadi SH, Mohammadi E, Rabbani S, Araghi A, et al. Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2014;173(3):453-66.
15. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005;24 Suppl 1:52-7.
16. Esterbauer H ,Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
17. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 2014;5:614.
18. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122(3):787-95.
19. Jiang Y, Gao H, Yuan H, Xu H, Tian M, Du G, et al. Amelioration of postoperative cognitive dysfunction in mice by mesenchymal stem cell-conditioned medium treatments is associated with reduced inflammation, oxidative stress and increased BDNF expression in brain tissues. *Neurosci Lett* 2019;709:134372.
20. Gu M, Mei XL, Zhao YN. Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. *Neurotox Res* 2021;39(2):489-503.
21. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(7):332-40.
22. Yousefi F, Ebtekar M, Soudi S, Soleimani M, Hashemi SM. In vivo immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett* 2016;172:94-105.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2021; Vol. 79, No. 8: 584-592 Original Article

Evaluation of the brain tissue oxidative stress status during sepsis after mesenchymal stem cell's conditioned medium administration in male rats

Farzaneh Kianian Ph.D.[1]
Mehri Kadkhodaee Ph.D.[1]
Behjat Seifi Ph.D.[1]
Fariba Akhondzadeh M.Sc.[1]
Kamal Abdolmohammadi Ph.D.[2]
Arash Abdi Ph.D.[1]
Mina Ranjbaran Ph.D.[1*]

1- Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Medical Sciences, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Ghods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-64053269
E-mail: m-ranjbaran@sina.tums.ac.ir

Abstract

Received: 28 Apr. 2021 Revised: 05 May 2021 Accepted: 15 Oct. 2021 Available online: 23 Oct. 2021

Background: In the present study, we hypothesized that conditioned medium (CM) derived from mesenchymal stem cells attenuates the brain oxidative stress in sepsis induced by the cecal ligation and puncture (CLP) model.

Methods: This study was performed in the Department of Physiology at Tehran University of Medical Sciences from August 2018 to April 2019. Conditioned medium was collected from mesenchymal stem cells isolated from rat's adipose tissues at the second culture passage. Male Wistar rats weighting (220-250 g) were randomly divided into three experimental groups (n=8 each): Sham, Sepsis and CM. Sepsis was induced by cecal ligation and puncture model in the Sepsis and CM groups. Animals in the CM group received the conditioned medium from 5×10^5 mesenchymal stem cells (2 h after sepsis induction, i. p., 3-5 mL). The systolic blood pressure and O2 saturation were measured 24 h after the treatment. The plasma and brain tissue samples were taken for inflammatory and oxidative stress assessment, respectively.

Results: Septic rats showed a significantly lower systolic blood pressure and O2 saturation level. They also had a significant increase in the plasma inflammatory indices (tumor necrosis factor-alpha [TNF-α], interleukin-6 [IL-6]) and brain malondialdehyde (MDA) content as well as a significant reduction in the brain superoxide dismutase (SOD) activity compared to the Sham group. The CM group had significantly higher systolic blood pressure and O2 saturation level compared to the septic rats. The animals in the CM group showed a significant attenuation in the plasma inflammatory indices (TNF-α and IL-6) and brain MDA content while having a significantly higher brain SOD activity compared to the Sepsis group.

Conclusion: Our findings showed that conditioned medium derived from mesenchymal stem cells has protective effects in preventing the inflammatory and oxidative stress status and may be suggested as a promising treatment in patients suffering from sepsis and septic shock.

Keywords: conditioned medium, inflammation, oxidative stress, sepsis.

Copyright © 2021 Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-16]