

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells isolated from the kidneys of newborn mice on the differentiation of human embryonic stem cells into kidney progenitor cells

Fatemeh Razeghi¹, Marjan Nouri², Fattah Sotoodehnejadnematalahi¹, Kazem Parivar¹, Ehsan Ehsani^{3*}

¹Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

³Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

Correspondence

Ehsan Ehsani

Email: ehsan.ehsani@iau.ac.ir

How to cite

Razeghi, F., Nouri, M., Sotoodehnejadnematalahi, F., Parivar, K., & Ehsani, E. (2023) Investigating the effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells isolated from the kidneys of newborn mice on the differentiation of human embryonic stem cells into kidney progenitor cells. *Experimental Animal Biology*, 12(45), 99-113.

ABSTRACT

Kidney diseases are an important medical problem worldwide. Since there are limited treatment options for damaged kidneys, stem cell therapy has become an alternative treatment. The aim of present study is to investigate effect of culture medium obtained from mesenchymal stem cells (MSCs-CM) of newborn mice kidneys in percentages of 10, 30 and 50 on differentiation of embryonic stem cells towards kidney epithelial cells. Mesenchymal stem cells were isolated from kidneys of newborn mice, passaged and propagated. Determination of the identity of cells was done using flow cytometry and checking the expression of surface markers CD105, CD29, CD90. In third passage of extracted cells, supernatant culture medium was collected, hESC were cultured and multiplied in the complete culture medium of cells and the differentiation of hES cells into progenitor cells was investigated. The expression of PAX2, ZO1 and CK18 genes was investigated using RT-PCR, expression of CD133, CD24 and CD44 surface markers was investigated using flow cytometry. Flow cytometry results confirmed the mesenchymal nature of the cells. The results of differentiation of hESCs showed that expression of PAX2, ZO1 and CK18 genes increased significantly ($p < 0.05$) in the groups containing supernatant. The results of flow cytometry show an increase in expression of CD133 and CD24 markers in groups containing CM and the expression of CD44 marker in the group containing 50% CM, compared to control group. In general, results showed supernatant culture process of cells has a positive effect on inducing differentiation of human embryonic stem cells into kidney progenitor cells.

KEYWORDS

Distinction, Mesenchymal stem cells, Supernatant culture medium, Kidney.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی اثر محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کلیه موش نوزاد بر روی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های پیش‌ساز کلیه

فاطمه رازقی^۱، مرجان نوری^۲، فتاح ستوده نژاد نعمت‌الهی^۱، کاظم پریور^۱، احسان احسانی^{۳*}

چکیده

بیماری‌های کلیه به عنوان یک مشکل مهم پزشکی، دارای گزینه‌های محدود برای درمان است، بکارگیری سلول‌های بنیادی به عنوان یک روش درمانی جایگزین روش‌های قدیمی مطرح است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs-CM) کلیه موش نوزاد در درصدهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سمت سلول‌های اپیتلیال کلیه است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از کلیه موش نوزاد جداسازی، پاساژ و تکثیر شد. تعیین هویت سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری و بررسی بیان مارکرهای سطحی CD105، CD29، CD90، انجام شد. در پاساژ سوم سلول‌های استخراج شده، محیط کشت رویی آن جمع‌آوری و hESC در محیط کشت کامل این سلول‌ها کشت و تکثیر شدند و تمایز سلول‌های hES به سلول‌های پیش‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی بیان ژن‌های PAX2، ZO1 و CK18 با استفاده از RT-PCR و بیان مارکرهای سطحی CD133، CD24 و CD44 با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج فلوسایتومتری ماهیت مزانشیمی بودن سلول‌ها را تایید کرد. نتایج تمایز hESCs نشان داد که بیان ژن‌های PAX2، ZO1 و CK18 در گروه‌های حاوی محیط کشت رویی به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) افزایش یافته‌است. نتایج فلوسایتومتری بیانگر افزایش بیان مارکرهای CD133 و CD24 در گروه‌های حاوی CM و بیان مارکر CD44 در گروه حاوی ۵۰ درصد CM، نسبت به گروه کنترل است. به طور کلی نتایج نشان داد که فرآیند محیط کشت رویی این سلول‌ها تاثیر مثبتی در القاء تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به سلول‌های پیش‌ساز کلیه دارد.

واژه‌های کلیدی

تمایز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، محیط کشت رویی، کلیه.

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
^۲گروه علوم صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.
^۳گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

نویسنده مسئول:

احسان احسانی

رایانامه: ehsan.ehsani@iau.ac.ir

استناد به این مقاله:

رازقی، فاطمه، نوری، مرجان، ستوده نژاد نعمت‌الهی، فتاح، پریور، کاظم و احسانی، احسان (۱۴۰۲). بررسی اثر محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کلیه موش نوزاد بر روی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های پیش‌ساز کلیه. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲(۴۵)، ۹۹-۱۱۳.

<https://eab.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

بیماری‌های مزمن کلیوی به عنوان یک مشکل مهم سلامتی در سراسر جهان شناخته شده‌است (Eckardt et al., 2013). هر ساله میلیون‌ها نفر از عوارض مربوط به آن زودهنگام جان خود را دست می‌دهند. بیماری مزمن کلیه به آسیب کلیه همراه یا کاهش کارکرد کلیه که بیش از سه ماه بصورت غیر قابل برگشت و پیش‌رونده باشد اطلاق می‌شود (Gansevoort et al., 2017). ناتوانی کلیه در مرحله نهایی یک علت عمده مرگ و میر است و در حال حاضر تنها گزینه درمانی در دسترس برای آن دیالیز و پیوند^۱ می‌باشد (Grassmann et al., 2005). با این حال دو روش دیالیز و پیوند با محدودیت‌ها و مشکلاتی همراه است که می‌توان به کاهش کیفیت زندگی بیمار به دلیل عوارض طولانی مدت دیالیز، کمبود اعضای اهدایی و همچنین رد پیوند اشاره نمود. با این حال معمولاً یک بازه زمانی چند ساله از زمان شروع بیماری خفیف یا متوسط کلیه تا رسیدن به مرحله نهایی بیماری وجود دارد، لذا این بازه زمانی فرصتی را فراهم می‌آورد تا بتوان برای جلوگیری از پیشرفت بیماری، روش‌های درمانی دیگری با رویکرد ترمیم و جایگزینی بافت کلیه آسیب دیده را طراحی نمود که از آن می‌توان به سلول درمانی اشاره کرد. استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان نارسایی کلیوی در جانوران مدل، نتایج امیدوارکننده‌ای به دنبال داشته است (Stenvinkel, 2010).

زیست‌شناسی سلول بنیادی و فن‌آوری‌های کشت سلولی، محققان را قادر به شناسایی سلول‌های مشتق‌شده از کلیه و انواع مختلفی از سلول‌ها که پتانسیل درمان بیماری‌های کلیوی را دارند، کرده است. امروزه پیوند سلولی به بیمار دارای نارسایی کلیوی برای بهبود عملکرد کلیه به عنوان یک روش درمانی تجویز می‌شود. از آنجا که این روش نسبت به روش‌های دیگر ساده‌تر و کمتر تهاجمی است، اغلب مطالعات انجام‌شده با استفاده از سلول درمانی صورت گرفته‌است (Li & Wingert, 2013). سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که دارای دو ویژگی مهم می‌باشند که آن‌ها را از سایر سلول‌ها متمایز می‌کنند. این سلول‌ها واجد توانایی^۱ - خودنوسازی^۲ نامحدود یعنی توانایی تقسیم و تولید سلول‌ها با خواص یکسان و^۳ - تمایز^۳ به انواع سلول‌ها با عملکرد اختصاصی از جمله سلول‌های خونی، قلبی،

عصبی و غضروفی و سلول‌های کبدی، تحت تحریکات فیزیولوژیک یا آزمایشگاهی می‌باشند (Costello & Franklin, 2013). سلول‌های بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. براساس پژوهش‌های انجام‌شده اگر سلولی واجد ظاهر دوکی شکل، توانایی چسبندگی به کف ظرف کشت و قابلیت تمایز به رده‌های سلولی مزودرمی باشد در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار می‌گیرند (Poursafavi et al., 2023).

محیط کشت رویی (CM)^۴ سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن متابولیت‌ها، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها تاثیر مثبتی در ترمیم بافت‌های آسیب دیده دارد. تاثیر محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بافت‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفته‌است. در یک مطالعه با مقایسه اثر درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و محیط کشت رویی آن در درمان استئوآرتریت مفصل زانوی خوکیه هندی، نشان دادند که محیط کشت رویی اثر درمانی مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد (Sadraie et al., 2015). همچنین در یک مطالعه، اثرات ضد‌رگ‌زایی و ضدالتهابی محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جفت انسان (hPDMSCs) را روی یک مدل موشی پره اکلامپسی بررسی شده‌است. داده‌های نشان داده که hPDMSCs-CM می‌تواند ویژگی‌های شبه پره اکلامپسی را در دوران بارداری معکوس کند، که نقش درمانی hPDMSCs را برای درمان پره اکلامپسی نشان می‌دهد (Nuzzo et al., 2022). در مطالعات گذشته، بهبود زخم دیابتی از طریق تعدیل رفتارهای فیبروبلاست محیط CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان (Saheli et al., 2020) و درمان پلی‌نوروپاتی و زخم پا در موش‌های دیابتی BKS db/db با استفاده از محیط CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان (De Gregorio et al., 2020) انجام شده‌است. اگرچه مطالعات متعددی در زمینه اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیماری‌های مختلف انجام شده‌است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه استفاده از این سلول‌ها و محیط CM آن‌ها که حاوی فاکتورهای رشد و همچنین اطلاعات ژنتیکی مربوط به این سلول‌ها می‌باشد، در درمان بیماری‌های کلیه صورت نگرفته‌است که اهمیت این موضوع و ضرورت بررسی آن را نشان می‌دهد. هدف از این پروژه، ایجاد روشی جهت تمایز سلول‌های بنیادی

1. Organ transplantation
2. Self renewal
3. Differentiation

هنگامی که تراکم سلول‌ها به میزان ۸۰ درصد رسید پاساژ سلولی صورت گرفت.

پاساژ سلولی

۱۰ml محلول شستشو PBS را درون فلاسک ریخته و پس از آغشته شدن تمامی سطح فلاسک با این محلول، توسط همان پی‌پت محلول خارج می‌گردد. سرم موجود در محیط کشت حاوی فاکتورهای مهار کننده تریپسین است. بنابراین لازم است بقایای محیط کشت با PBS شستشو داده شده و خارج شود. ۳ml محلول Trypsin- EDTA (1X) را اضافه کرده و فلاسک را به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور CO₂ انکوبه کردیم. (بعد از گذشت ۲ دقیقه، کمی به فلاسک ضربه زده و زیر میکروسکوپ معکوس چک شد). بعد از ۳ دقیقه فلاسک را از انکوباتور خارج کرده و با زدن چند ضربه آرام به کف و دیواره فلاسک، به کنده شدن سلول‌ها از کف فلاسک کمک کرده و سپس فلاسک را زیر میکروسکوپ Invert مشاهده می‌کنیم. سلول‌های تریپسینه شده و کنده شده از کف فلاسک، شناور شده و به حالت کروی و شفاف در می‌آیند. به منظور خنثی کردن Trypsin- EDTA (1X) ۳ برابر آنزیم (حدود ۹ ml) محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم به فلاسک اضافه می‌گردد. سلول‌ها را به آرامی چند بار در مخلوط تریپسین و محیط کشت پیپتاژ کرده. محتویات درون فلاسک به یک لوله فالکون ۱۵ ml استریل منتقل می‌شود. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰g در شرایط RT (دمای ۲۲ °C) درجه سانتی گراد) سانتریفوژ شده تا سلول‌ها در ته لوله ته‌نشین شوند. لوله فالکون به زیر هود منتقل کرده و سپس مایع رویی را به کمک پی‌پت اوت می‌کنیم. به رسوب سلولی ۳ ml محیط کشت مزانشیم اضافه کرده، با چند بار پیپتاژ کردن سلول‌ها در محیط کشت اضافه شده به لوله فالکون، سوسپانسیون هموژنی تهیه می‌شود. به دو فلاسک ۷۵ cm²، هر کدام ۱۵ ml محیط کشت مزانشیم اضافه می‌کنیم. به هر فلاسک حدود ۱۷۰۰ μl (میکرولیتر) سوسپانسیون سلولی اضافه کرده. بر روی هر فلاسک مورد نظر مشخصات رده سلولی، تعداد پاساژ، تاریخ کشت و نام فرد آزمایش کننده نوشته شده. فلاسک‌ها به منظور بررسی یکنواخت پخش شدن سلول‌ها در فلاسک، با میکروسکوپ معکوس مشاهده، و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای CO₂ ۵ درصد و ۹۵ درصد رطوبت منتقل شدند. با رسیدن سلول‌ها به تراکم ۹۰ درصد، می‌توان محیط کشت CM را تهیه کرد. پس از انجام کشت سوم، از این پاساژ برای تهیه محیط CM استفاده می‌شود.

جنینی انسانی به سمت سلول‌های کلیه می‌باشد. در این روش از اثر محیط CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کلیه موش نوزاد بر روی hESC استفاده شد. به این منظور سلول‌های بنیادی مزانشیمی از کلیه موش نوزاد جداسازی و تکثیر گردید و محیط کشت CM جمع‌آوری شد بعد از ۷ روز سلول‌های تیمار شده با محیط CM، با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و Real Time PCR تعیین ویژگی شدند. در انتهای هر قسمت آزمایش‌های آنالیزی جهت تایید هر مرحله انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت کلیه موش نوزاد ۴ روزه

به طور خلاصه، ابتدا پس از بیهوش کردن موش‌های نوزاد (۳-۴ روزه) نژاد NMRI و باز کردن سطح شکمی، کلیه‌ها را خارج کرده و بافت مورد نظر چندین مرتبه با محلول شستشو سرم جنین گاوی (PBS) به منظور حذف اولیه سلول‌های خونی شستشو داده شد. نمونه به قطعات حدود یک میلیمتری قطعه قطعه شد و چندبار با PBS شستشو شدند. برای هضم آنزیمی، در ابتدا محلول کلاژناز تیپ ۱ به غلظت ۰/۱ درصد در محیط α Mem تهیه کرده و به نسبت ۱:۱ نمونه بافت کلیه حاصل از مراحل قبل و محلول کلاژناز تیپ ۱ با غلظت ۰/۱ درصد را در لوله فالکون ۵۰ ریخته و درب آن را بسته و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. نمونه به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور انکوبه گردید. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، برای خنثی کردن فعالیت آنزیم کلاژناز نمونه را به محیط کشت α Mem همراه با ۱۵ درصد FBS اضافه کردیم. سپس نمونه بدست آمده را در ۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل از نمونه به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدست آمد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به رسوب سلولی حاصل از نمونه، محیط کشت مزانشیم (Mem α همراه با ۱۵ درصد FBS، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ استرپتومایسین) اضافه کرده و ضربه زده تا سلول‌ها به صورت منفرد جداسازی شوند. سلول‌ها را با غلظت یک میلیون سلول در هر میلی‌لیتر به فلاسک کشت T 75CM2 انتقال داده و آن را در شرایط نرمال کشت سلول درون انکوباتور قرار می‌دهیم. بعد از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت فلاسک تعویض گردید و

یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل کرده تا به تدریج در یخچال ذوب شود (ماتریژل در دمای اتاق به ژل تبدیل می‌شود و در آن حالت دیگر قابل استفاده نمی‌باشد). سپس با محیط کشت DMEM/F12 رقیق کرده و به میزان مورد استفاده در ویال‌ها تقسیم بندی (Aliquot) شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در زمان استفاده، ویال‌ها را در ۴ درجه سانتی‌گراد ذوب کرده، سپس ماتریژل در هر یک از چاهک‌ها کوت شده و برای مدت ۲ الی ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده می‌شوند. بعد از این مدت ماتریژل را کشیده و به جای آن محیط کشت hESC اضافه شد.

کشت و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی انسانی

سلول‌های بنیادی جنینی انسانی رده H5 روی بستر ماتریژل و پاساژ ۲۵ از پژوهشگاه رویان خریداری شد. سلول‌های مزبور روی پلیت‌های بدون لایه تغذیه کننده، پوشیده‌شده با ماتریژل و در محیط کشت hESC کشت داده شد. برای شمارش سلول ابتدا سوسپانسیون سلولی را در حجم ۱ ml تهیه کرده و ۵۰ μl از سوسپانسیون را با ۵۰ μl تریپان بلو ۰/۴ درصد را داخل میکروتیوپ ریخته و پیتاژ شد. لامل را روی لام قرار داده و ۱۰ μl از مخلوط را به آرامی از لبه ی لامل روی لام نئوبار قرار داده و به زیر میکروسکوپ منتقل شد. تعداد سلول‌های زنده در هر چهار سری خانه‌های ۱۶ تایی را ابتدا با بزرگنمایی ۴X پیدا کرده و با بزرگنمایی ۱۰X شمارش می‌گردد و میانگین گرفته می‌شود. تعداد کل سلول‌ها در ۱ ml از سوسپانسیون سلولی عبارتند از: تعداد سلول‌های شمارش شده در محدوده استاندارد لام نئوبار × ضریب رقت (۲) × ۱۰۴ (ضریب حجم).

تاثیر محیط MC حاصل از MSC بر تمایز hESC

به منظور بررسی تاثیر محیط MC سلول‌های بنیادی مزانشیمی کلیه بر تمایز hESC به سمت سلول‌های پیش‌ساز کلیه به روش زیر انجام شد:

سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در ظرف کشت شش‌خانه‌ای روی ماتریژل به صورت چسبنده کشت شدند و در روز هفت، برای تمایز استفاده شدند. بدین‌صورت که ابتدا محیط رویی hESC کشیده شد و سلول‌ها به مدت هفت روز در معرض محیط‌های تمایزی حاوی ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد CM قرار گرفتند. (از هر کدام از محیط‌های تمایزی به مقدار ml

فلاسک حاوی سلول را همراه با محیط کشت α Mem حاوی ۵ درصد FBS را به مدت ۱۲ ساعت (Overnight) انکوبه کرده و بعد از آن محیط رویی را جمع‌آوری می‌کنیم ولی قبل از آن، سلول‌ها را آغشته به میتومایسین کرده تا از نظر تقسیم میتوزی غیرفعال شوند و تنها بتوانند فعالیت متابولیکی داشته باشند و از سلول‌های بنیادی جنینی حمایت نمایند ولی تکثیر نشوند.

بررسی مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی به روش فلوسایتومتری

برای بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تایید آنها بوسیله فلوسایتومتری از سلول‌های کشت داده شده در پاساژ سوم استفاده می‌شود. برای انجام این کار پس از سومین پاساژ سلولی، محیط رویی سلول‌ها تخلیه شده. سلول‌ها دوبار با PBS شستشو می‌شوند. برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک، به هر فلاسک ۷۵ cm²، ۵ ml تریپسین اضافه کرده و سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. محلول تریپسین را با اضافه کردن ۱۵ ml محیط αMEM خنثی کرده. انتقال سلول‌ها به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتر و سانتریفیوژ سلول‌ها با دور ۳۰۰ g به مدت ۵ دقیقه خارج کردن محیط رویی سلول‌ها. میزان ۱۰۰ μl سلول در لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری قرار گرفتند. غلظت مناسبی از آنتی‌بادی‌های CD90، CD105، Isotype control، CD34 و CD45، CD29 شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام گردید. دوباره سلول‌ها با PBS شستشو داده شده و سانتریفیوژ شدند. در مرحله ی آخر، رسوب سلولی با ۲۰۰ μl بافر FACS سوسپانسیون شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری BD^۱ مورد بررسی قرار گرفتند بررسی و تفسیر نتایج فلوسایتومتری با استفاده از نرم افزار FlowJo انجام پذیرفت.

آماده‌سازی پلیت‌ها با ماتریژل

در این مطالعه از روش کشت، نگهداری و انجماد در شرایط عاری از سلول‌های تغذیه کننده و در حضور محیط کشت حاوی KO-SR^۲ و بر بستر ماتریژل استفاده شده است. ماتریژل با نسبت ۱:۶۰ تهیه شد. برای این کار ظرف اصلی ماتریژل را که در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود به مدت ۲ الی ۳ ساعت به

1. Becton Dickinson

2. Knockout serum Replacement

روش‌های تعیین کمی بیان ژن با Real Time PCR

برای مقایسه الگو و میزان بیان ژن‌های مربوط در هر مرحله از آزمایش از روش Real Time RT-PCR استفاده شد. بدین منظور cDNA بدست آمده به عنوان الگو در انجام Real Time RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی وارد دستگاه شدند. در این پژوهش از دستگاه Qiagene 6000 Rotor استفاده شد. در این مطالعه از کیت AMPLIQON با استفاده از رنگ SYBR Green (به منظور ردیابی قطعات cDNA محصول واکنش PCR) استفاده شد. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش این نمونه‌ها در دستگاه Rotor Gene Qiagene 6000 قرار داده شدند. پس از انجام واکنش، داده‌های Take off و Amplification نمونه‌ها از آنالیز دستگاه Real Time PCR استخراج شد و توسط نرم افزار REST^۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی (ژن مرجع) برای یکسان‌سازی سطح mRNA استفاده شد.

آنالیزهای آماری

همه آزمایش‌ها برای هر نمونه با سه بار تکرار انجام گرفت (n=3). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار (sd) $\pm$ mean گزارش گردید و در نهایت آنالیز داده‌ها با نرم افزار PRISM (ویراست ۵) صورت گرفت و به منظور مقایسه بین گروه‌های آزمایشی تست آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) مورد استفاده قرار گرفت و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ ($P \text{ value} < 0.05$) به عنوان داده‌های معنی‌دار گزارش گردید. بررسی و تفسیر نتایج فلوسایتومتری با استفاده از نرم افزار FlowJo (ویراست ۷٫۶) انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

همانطور که قبلاً توضیح داده شد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کلیه موش ۴ روزه کشت داده‌شد. مورفولوژی MSC در شکل ۱ آمده است. سپس با استفاده از Mitomycin C (غلظت نهایی $10 \mu\text{g/ml}$) غیرفعال شدند و محیط CM آن تهیه شد. همه سلول‌ها ویژگی‌های معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان دادند به گونه‌ای که سلول‌ها دارای ظاهر دوکی شکل و توانایی چسبندگی به کف فلاسک را داشتند.

۱/۵ به چاهک‌ها اضافه شد). محیط تمایزی هر ۲ روز یکبار تعویض شده و محیط کشت گروه کنترل (hESC) هم هر روز تعویض گردید.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها

از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus) در طول مدت کشت به منظور بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های در حال تمایز استفاده گردید.

استخراج RNA و بررسی بیان ژن به روش Real Time RT-PCR

به منظور مقایسه الگو و میزان بیان ژن‌های کلیوی از روش Real Time RT-PCR استفاده گردید. برای بررسی کمی بیان ژن‌ها باید mRNA هر یک از ژن‌ها را بررسی نمود و چون mRNA ترکیبی ناپایدار است، می‌بایست آنرا به DNA مکمل یا cDNA تبدیل نمود و همچنین در هنگام استخراج با دقت عمل شود و سعی شود در تمام مراحل استخراج از وسایل RNase DNase free استفاده شود. به طور خلاصه، برای بررسی میزان بیان ژن در هر نمونه سلولی Total RNA به روش دستی با استفاده از محلول Ribo-Ex استخراج شد، سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت شرکت AMPLIQON رشته DNA مکمل ساخته شده و در نهایت cDNA های ساخته شده به عنوان الگو در انجام Real Time RT-PCR استفاده گردید.

سنتز cDNA

در این تحقیق جهت سنتز cDNA از کیت AMPLIQON استفاده و مطابق دستورالعمل این کیت عمل شد. پس از اضافه کردن RNA و رساندن حجم نهایی به $20 \mu\text{l}$ ، مخلوط حاصل برای سنتز cDNA وارد چرخه دما-زمان در دستگاه ترموسایکلر می‌شود.

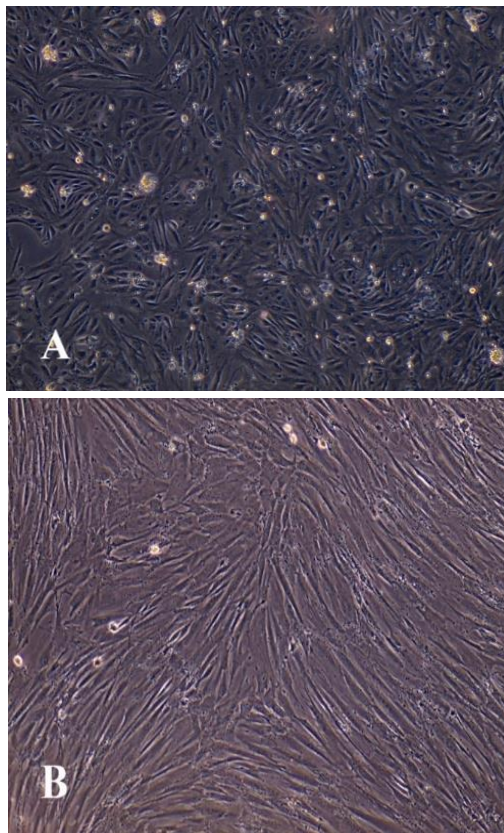
الکتروفورز ژل آگارز

پس از اتمام PCR، به منظور بررسی میزان موفقیت واکنش و یا بررسی محصول PCR، یکی از انواع روش‌هایی انتخاب می‌گردد که برای بررسی محصول PCR موجود می‌باشد. متداول‌ترین روش، الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز است.

نتایج فلوسایتومتری برای ارزیابی بیان مارکرهای

CD44 و CD133، CD24

جهت شناسایی سلول‌های پیش‌ساز کلیه از مارکرهای سطحی CD24 و CD133 استفاده شد. بیان این مارکرها با استفاده از فلوسایتومتری در روز ۷ تمایز در سه گروه با غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد از محیط کشت رویی و در گروه کنترل (hESC) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این ارزیابی برای بیان دو مارکر CD24 و CD133 نشان می‌دهد که در هر سه گروه، نسبت به گروه کنترل افزایش بیان داشته و در گروه ۱۰٪ محیط کشت رویی، بیان بالاتری نسبت به دو گروه دیگر مشاهده شد که این به معنی تمایز بهتر در این گروه می‌باشد. نتایج فلوسایتومتری در اشکال ۴ و ۵ نشان داده شده است. CD44 در گروه ۵۰٪ بیشترین بیان را داشته و از آن‌جاکه این مارکر در شرایط نرمال کلیه و در سلول‌های اپیتلیالی بیان می‌شود نشان‌دهنده تمایز hESC به سلول‌های اپیتلیال کلیه می‌باشد. نتایج فلوسایتومتری برای بیان این مارکر در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی از مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کلیه موش نوزاد (A)، پاساژ ۲ (B)؛ پاساژ ۳ با بزرگنمایی ۴۰X

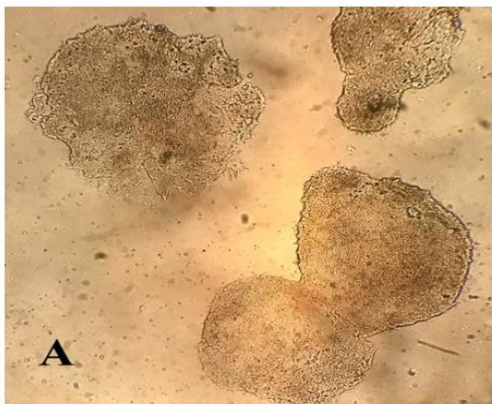
نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی

به منظور جداکردن قسمت‌های تمایز نیافته از قسمت‌های تمایز یافته، کلیه‌های hESC که ۶ روز از کشت آن گذشته بود پاساژ داده شدند. جهت پاساژ سلول‌ها از روش آنزیمی استفاده شد، سپس سلول‌ها بر روی ماتریژل کشت داده شدند. شکل ۲، مورفولوژی hESC (در روز ششم)، قبل و بعد از تیمار با آنزیم کلاژناز IV را نشان می‌دهد.

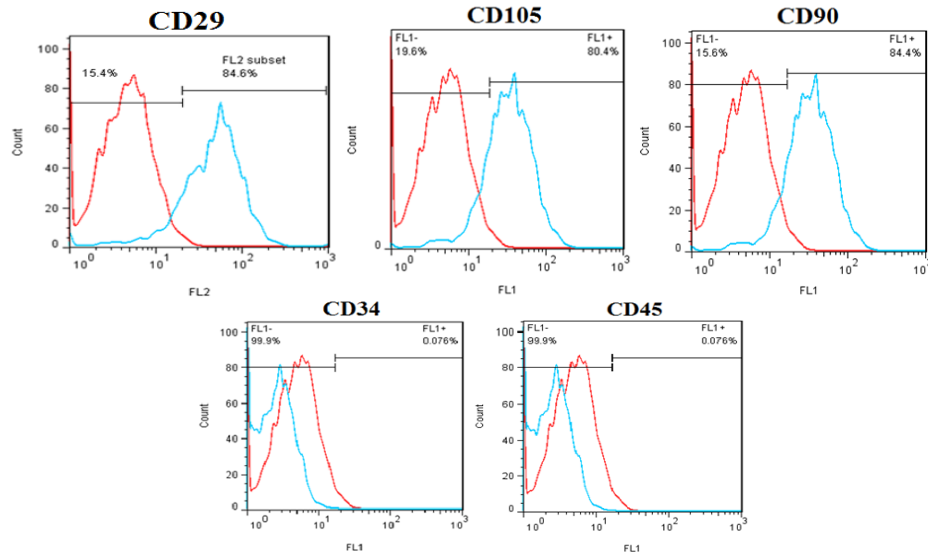
نتایج فلوسایتومتری برای تأیید سلول‌های بنیادی

مزانشیمی

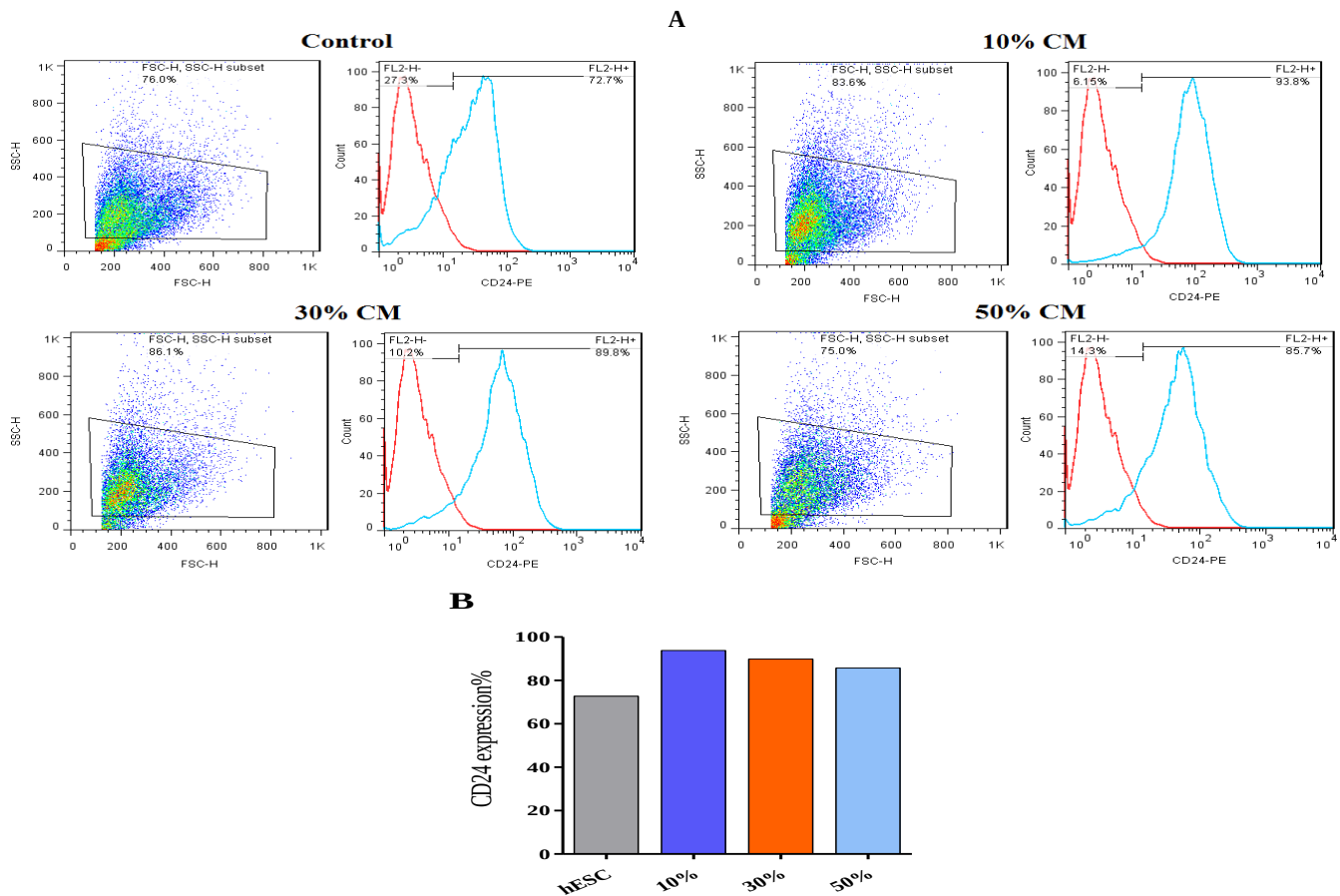
به منظور تأیید هویت این سلول‌ها، نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها نسبت به مارکرهای سلولی CD105، CD90 و CD29 (مارکرهای شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمی) مثبت می‌باشند، در حالی که نسبت به مارکرهای CD34 و CD45 (مارکرهای شاخص سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک) منفی بودند. نتایج آن در شکل ۳ آمده است.



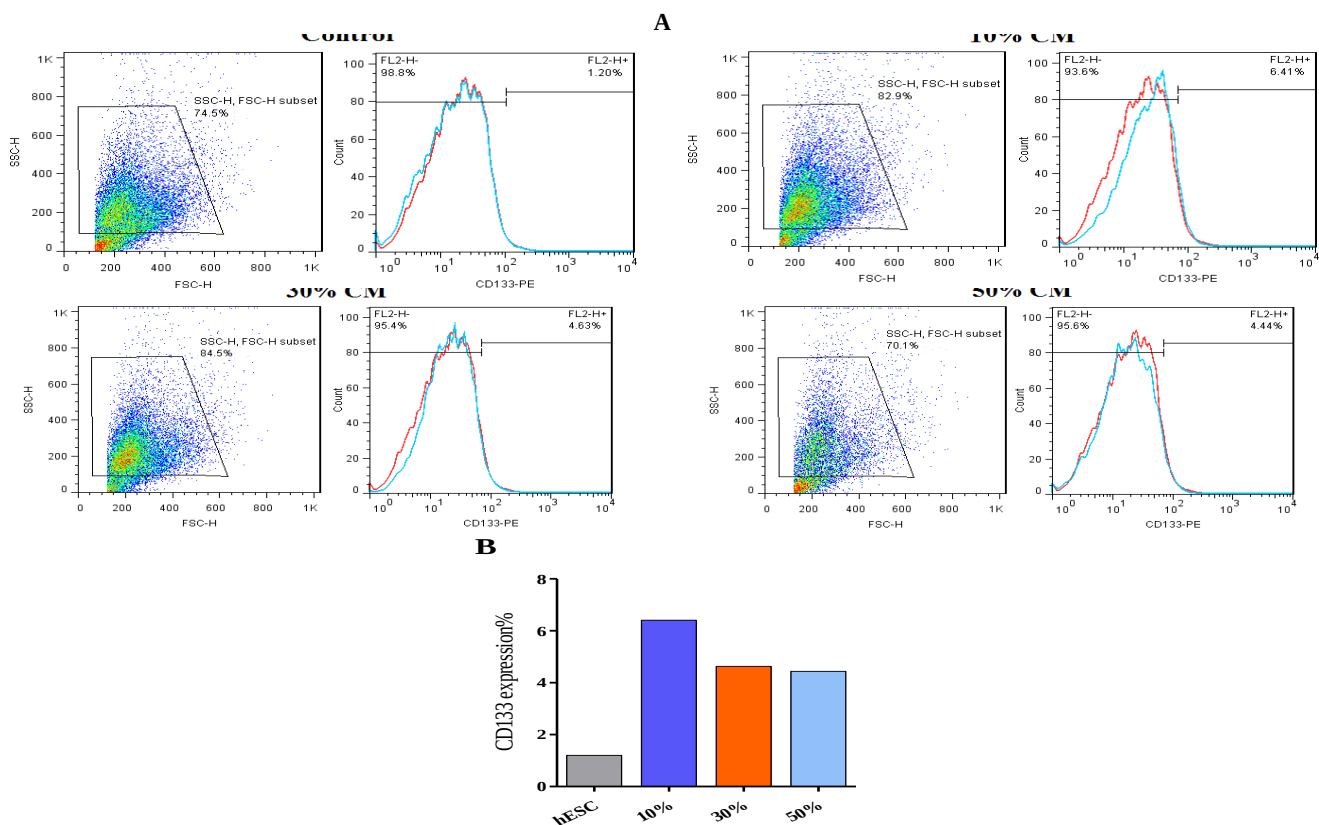
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپی از کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی انسانی کشت‌شده در شرایط عاری از سلول‌های تغذیه کننده (روی ماتریژل) قبل از تیمار با آنزیم کلاژناز IV نوع (A)، بعد از تیمار با آنزیم کلاژناز نوع IV (B).



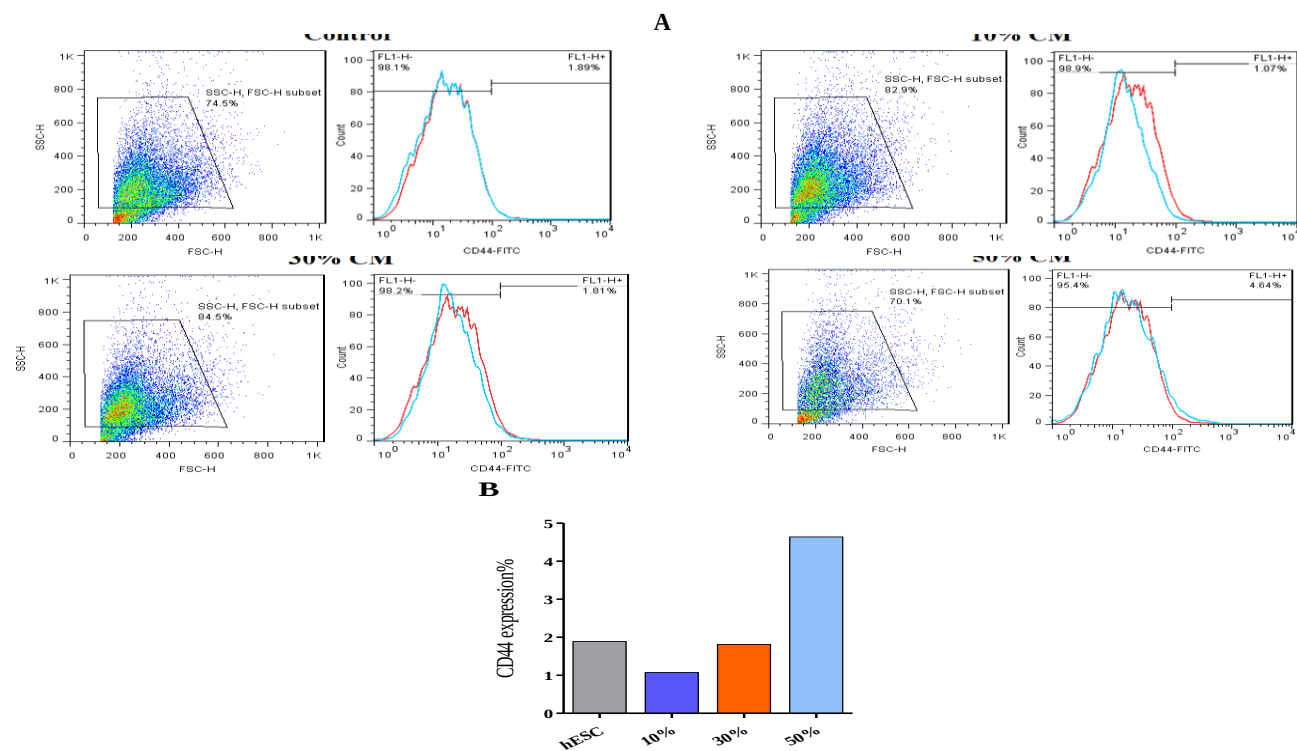
شکل ۳. نتایج فلوسایتومتری بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ ۳ به صورت نمودار هیستوگرام حاکی از بیان مارک‌های سطحی مزانشیمی CD105، CD90 و CD29 و عدم بیان مارک‌های سلول‌های خونساز CD45 و CD34 در سطح این سلول‌ها بود. خط آبی نشان‌دهنده بیان مارک‌های CD105، CD90 و CD29. خط قرمز نشان‌دهنده کنترل unstain.



شکل ۴. A) آنالیز فلوسایتومتری برای مارکر CD24 در سلول‌های hES تیمار شده با محیط کشت رویی MSC (در غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) و hESC تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در روز ۷ تمایز. سمت راست نمودار هیستوگرام، خط آبی نشان‌دهنده بیان مارکر سطحی CD24 و خط قرمز نشان‌دهنده کنترل unstain. سمت چپ نمودار dot plot، جمعیت سلولی بر اساس Forward scatter و Side scatter gate شده است. B) مقایسه میزان بیان مارکر CD24 در گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل.



شکل ۵. A) آنالیز فلوسایتومتری برای مارکر CD133 در سلول‌های hES تیمار شده با محیط کشت رویی MSC (در غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) و hESC تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در روز ۷ تمایز. سمت راست نمودار هیستوگرام، خط آبی نشان‌دهنده بیان مارکر سطحی CD133 و خط قرمز نشان‌دهنده کنترل unstain. سمت چپ نمودار dot plot جمعیت سلولی بر اساس Forward scatter و Side scatter gate شده است. B) مقایسه میزان بیان مارکر CD133 در گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل.



شکل ۶. A) آنالیز فلوسایتومتری برای مارکر CD44 در سلول‌های hES تیمار شده با محیط کشت رویی MSC (در غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) و hESC تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در روز ۷ تمایز. سمت راست نمودار هیستوگرام، خط آبی نشان‌دهنده بیان مارکر سطحی CD44 و خط قرمز نشان‌دهنده کنترل unstain. سمت چپ نمودار dot plot جمعیت سلولی بر اساس Forward scatter و Side scatter gate شده است. B) مقایسه میزان بیان مارکر CD44 در گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل.

ارزیابی کیفیت cDNA سنتز شده

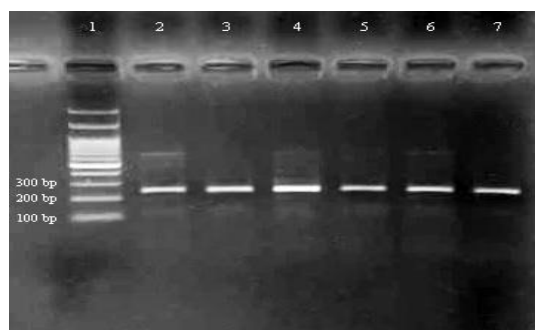
به منظور تایید کیفیت cDNA ساخته شده، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH، واکنش PCR انجام شد و نتایج بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (شکل ۷).

نتایج ارزیابی بیان مارکرهای پیش‌ساز و اپیتلیالی کلیوی

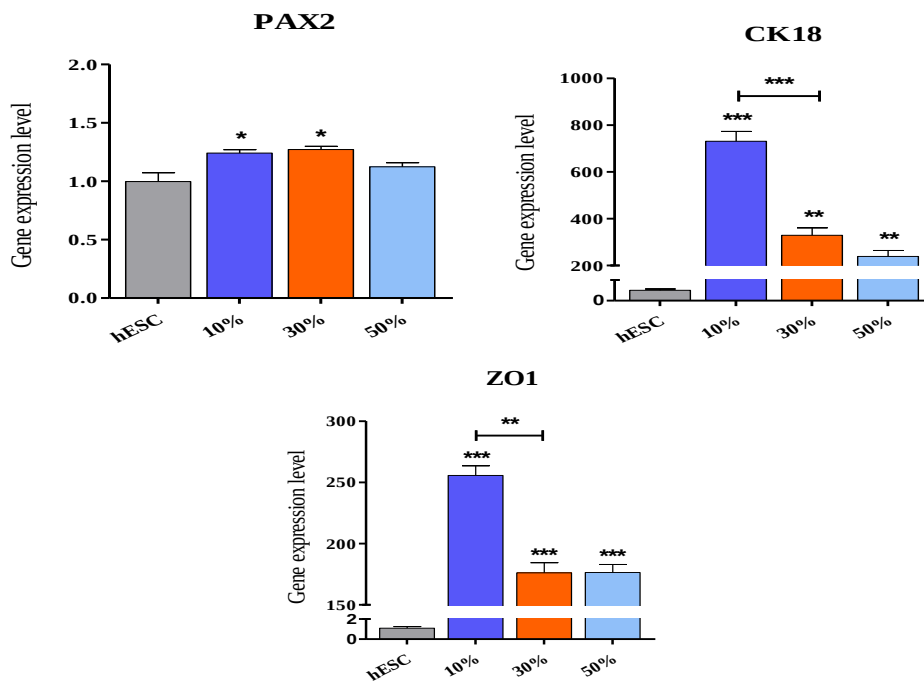
Real time RT-PCR با ZO1 و CK18، PAX2

به منظور بررسی کمی بیان ژن PAX2 (مارکر اختصاصی سلول پیش‌ساز کلیوی) و همچنین بیان ژن‌های CK18 و ZO1

(مارکرهای سلول‌های اپیتلیالی کلیه) پس از اثر محیط کشت رویی حاصل از MSC کلیه موش نوزاد در سه غلظت (۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) بر سلول‌های hES، از روش Real time RT-PCR استفاده شد. طبق نتایج حاصله که در شکل ۸ نشان داده شده‌است، در هر سه گروه بیان معنی‌دار ($P < 0.05$ - $P < 0.001$) شده‌است، در هر سه گروه بیان معنی‌دار ($P < 0.01$) ژن‌های PAX2، CK18 و ZO1 را نسبت به سلول‌های hES به عنوان کنترل نشان می‌دهد. نتایج این ارزیابی تایید کننده تمایز سلول‌های hES به سلول‌های کلیوی با استفاده از محیط کشت رویی MSC است.



شکل ۷. ژل الکتروفورز برای تایید کیفیت cDNA ساخته شده. باندهای حاصل از بارگذاری محصولات RT-PCR روی ژل آگارز ۱٪. چاهک شماره ۱ حاوی Ladder 100bp می‌باشد، چاهک‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ محصولات RT-PCR سنتز شده توسط پرایمر کنترل همراه کیت برای ژن GAPDH است و چاهک شماره ۷ کنترل منفی می‌باشد.



شکل ۸. نمودار آنالیز آماری داده‌های Real time RT-PCR برای بررسی بیان ژن‌های PAX2، CK18 و ZO1 در شرایط کشت دوبعدی در روز ۷ تمایز. علامت* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین سلول‌های hES تیمار شده با محیط کشت رویی MSC (در سه غلظت ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) و سلول‌های hES (کنترل) می‌باشد ($***P < 0.001$ - $**P < 0.01$ - $*P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

پیشرفت‌های اخیر در پزشکی بازساختی، امید را برای درمان‌های نوین نظیر سلول درمانی و مهندسی زیستی کلیه را به ارمان آورده‌است. این درمان‌های نوین نیاز به سلول‌های پیش ساز کلیه دارند، همچنین با توجه به ویژگی‌های سلول بنیادی جنینی، این سلول‌ها به عنوان یک منبع سلولی نامحدود برای سلول‌های کلیه در پزشکی بازساختی و مدل‌سازی بیماری در آزمایشگاه هستند. در حال حاضر، تمایز مستقیم سلول بنیادی جنینی انسانی نسبت به تمایز مستقیم انواع سلول‌های دیگر کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال مطالعات بسیاری برای تمایز مستقیم سلول بنیادی جنینی به سمت اجداد کلیوی گزارش شده‌است (Mae et al., 2010). برخی از این مطالعات بر تمایز خودبخودیمتکی بوده‌است، که هم منحصر از طریق تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) (Kramer et al., 2006) و هم با هم‌کشتی با سلول‌های کلیوی (Steenhard et al., 2005) بوده است. مطالعاتی اثر محیط کشت رویی حاصل از جوانه میزنای (UB) (Ren et al., 2010) با مولکول‌های کوچک (Mae et al., 2010) را بر روی تمایز سلول بنیادی گزارش کرده‌اند. در اغلب این مطالعات، تشکیل EB به عنوان اولین مرحله از روند تمایزشان، انجام گرفته‌است. با این حال تشکیل EB نه تنها کارایی کمتری نسبت به کشت تک لایه در تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی جنینی دارد، بلکه مشکلات بیشتری را در طول خالص‌سازی از سلول‌های مورد نظر دارد (Nishikawa et al., 2007).

در این مطالعه به منظور القاء تمایز، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در معرض محیط CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از کلیه موش نوزاد به مدت ۷ روز قرار گرفتند. سلول‌های hESC به سلول‌های کلیوی تمایز یافتند به طوری که ژن‌های سلول‌های پیش‌ساز و اختصاصی سلول‌های کلیوی بیان شدند. در بررسی‌های تمایزی انجام‌شده، تمایز سلول‌ها به صورت خودبخودی و بدون دخالت هیچ فاکتور القایی دیگر بوده است که تفاوت این تحقیق را با مطالعات دیگر نشان می‌دهد. تصفیه گلوبول‌های برای حذف ضایعات از خون، یکی از عملکردهای اصلی کلیه است و پودوسیت‌های درون گلوبول نقش مهمی در فرایند تصفیه دارند (Mae et al., 2010). با این حال بخاطر این‌که پودوسیت‌ها توانایی محدودی برای تکثیر سلولی در کلیه آسیب دیده دارند، استفاده از سلول بنیادی یا پیش‌ساز می‌تواند پودوسیت‌ها را تبدیل به یک روش جایگزین برای بهبود تصفیه کلی نرمال کند. بازسازی کل نفرون در کلیه بالغ انسان ممکن

نیست، ترمیم نیاز به سلول‌هایی با مشخصات پیش‌سازی دارد. این سلول‌های پیش‌ساز برای جایگزینی مداوم سلول‌هایی که در طول مراحل فیزیولوژیکی از دست می‌روند مورد نیاز هستند (۶۰۰۰ سلول از قطعات مختلف نفرون هر ساعت از بین می‌روند و از طریق ادرار دفع می‌شوند) (Pavenstädt, 2000). سلول‌های پیش‌ساز کلیوی واقع در قطب ادراری می‌توانند به گلوبول و سلول‌های اپیتلیال توبولار تمایز یابند. سلول‌های پیش‌ساز گلوبول واقع در کپسول بومن می‌توانند به سمت پودوسیت تمایز یابند (Sagrinati et al., 2006).

سلول‌های پیش‌ساز، مقاومت بالایی در برابر آسیب در مقایسه با دیگر سلول‌های تمایز یافته در کلیه دارند، بنابراین این سلول‌ها می‌توانند منبعی برای درمان نارسایی کلیوی باشد. سلول‌های پیش‌ساز کلیوی بالغ که از قسمت‌های مختلف نفرون جدا شده به نظر می‌رسد دارای اثر درمانی در مدل‌های حیوانی با آسیب حاد کلیوی هستند (Nishikawa et al., 2007). وجود مارکرهای اختصاصی سطحی برای تسهیل شناسایی سلول‌های پیش‌ساز ضروری است. هر سلول ترکیب معینی از گیرنده‌های سطحی را دارا است و این ویژگی، آن را از انواع دیگر سلول‌ها قابل تشخیص و تمایز می‌کند. برای شناسایی سلول‌های پیش‌ساز پرتوان، حضور دو مارکر سطحی CD24، یک مولکول سطحی که برای شناسایی انواع مختلف سلول بنیادی انسانی استفاده می‌شود (Shackleton et al., 2006) و همچنین توسط مزانشیم متانفریک القا نشده در طول تکوین کلیه بیان می‌شود (Kubota et al., 2003) و CD133، مارکر بافت بزرگسال مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. نتایج نشان داده که هر دو مارکر CD24 و CD133 توسط سلول‌های اپیتلیالی جداری در کپسول بومن بیان همزمان داشتند (Sagrinati et al., 2006). همچنین سلول‌های پیش‌ساز کلیوی CD24+ و CD133+ فاکتورهای رونویسی اختصاصی سلول بنیادی مثل OCT4 را بیان می‌کنند و دارای خاصیت خودنوزایی، کلون‌زایی ۱ و همچنین پتانسیل تمایز به انواع سلول‌های کلیوی را نشان می‌دهند. مطالعات همچنین نشان می‌دهد سلول‌هایی که CD24 و CD133 را همزمان بیان نمی‌کنند، بیان CD24 در آن‌ها ادامه می‌یابد، این نشان می‌دهد که CD133 زیر مجموعه‌ای از سلول‌های اپیتلیال کلیوی هستند که CD24 را بیان می‌کند و در آخر به سلول‌های اپیتلیال جداری کپسول بومن محدود می‌شود (Platt et al., 1983). روی هم رفته هنگامی که سلول‌های CD24 به طور همزمان با CD133

مختلف و سایتوکاین را ترشح می‌کنند که می‌تواند به محیط CM، تحت شرایط خاص فیزیولوژیکی اضافه شود. اثرات پاراکرائینی فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های ترشح شده از MSCs می‌تواند باعث تحریک بازسازی بافت شده و یا اثرات ضدآپتوتیکی داشته باشد. تمایز ممکن است هم توسط تماس مستقیم سلول-سلول و هم به طور شیمیایی از طریق فاکتورهای ترشح شده مثل سایتوکاین‌ها، اینترلوکین‌ها و فاکتورهای رشد شروع شود. چندین مطالعه شواهدی را فراهم آورده که سلول‌های بنیادی، هم به کلیه آسیب‌دیده مهاجرت کرده و به سیستم توبولار ادغام می‌شود و هم به بازسازی از طریق اثرات اندوکرائینی کمک می‌کند (Poulsom et al., 2001). لذا در این مطالعه اثر محیط CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش نوزاد را بر روی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی مورد مطالعه قرار دادیم.

CM حاصل از سلول‌های کلیه جنینی را به عنوان یک مکمل برای تیمار فاکتور رشد در مطالعات گذشته بررسی شده است، با این دلیل که این محیط می‌تواند حاوی فاکتورهای ضروری برای القاء صحیح تمایز کلیه باشد. آن‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی جنینی موش در غیاب LIF اجسام شبه جنینی را ایجاد کرده و با اضافه کردن رتینوئیک اسید (RA) و آکتیوین، مارکرهای مزودرم حدواسط (PAX2 و Brochuryr) بیان شده، سپس با محیط CM تهیه شده از کشت سلول‌های جوانه میزنا (UB) کلیه جنین ۱۳ روزه موش به مدت ۱۰ روز تیمار شدند. بعد از ۱۰ روز، مارکرهای PAX2، WT1، E-cadherin، و POD-1 بیان شدند (Ren et al., 2010).

در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های PAX2 (مارکر پیش‌ساز کلیوی) و ZO1 و CK18 (مارکرهای اختصاصی سلول‌های اپیتلیال کلیه) با استفاده از روش Real time RT-PCR بررسی شد. نتایج، بیان محدودتری از PAX2 را نشان می‌دهد در صورتی که مارکرهای اپیتلیالی کلیوی ZO1 و CK18 را به میزان بالا بیان می‌کنند. PAX2 یکی از ژن‌های اساسی سلول‌های پیش‌ساز کلیوی است. این ژن در مراحل مختلف تکوین کلیه بیان می‌شود اما در طی بلوغ، بیان آن کاهش می‌یابد. به طور کلی PAX2 فاکتور رونویسی است که در جوانه میزنا و در مزانشیم متانفریک القا شده توسط جوانه میزنا، بیان می‌شود و در سلول‌های بالغ اپیتلیال توبولار به سرعت کاهش می‌یابد، که این موضوع با داده‌های Real Time RT-PCR ما مطابقت دارد (Bussolati et al., 2005). در بین سلول‌های اپیتلیالی، اتصالات محکم به عنوان ساختاری ساکن است که یک سدی

بیان می‌شوند، یک جمعیت سلول بنیادی پیش‌ساز کلیوی را که قادر به بازسازی توبولار در کلیه بالغ هستند را نشان می‌دهد. در یک مطالعه، یک زیر مجموعه از سلول‌های اپیتلیال جداری در کپسول بومن را گزارش دادند، این زیر مجموعه بیان همزمان دو مارکر CD24، CD133 و فاکتور اختصاصی سلول بنیادی (OCT4) را نشان دادند. این سلول‌ها دارای پتانسیل خودنوزایی و کلونوژنیک بوده و نیز تحت شرایط کشت مناسب به سلول‌های اپیتلیال توبولار کلیه تمایز می‌یابند. این سلول‌ها زمانی که به موش SCID¹ (دچار نقص سیستم ایمنی) تزریق شود، به سمت توبول‌های کلیه ادغام شده و باعث بهبودی کامل عملکرد کلیه می‌شوند (Sagrinati et al., 2006).

در این مطالعه، از دو مارکر سطحی CD24 و CD133 جهت شناسایی سلول‌های پیش‌ساز کلیه استفاده کردیم. نتایج فلوسایتومتری در روز ۷ تمایز بیان همزمان مارکرهای CD24 و CD133 را نشان داد به طوری که این دو مارکر در هر سه گروه نسبت به گروه کنترل افزایش بیان را نشان دادند. نتایج بدست‌آمده در این مرحله با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد (Ronconi et al., 2006; Sagrinati et al., 2009). بیان مارکرهای CD24 و CD133 در گروه ۱۰ درصد CM، به ترتیب ۹۳/۸ درصد و ۶/۴۱ درصد بوده، در گروه ۳۰ درصد CM، ۸۹/۸ درصد و ۴/۶۳ درصد و در گروه ۵۰ درصد CM کمترین بیان را (۸۵/۷ درصد و ۴/۴۴ درصد) نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند. با این یادآوری که در طول دوره تمایز بیان مارکرهای CD24 و CD133 کاهش می‌یابد و با توجه به این که مارکرهای تمایزی (CK18 و ZO1) در گروه ۱۰ درصد CM بیشترین درصد بیان را داشتند، بنابراین این گونه به نظر می‌رسد که استفاده از محیط کشت روی MSC باعث تمایز شده ولی گروه ۱۰ درصد CM اثر بهتری بر روی القاء تمایز سلول‌های hES به سلول‌های اپیتلیالی کلیه دارد.

در این مطالعه هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از کلیه موش نوزاد با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای سطحی مهم سلول‌های مزانشیم CD105، CD90 و CD29 را بیان می‌کنند و نسبت به مارکرهای سطحی سلول‌های خون ساز CD45 و CD34 بیانی نشان ندادند، به این وسیله مزانشیم بودن سلول‌ها اثبات شد. نتایج بدست‌آمده از این مرحله از تحقیق توسط نتایج دیگر محققین تأیید می‌گردد (Baddoo et al., 2003). فاکتورهای

ZO1، PAX2 و CK18 در روز ۷ تمایز در هر سه گروه را نشان داد. با توجه به نتایج حاصل، بیان ژن PAX2 افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) را در دو گروه ۱۰ درصد و ۳۰ درصد نشان داد و همچنین میزان بیان ژن‌های CK18 و ZO1 در هر سه گروه بصورت معنی‌دار ($P < 0.01$ – $P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد که نشان‌دهنده تمایز با کارایی بالای سلول‌های hES با استفاده از CM در طی مسیر تمایزی است. نتایج بدست آمده در این مرحله با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Bussolati et al., 2005; Ehsani et al., 2019; Kang & Han, 2014). قابل ذکر است که افزایش بیان معنی‌داری در گروه ۱۰ درصد در بیان دو ژن CK18 و ZO1 نسبت به دو گروه دیگر دیده می‌شود.

در مطالعه حاضر، اثر محیط CM حاصل از سلول بنیادی مزانشیمی کلیه موش نوزاد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد استفاده از محیط CM حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کلیه موش نوزاد، می‌تواند تاثیر مثبتی بر تمایز سلول بنیادی جنینی انسانی به سمت سلول‌های اپیتلیالی بالغ کلیوی داشته باشد و بیان مارکرهای پیش‌سازی (CD133 و CD24) و ژن‌های اختصاصی سلول‌های اپیتلیالی توبولار کلیه، ZO1، PAX2 و CK18 تاییدکننده این موضوع است. این روش تمایزی می‌تواند به عنوان گامی موثر در جهت ایجاد شرایط مناسب برای بازسازی کلیه در شرایط آزمایشگاهی محسوب شود. بنابراین معرفی این روش تمایزی می‌تواند به عنوان روشی مفید برای تمایز سلول‌های hPS به سلول‌های اجداد کلیه قلمداد شود که باعث تسهیل درمان بیماری کلیوی و دیگر بیماری‌های مربوط به کلیه با استفاده از تکنیک‌های پزشکی بازساختی، می‌شود. ترکیب زیست‌شناسی تکوین و زیست‌شناسی سلول بنیادی، که در این گزارش نشان داده‌شد برای دستیابی به این هدف موثر خواهد بود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

- Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C., & Phinney, D. G. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(6), 1235-1249. <https://doi.org/10.1002/jcb.10594>
- Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Buttiglieri, S., Derigibus, M. C., Cantino, D., & Camussi, G.

برای حرکت آب، محلول‌ها، یون‌ها، پروتئین‌ها و سایر مولکول‌ها ایجاد کرده و همچنین قطبیت سلول را حفظ می‌کند. اتصالات محکم یک ساختار اساسی مورد نیاز برای عملکرد اپیتلیال سالم می‌باشد. ZO1 یکی از پروتئین‌های مهم اتصالات محکم و یک مارکر اختصاصی سلول‌های اپیتلیال تمایز یافته می‌باشد (Fanning et al., 1998). اتصالات محکم نقش مهمی در عملکرد توبول‌های کلیه دارد، به طوری که هنگام آسیب، بهبود اپیتلیال کلیوی، نیاز به تعداد زیادی فرایندهای پیوسته شامل تشکیل مجدد اتصالات محکم دارد. پروتئین‌های فیلامنت سایتوکراتین (CK)، یکی از پروتئین‌های ساختاری اختصاصی اپیتلیال می‌باشند. اپیتلیال‌های ساده مثل اپیتلیال سلول‌های کلیه فقط کراتین‌های اصلی‌شان مثل CK18 را بیان می‌کنند (Ostalska-Nowicka et al., 2004). پس از اثر محیط CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی کلیه موش نوزاد بر سلول‌های بنیادی جنینی، افزایش قابل توجه بیان ژن‌های ZO1 و CK18 نسبت به گروه کنترل می‌تواند تاییدی بر تمایز hESC به سمت سلول‌های اپیتلیالی باشد روشی برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به سلول‌های اپیتلیالی را با تشکیل اجسام شبه‌جنینی (EB) در یک مطالعه ارائه دادند. آن‌ها hESC تمایز نیافته را در شرایط معلق کشت دادند، پس از جداسازی سلول‌های CD133+ CD24+ از EB، اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کلیه موش بالغ را برای تمایز بیشتر این سلول‌ها با استفاده از هم‌کشتی مورد بررسی قرار دادند. بیان مارکرهای پیش‌سازی (PAX2 و WT1) و مارکرهای اپیتلیالی توبولار کلیه (ZO1 و CK18) در قبل و بعد از هم‌کشتی این سلول‌ها با سلول‌های مزانشیمی کلیه موش بالغ (A-KMSC) بررسی شد. نتایج نشان داد که در سلول‌های CD133+ CD24+، پس از هم‌کشتی با A-KMSC، بیان مارکرهای پیش‌سازی CD24، CD133، PAX2 و WT1 کاهش یافته در حالی که بیان مارکرهای اپیتلیالی کلیه (CK18، ZO1 و CK8) افزایش می‌یابد (Ehsani et al., 2019). نتایج حاصل از Real time RT-PCR، بیان ژن‌های

(2005). Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *The American Journal of Pathology*, 166(2), 545-555. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62276-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62276-6)

Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2013). A review of the important central role of altered citrate metabolism during the process of stem cell differentiation. *Journal of Regenerative*

- Medicine & Tissue Engineering*, 2. <https://doi.org/10.7243/2050-1218-2-1>
- De Gregorio, C., Contador, D., Díaz, D., Cárcamo, C., Santapau, D., Lobos-Gonzalez, L., ... & Ezquer, F. (2020). Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 11, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01680-0>
- Eckardt, K. U., Coresh, J., Devuyst, O., Johnson, R. J., Köttgen, A., Levey, A. S., & Levin, A. (2013). Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *The Lancet*, 382(9887), 158-169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60439-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60439-0)
- Ehsani, E., Shekarchian, S., Baharvand, H., Aghdami, N., & Moghadasali, R. (2019). Improved differentiation of human enriched CD133+ CD24+ renal progenitor cells derived from embryonic stem cell with embryonic mouse kidney-derived mesenchymal stem cells co-culture. *Differentiation*, 109, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.07.001>
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., & Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29745-29753. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29745>
- Gansevoort, R. T., Correa-Rotter, R., Hemmelgarn, B. R., Jafar, T. H., Heerspink, H. J. L., Mann, J. F., ... & Wen, C. P. (2013). Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *The Lancet*, 382(9889), 339-352. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60595-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60595-4)
- Grassmann, A., Gioberge, S., Moeller, S., & Brown, G. (2005). ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(12), 2587-2593. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi159>
- Kang, M., & Han, Y. M. (2014). Differentiation of human pluripotent stem cells into nephron progenitor cells in a serum and feeder free system. *PloS One*, 9(4), e94888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094888>
- Kramer, J., Steinhoff, J., Klinger, M., Fricke, L., & Rohwedel, J. (2006). Cells differentiated from mouse embryonic stem cells via embryoid bodies express renal marker molecules. *Differentiation*, 74(2-3), 91-104. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00062.x>
- Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6487-6492. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631767100>
- Li, Y., & Wingert, R. A. (2013). Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospects & challenges. *Clinical and Translational Medicine*, 2(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-11>
- Mae, S. I., Shirasawa, S., Yoshie, S., Sato, F., Kanoh, Y., Ichikawa, H., ... & Sasaki, K. (2010). Combination of small molecules enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into intermediate mesoderm through BMP7-positive cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 877-882. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.111>
- Nishikawa, S. I., Jakt, L. M., & Era, T. (2007). Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 502-507. <https://doi.org/10.1038/nrm2189>
- Nuzzo, A. M., Moretti, L., Mele, P., Todros, T., Eva, C., & Rolfo, A. (2022). Effect of placenta-derived mesenchymal stromal cells conditioned media on an LPS-induced mouse model of preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1674. <https://doi.org/10.3390/ijms23031674>
- Ostalska-Nowicka, D., Zachwieja, J., Nowicki, M., & Witt, M. (2004). Expression of intermediate filaments of podocytes within nephrotic syndrome glomerulopathies in children. *Histochemistry and Cell Biology*, 121, 109-113. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0619-7>
- Pavenstädt, H. (2000). Roles of the podocyte in glomerular function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 278(2), 173-179. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.2.F173>
- Platt, J. L., LeBien, T. W., & Michael, A. F. (1983). Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohemopoietic differentiation antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 157(1), 155-172. <https://doi.org/10.1084/jem.157.1.155>
- Poulsom, R., Forbes, S. J., Hodivala-Dilke, K., Ryan, E., Wyles, S., Navaratnasah, S., ... & Wright, N. A. (2001). Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *The Journal of Pathology*, 195(2), 229-235. <https://doi.org/10.1002/path.976>
- Poursafavi, Z., Abroun, S., Kaviani Jebeli, S., & Hayati Roudbari, N. (2023). The study of the viability of human wharton's jelly mesenchymal stem cells in alginate capsules. *Journal of*

- Animal Biology*, 15(2), 195-204.
<https://doi.org/10.22034/ASCIJ.2022.1958757.1391>
- Ren, X., Zhang, J., Gong, X., Niu, X., Zhang, X., Chen, P., & Zhang, X. (2010). Differentiation of murine embryonic stem cells toward renal lineages by conditioned medium from ureteric bud cells in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42(7), 464-471.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmq046>
- Romagnani, P., Remuzzi, G., Glasscock, R., Levin, A., Jager, K. J., Tonelli, M., ... & Anders, H. J. (2017). Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1-24.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.88>
- Ronconi, E., Sagrinati, C., Angelotti, M. L., Lazzeri, E., Mazzinghi, B., Ballerini, L., ... & Romagnani, P. (2009). Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(2), 322.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2008070709>
- Sadraie, M. R., Mehrabani, D., & Vahdati, A. (2015). Comparison of therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells and liquid culture environment (secreta) in the treatment of induced knee abrasion created in guinea pigs. *Armaghane Danesh*, 20(8), 651-665.
- Sagrinati, C., Netti, G. S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., ... & Romagnani, P. (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9), 2443-2456.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006010089>
- Saheli, M., Bayat, M., Ganji, R., Hendudari, F., Kheirjou, R., Pakzad, M., ... & Piryaee, A. (2020). Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Archives of Dermatological Research*, 312, 325-336.
<https://doi.org/10.1007/s00403-019-02016-6>
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., ... & Visvader, J. E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072), 84-88.
<https://doi.org/10.1038/nature04372>
- Steenhard, B. M., Isom, K. S., Cazcarro, P., Dunmore, J. H., Godwin, A. R., John, P. L. S., & Abrahamson, D. R. (2005). Integration of embryonic stem cells in metanephric kidney organ culture. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(6), 1623-1631.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2004070584>
- Stenvinkel, P. (2010). Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine*, 268(5), 456-467.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02269.x>