

## ارزیابی برون تنی میزان مانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر روی داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک متعلق به موش‌های صحرایی نر هیپرگلیسمیک تیمار شده با بنفوتیامین

لیلا وفادار قاسمی M.Sc.، مرتضی بهنام رسولی Ph.D.\*، مریم مقدم متین Ph.D.، ناصر مهدوی شهری Ph.D.

- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: behnam@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۰

### چکیده

**هدف:** هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تیمار موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک با بنفوتیامین بر میزان مانایی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر روی داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک بوده است.

**مواد و روش‌ها:** بعد از القای هیپرگلیسمی (STZ) و تیمار ۴ و ۸ هفته‌ای با بنفوتیامین از یک سوم میانی عصب سیاتیک، به‌روش ساندل، داربست‌های سلول‌زدایی شده تهیه شد. به‌موازات آن، از بافت چربی سلول‌های بنیادی استخراج، تکثیر و سپس در مرحله پاساژ ۴ بر روی داربست‌ها پیوند زده شدند. در روز هشتم پس از پیوند، مانایی سلول‌ها در محیط کشت توسط تست MTT و همچنین میزان چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**نتایج:** در مقایسه با گروه سالم، میزان مانایی سلول‌ها در محیط کشت محتوی داربست‌های متعلق به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک تیمار نشده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ولی بین گروه تیمار شده با بنفوتیامین و گروه سالم تفاوت معنی‌داری دیده نشد. بررسی SEM داربست‌ها چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست را تایید کرد.

**نتیجه‌گیری:** هیپرگلیسمی احتمالاً از طریق افزایش گلیکوزیلاسیون و تولید AGEs موجب کاهش اثرات القایی پروتئین‌های ECM بر میزان مانایی و همچنین چسبندگی سلول‌ها به داربست سلول‌زدایی شده می‌شود. چنین به‌نظر می‌رسد که تیمار موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک با بنفوتیامین با ممانعت از تغییرات متابولیک پیشرفته در پروتئین‌های ECM از تغییرات ساختاری ECM جلوگیری می‌کند.

**واژگان کلیدی:** هیپرگلیسمی، داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، بنفوتیامین، ماتریکس خارج سلولی

## مقدمه

دیابت مشتمل بر گروهی از اختلالات متابولیک است که با افزایش قند خون مشخص می‌شود و با عوارض گوناگونی از قبیل نوروپاتی، اختلالات قلبی و عروقی و نوروپاتی همراه است. اگر چه در پیشرفت این بیماری عوامل گوناگونی نقش دارند اما ناتوانی در تولید، آزادسازی و یا پاسخ به انسولین از مهمترین دلایل بروز این بیماری می‌باشد (۱).

در این میان، نوروپاتی یکی از عوارض شایع در بیماران مبتلای به دیابت است که با چندین نشانه بالینی که اعصاب حسی، حرکتی و اتونوم را درگیر می‌کند مشخص می‌شود. در این راستا، دمیلینه شدن و از دست رفتن فیبرهای عصبی و همچنین اختلال در ترمیم ضایعات عصبی از تغییرات پاتولوژیک متداول می‌باشد (۲). شیوع نوروپاتی در اولین سال ابتلای به دیابت ۱۰ درصد و در بیمارانی که بیش از ۲۵ سال دیابت دارند تا ۵۰ درصد متفاوت است.

نتایج حاصل از مطالعات به عمل آمده نشان داده اند که ماتریکس خارج سلولی و همچنین داربست‌های سلول زدایی شده ای که ساختار و ویژگی‌های اصلی آن‌ها حفظ شده است محیط مناسبی برای تکثیر، رشد و تمایز سلولی می‌باشد. این اثرات احتمالاً ناشی از اثرات القایی پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (داربست) است (۳). از آن‌جا که در داربست‌های سلول‌زدایی شده اجزای سلولی که منبع اصلی آنتی ژنی هستند حذف می‌شوند، این ساختارهای بیولوژیک بالقوه می‌توانند در طی پیوند بافت و یا اندام، محیط مناسبی را برای اتصال، مهاجرت و تکثیر سلول‌های بنیادی فراهم آورند (۴).

یکی از دلایل عمده بروز عوارض ناشی از دیابت و از جمله نوروپاتی دیابتی گلیکوزیلاسیون پیشرفته ماتریکس خارج سلولی و افزایش تولید محصولات نهایی گلیکوزیله شده (Advanced glycation end products یا AGE) است. در شرایط هیپرگلیسمی، قندهای احیا کننده مانند گلوکز، به صورت غیر آنزیمی با گروه‌های آمین پروتئین‌ها واکنش داده و باز شیف و محصولات آمادوری و سرانجام AGE را به وجود می‌آورند. در این رابطه، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی به دلیل عمر طولانی یکی از اهداف بالقوه گلیکاسیون می‌باشند. تجمع AGEs در ماتریکس خارج سلولی با ایجاد اتصالات عرضی بین

پروتئین‌ها و مقاوم کردن آن‌ها نسبت به هضم آنزیمی سبب تغییر در ترکیب و ساختار ماتریکس خارج سلولی از جمله اندونوریوم و اعصاب محیطی و همچنین افزایش ضخامت غشای پایه می‌شود. این تغییرات بر روابط بین سلول‌های شوان و یا غلاف میلین با آکسولما اثر گذاشته و احتمالاً موجب تضعیف یا از بین رفتن پروتئین‌های اتصالی بین غشای سلول شوان و آکسولما می‌شود (۵).

افزون بر این در سال‌های اخیر نتایج سودمند استفاده از سلول‌های بنیادی در سلول درمانی تا حد زیادی مشخص شده است. در مقایسه با مغز استخوان، بافت چربی به دلیل آنکه دارای مقدار بیشتری سلول بنیادی است و از طرفی دسترسی آسان به حجم بزرگی از بافت چربی، عوارض کم مرتبط با برداشت آن‌ها، که می‌تواند با تکنیک‌های جراحی با کمترین تهاجم انجام شود، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۶).

تیامین (ویتامین B1) یک کوفاکتور ضروری در اغلب موجودات زنده است و احتمالاً در تکوین مراحل اولیه حیات نقش داشته است. فرم فعال آن یعنی تیامین دی فسفات (TDP) در متابولیسم داخل سلولی گلوکز (گلیکولیز، چرخه کربس و چرخه پنتوز فسفات) مورد نیاز است (۷). فقدان تیامین یا نقص در انتقال داخل سلولی آن می‌تواند یک سلسله اختلال مانند بیماری بری‌بری که معمولاً با عوارض قلبی-عروقی و عوارض عصبی همراه است را ایجاد کند (۸).

بنفوتیامین برای اولین بار در ۱۹۶۰ به عنوان یکی از مشتقات تیامین با دسترسی زیستی بالا ساخته شد (۹). از آنجاکه برای اهداف فارماکولوژیک، در بین مشتقات محلول در چربی تیامین، بنفوتیامین دارای دسترسی زیستی بهتری می‌باشد به نظر می‌رسد که موثرتر باشد. بنفوتیامین محتوی یک حلقه تiazول باز است، که از طریق غشای پلاسمایی انتشار می‌یابد و وقتی وارد سلول شد می‌تواند به سرعت از طریق فرایندهای آنزیمی و غیر آنزیمی فرم فعال تیامین (TDP) را به وجود آورد (۱۰).

بنفوتیامین با تغییر متابولیسم سلولی گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات باعث دفع متابولیت‌های آسیب رسان

نشده و همچنین چند داربست‌ها تهیه شده برش‌های پارافینی تهیه و به‌روش هماتوکسیلین ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند.

### مرحله استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی از بافت‌های چربی اضافه از زنان سالمی که تحت عمل لیپوساکشن قرار گرفته بودند استخراج شدند (۱۳). به این منظور بافت چربی ابتدا با FBS (Fetal bovine serum) حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد تا فاز مایع و چربی از هم جدا شود. سپس به‌ازای هر ۳ میلی‌لیتر بافت چربی ۱ میلی‌گرم کلاژناز اضافه شد. مخلوط چربی و کلاژناز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه و پس از اتمام هضم آنزیمی، بافت چربی با نیروی ۸۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله به ترتیب از بالا به پایین ۴ فاز چربی معلق، بافت چربی، PBS و رسوب سلولی قابل مشاهده بود. سه فاز بالایی به‌آرامی جدا شدند. در مرحله بعد پس از اضافه کردن محیط کشت DMEM با غلظت گلوکز پایین و ۱۰ درصد FBS سوسپانسیون سلولی حاصل به فلاسک T75 منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO<sub>2</sub> ۵ درصد نگهداری و کشت داده شدند.

### پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر

روی داربست: جهت پیوند سلول‌ها بر روی داربست‌ها، سلول‌ها در پاساژ ۴ پس از آن‌که به تراکم سلولی ۸۰ درصد رسیدند، تریپسینه و سپس سانتریفیوژ شدند. پس از شمارش به‌وسیله لام نئوبار سلول‌ها، به‌روش تزریق با سرنگ همیلتون در سه نقطه از داربست کاشته شدند. هر داربست در یک خانه از ظروف ۹۶ خانه ای کشت سلول قرار داده شد. پیش از ورود داربست‌ها به محیط کشت اصلی، اجازه داده شد به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باقی بمانند تا سلول‌ها به داربست بچسبند. پس از آن داربست‌های حاوی سلول در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۸ روز انکوبه شدند. برای جلوگیری از آلودگی، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین

سلولی از بدن و متعاقباً کاهش تولید AGES می‌شود (۱۱)

هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک با بنفوتیامین در شرایط *in-vivo* (درون تنی) بر مانایی سلول‌های بنیادی بر روی داربست سلول زدایی شده عصب سیاتیک در شرایط *in-vitro* (برون تنی) بوده است.

### مواد و روش‌ها

این تحقیق در طی دو مرحله درون تنی برای ایجاد هیپرگلیسمی تجربی و تیمار دارویی حیوانات هیپرگلیسمیک و سپس در ادامه تحقیق در شرایط برون تنی که در طی آن سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌های سلول زدایی شده عصب سیاتیک کشت داده شدند انجام شد. در مرحله اول برای ایجاد هیپرگلیسمی تجربی از STZ استفاده شد. بدین منظور موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در معرض یک نوبت تزریق درون صفاقی STZ با دوز ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند. پس از تأیید هیپرگلیسمی، موش‌های صحرایی به گروه‌های سالم، هیپرگلیسمیک ۴ و ۸ هفته‌ای و با تیمار دارویی (بنفوتیامین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و بدون تیمار دارویی (حلال دارو) تقسیم شدند.

تحت بی‌هوشی عمیق عصب سیاتیک پای راست آشکار و حدود دو سانتی‌متر از بخش میانی آن جدا و برای تهیه داربست‌های سلول زدایی شده مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه داربست‌های سلول‌زدایی شده

قطعات عصب سیاتیک به روش ساندل سلول‌زدایی شدند (۱۲). به‌طور خلاصه، در این روش ابتدا قطعات عصب سیاتیک به مدت ۷ ساعت در آب مقطر دیونیزه غوطه ور شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت به محلول تریتون X-100 منتقل شده و به دنبال آن به مدت ۲۴ ساعت به محلول سدیم دزوکسی کولات نگهداری شدند. این روند دو بار تکرار گردید. پس از شستشوی نهایی با آب، قطعات عصب سلول زدایی شده در بافر نمکی فسفات (PBS) ۱۰ میلی مولار حاوی پنی‌سیلین / جنتامایسین با pH = ۷/۲ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تأیید سلول‌زدایی، از چندین قطعه عصب سیاتیک سلول‌زدایی

شد. سپس جذب نوری هر کدام از خانه‌ها با استفاده از دستگاه ELIZA reader خوانده شد.

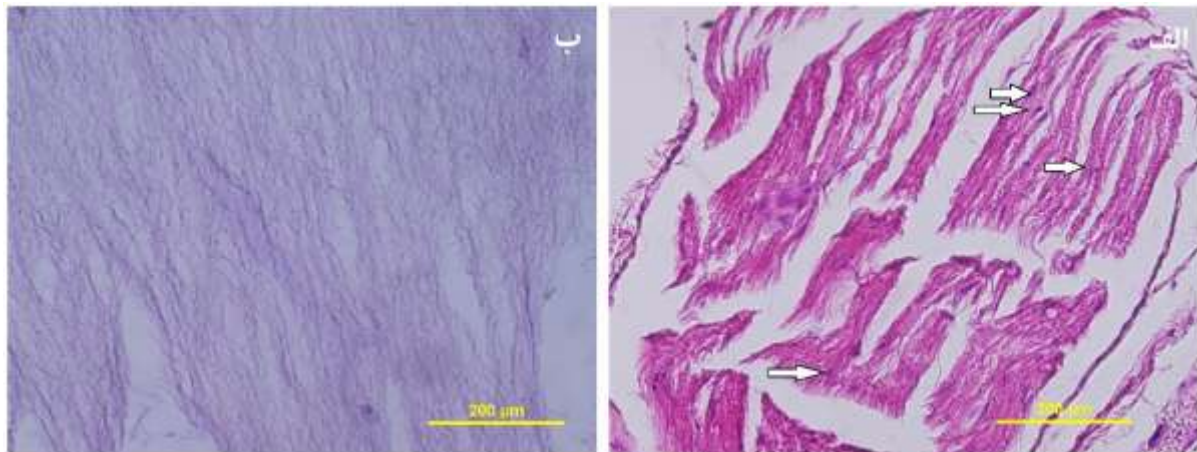
**بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی**  
**نگاره:** بعد از گذشت ۸ روز (۱۴) از کشت سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌ها تعدادی از نمونه‌ها جهت بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور نمونه‌ها با استفاده از گلو تار آلدئید ۲ درصد به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند. برای آگیری از درجات صعودی اتانول و در مرحله آخر از استون استفاده شد. پس از خشک شدن، نمونه‌ها روی گرید قرار گرفته و با پوشش طلا-پالادیوم پوشانده شدند.

#### نتایج

از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین جهت تأیید وجود و یا عدم وجود سلول در داربست‌های سلول زدایی شده استفاده شد. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود در داربست‌های سلول زدایی شده هیچ‌گونه هسته سلولی دیده نمی‌شود.

۱۰۰۰۰ units/ml و استرپتومایسین (۱۰۰۰۰ µg/ml) به محیط کشت اضافه شد. محیط کشت DMEM از شرکت سیگما و سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین از شرکت Gibco خریداری شد.

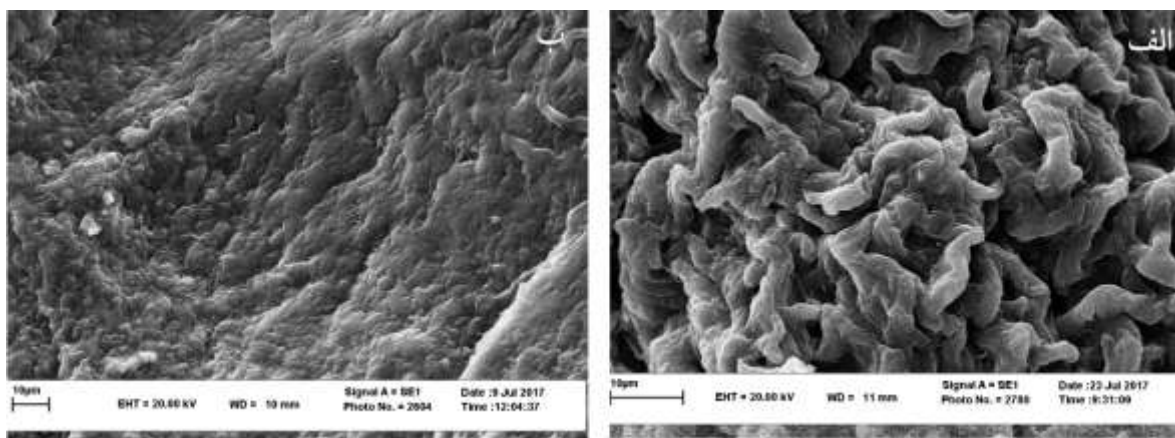
**سنجش MTT** به‌منظور تعیین تعداد سلول‌ها بر روی هر داربست از تست کمی MTT (Dimethyl-thiazol-) diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است. اساس این تست شکستن نمک MTT توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌صورت محلول در می‌آیند. این تغییر رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. در پایان روز هشتم کشت به‌هر یک از خانه‌های ظرف محیط کشت ۲۰ میکرولیتر از محلول تازه تهیه شده اضافه شد. سپس ظرف کشت برای ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در پایان این دوره زمانی، محیط کشت کلیه خانه‌های ظرف کشت خارج و به‌هر کدام از خانه‌ها ۳۰۰ میکرولیتر از DMSO اضافه



شکل ۱: مقایسه بافت شناسی داربست سلول زدایی شده با عصب دست نخورده به‌کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. تصویر (الف) عصب دست نخورده، پیکان‌ها هسته سلول‌ها را نشان می‌دهد. تصویر (ب) در داربست سلول زدایی شده هیچ سلولی دیده نمی‌شود.

گرفتند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود ساختار کلی ماتریکس خارج سلولی عصب بعد از فرایند سلول زدایی حفظ شده است.

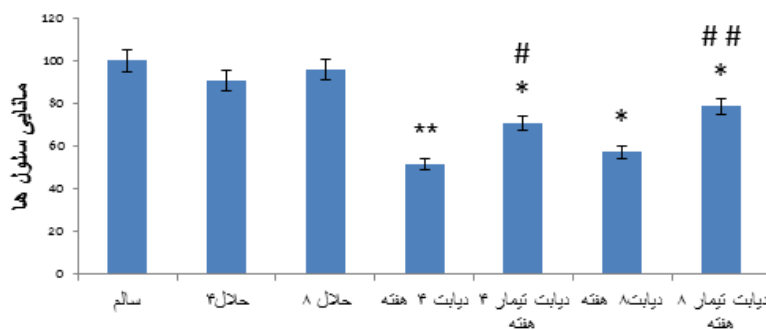
به‌منظور مقایسه دقیق تر تغییرات ساختاری داربست‌های سلول زدایی شده، نمونه‌های بافتی عصب سالم و داربست سلول زدایی شده با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از نمای طولی ساختار عصب سیاتیک دست نخورده (الف) و داربست سلول زدایی شده (ب). همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، ساختار ماتریکس خارج سلولی در داربست تقریباً حفظ شده است.

بهبودی وضعیت گردیده است. همچنین در بررسی میزان دوره زمانی تیمار با دارو (۴ هفته یا ۸ هفته) نتایج آنالیزهای آماری نشان داد در میزان زنده مانگی سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌ها از نظر مدت زمان تیمار دارویی اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

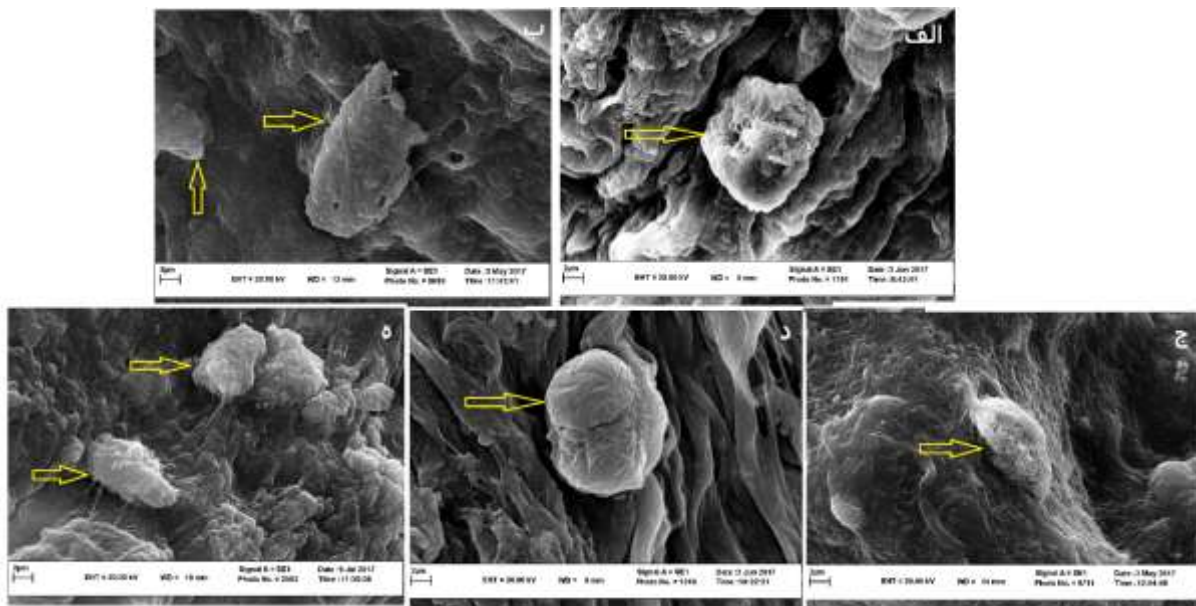
نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که در مقایسه با گروه سالم کمترین میزان مانایی سلول‌ها بر روی داربست مربوط به گروه‌های دیابتی ۴ هفته و ۸ هفته بود (شکل ۳). مقایسه بین گروه سالم با گروه دیابتی تیمار نشده تفاوت معنی‌دار است ولی با گروه تیمار شده تفاوت معنی‌دار نیست یعنی تیمار موجب



شکل ۳: مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه‌های مورد بررسی در مقایسه با گروه سالم در روز ۸ با استفاده از آزمون MTT. داده‌ها میانگین ۳ بار اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر غلظت می‌باشد.  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.01$  \*\* در مقایسه با گروه سالم معنادار در نظر گرفته شده است و  $p < 0.05$  # و  $p < 0.01$  ## در مقایسه بین گروه دیابت ۸ هفته و گروه دیابت ۴ هفته در نظر گرفته شده است.

و سالم با میکروسکوپ الکترونی نگاره اتصال سلول‌های بنیادی به داربست را تأیید نمود.

بررسی اتصال سلول‌ها بنیادی مشتق از چربی به داربست‌های سلول زدایی شده در گروه‌های دیابت، دیابت تیمار با بنفوتیامین



شکل ۴: نمایش AdMSCهای چسبیده و نفوذ یافته به درون داریست عصب سیاتیک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره. گروه سالم (الف)، گروه هیپرگلیسمی ۴ هفته (ب)، گروه هیپرگلیسمی ۸ هفته (ج)، گروه هیپرگلیسمی تیمار با بنفوتیامین ۴ هفته (د) و گروه هیپرگلیسمی تیمار با بنفوتیامین ۸ هفته (ه). سلول‌ها با پیکان مشخص شده‌اند. بزرگنمایی X ۱۰۰۰۰

## بحث

در این مطالعه قطعات عصب سیاتیک به روش ساندرل که در آن از دترجنت‌های تریتون X-100 و سدیم دزوکسی کولات استفاده می‌شود سلول‌زدایی شدند. در این رابطه نشان داده شده است که در طی فرایند سلول‌زدایی علاوه بر آنکه پروتئین‌های ECM دچار تغییر ماهیت شیمیایی و یا ساختاری نمی‌شوند خواص فیزیکی و زیستی ECM و غشاء پایه به شکل مناسبی حفظ و داریست کماکان واجد اثرات القایی بر رشد آکسونی است (۱۲). علاوه بر این حذف سلول‌ها کامل است (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین اتصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به داریست‌های عصب سیاتیک در گروه‌های هیپرگلیسمی، گروه‌های هیپرگلیسمی تیمار با بنفوتیامین و سالم تأیید شد (شکل ۴). در شرایط طبیعی، ECM ضمن تامین استحکام فیزیکی بافت دارای نقش مهمی در تنظیم رفتار سلول، تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی از طریق برهمکنش با گیرنده‌های ویژه سطح سلول مانند

اینترنت‌ها است (۱۵). از طرف دیگر، در شرایط هیپرگلیسمی پروتئین‌های ECM به‌ویژه آن‌هایی که عمر طولانی تری دارند اهداف بالقوه‌ای برای گلیکاسیون بوده و از این طریق باعث افزایش کلاژن اندونوریال و ضخیم شدن غشای پایه می‌شوند (۱۶).

گلیکاسیون سبب از دست رفتن بار الکتریکی و همچنین تغییر ساختار پروتئین‌های ECM می‌شود (۱۵). بدین ترتیب با کاهش تمایل پروتئین‌ها جهت اتصال به اینتگرین‌ها چسبندگی سلولی نیز کم می‌شود. افزون بر این، ایجاد اتصالات عرضی بین پروتئینی احتمالاً باعث مقاوم شدن پروتئین‌ها به پروتئولیز و نهایتاً ضخیم شدن غشای پایه می‌شود (۱۷). در شرایط هیپرگلیسمی، در برخی از اندام‌های دیگر نیز وقایع مشابهی صورت می‌گیرد. به‌عنوان مثال، نشان داده شده است که در نفروپاتی دیابتی تجمع عناصر ECM در گلومرول‌ها و تغییر در بسیاری از اجزای تشکیل دهنده آن از قبیل افزایش میزان کلاژن، کاهش هپاران سولفات، افزایش لامینین، تغییر در ساختار اینتگرین‌ها و افزایش ضخامت غشای پایه از علائم



می‌تواند این سه مسیر را مهار کند. این مهار به‌وسیله فعال شدن آنزیم ترانس کتولاز مسیر پنتوز فسفات انجام می‌شود که گلیسرآلدئید ۳ فسفات و فرکتوز ۶ فسفات را به پنتوز ۵ فسفات و دیگر قندها تبدیل می‌کند (۲۴). بنفوتیامین احتمالا با مهار این سه مسیر از گلیکوزیلاسیون پیشرونده پروتئین‌های ECM و در نتیجه برهم خوردن روابط سلول/ECM جلوگیری می‌کند (۲۴). شناخت دقیق اساس پاتولوژی نوروپاتی ناشی از هیپرگلیسمی دیابتی و ارتباط آن با تغییرات فیزیکی - شیمیایی ECM و همچنین سازوکار اثر داروهایی که دارای اثرات مثبتی در پیشگیری و یا ممانعت از پیشرفت و احتمالا درمان این عارضه هستند مستلزم انجام تحقیقات بیشتر است.

#### نتیجه گیری

هیپرگلیسمی احتمالا با تغییر در ترکیب و ساختار ECM اعصاب محیطی باعث کاهش مانایی سلول‌های بنیادی بر روی داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک متعلق به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک می‌شود. اثرات مثبت تیمار با بنفوتیامین در حفظ خواص زیستی ECM داربست سلول‌زدایی شده را می‌توان به اثرات این دارو در جلوگیری از گلیکوزیلاسیون پیشرفته اجزای سازنده ECM و یا معکوس کردن تغییرات بوجود آمده ناشی از هیپرگلیسمی نسبت داد.

#### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و از محل طرح شماره ۳/۴۱۸۵۳ انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

#### منابع

1. He Z, King GL. Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004; 33(1): 215-38.

پاتولوژیک آشکار می‌باشند (۱۸). در این رابطه چنین به‌نظر می‌رسد که کاهش مانایی سلول‌های بنیادی بر روی داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک متعلق به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک احتمالا ناشی از تغییراتی است که در ترکیب ECM به‌وجود آمده است. این چنین تغییرات ساختاری می‌توانند سبب کاهش قابلیت پیام‌رسانی بین سلولی و همچنین بین سلول/ECM شوند (۱۹). در شرایط طبیعی، پایداری فیبرهای عصبی در اعصاب محیطی مستلزم حفظ روابط بین آکسولما و غشای سلول شوان/ غلاف میلین است (۱۹). ترمیم فیبرهای عصبی ضایعه دیده نیز به برقراری این چنین روابط بین سلولی وابسته است (۲۰). بنابراین، این نتیجه‌گیری منطقی به‌نظر می‌رسد که نوروپاتی ناشی از هیپرگلیسمی دیابتی به احتمال زیاد معلول برهم خوردن پیام‌رسانی بین سلولی (۲۱)، تغییر در ساختار شیمیایی اینترگرین‌ها (۱۵) و ملکول‌های چسبنده بین سلولی (۲۲)، تغییر در ضخامت غشای پایه (۱۶) و استحکام فیزیکی غلاف‌های آندونوریال، پری‌نوریال و اپی‌نوریال (۲۳) می‌باشد. اثرات مثبت ناشی از تیمار موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک با بنفوتیامین بر حفظ اثرات القایی پروتئین‌ها و سایر عناصر موجود در داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک، که موجب افزایش میزان چسبندگی و مانایی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر روی داربست شد، می‌تواند بیانگر برهم خوردن ساختار فیزیکی - شیمیایی ECM در شرایط هیپرگلیسمی باشد. بنفوتیامین با تغییر سوخت و ساز سلولی گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات فعالیت می‌کند و باعث دفع متابولیت‌های آسیب رسان سلولی و متعاقبا کاهش تولید AGEs و استرس اکسیداتیو می‌شود. در شرایط هیپرگلیسمیک سه مسیر بیوشیمیایی (مسیر هگزوز آمین، مسیر AGEs، و مسیر دی‌آسیل گلیسرول - پروتئین کیناز C) فعال می‌شوند. نتایج حاصل از بررسی‌های به‌عمل آمده نشان داده‌اند که بنفوتیامین

2. Kennedy JM. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* [Internet]. 2000; 123(10): 2118–29.
3. Hill R. Extracellular matrix remodelling in human diabetic neuropathy. *Journal of Anatomy*. 2009;214(2): 219-225 p .
4. Mh A, Ph D, M MN, M SM, Hr M, Safarabadi F, et al. Preparation of Natural Scaffold from Sciatic Nerve and Viability Evaluation of Seeded Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. 2011; 1(1): 43–52 .
5. Zychowska M, Rojewska E, Przewlocka B, Mika J. Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy-experimental and clinical studies. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2013; 65(6): 1601–10.
6. Faroni A, Terenghi G, Reid AJ. Adipose-derived stem cells and nerve regeneration: Promises and pitfalls [Internet]. 1st ed. Vol. 108, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc.; 2013. 121-136.
7. Frank RAW, Leeper FJ, Luisi BF. Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(7–8): 892–905 .
8. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol*. 2008; 45(3): 131–41 .
9. Sánchez-Ramírez GM, Caram-Salas NL, Rocha-González HI, Vidal-Cantú GC, Medina-Santillán R, Reyes-García G, et al. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 530(1–2): 48–53 .
10. Greb A, Bitsch R. Comparative bioavailability of various thiamine derivatives after oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1998; 36(4): 216–21.
11. Indesmith LIS a L, Oe CHM, Arionneau SEM, Uvoen NAR, Iang XII, Indblad LAL, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* [Internet]. 2003;9(5):548–53.
12. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* [Internet]. 1998; 795(1–2):44–54.
13. Kia NA, Bahrami AR, Ebrahimi M, Matin MM, Neshati Z, Almohaddesin MR, et al. Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue. *J Mol Neurosci*. 2011; 44(3): 178–85 .
14. Gao S, Zheng Y, Cai Q, Yao W, Wang J, Zhang P, et al. Comparison of morphology and biocompatibility of acellular nerve scaffolds processed by different chemical methods. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25(5): 1283–91 .
15. Duran-jimenez B, Dobler D, Moffatt S, Rabbani N, Streuli CH, Thornalley PJ, et al. Advanced Glycation End Products in Extracellular Matrix Proteins Contribute to the Failure of Sensory Nerve Regeneration in Diabetes. *Sens Neur*. 2009; 58(December): 2893–903 .
16. Hill RE, Williams PE. A quantitative analysis of perineurial cell basement membrane collagen IV, laminin and fibronectin in diabetic and non-diabetic human sural nerve. *J Anat*. 2002; 201(2): 185–92 .
17. Becker M, Benromano T, Shahar A, Nevo Z, Pick CG. Changes in the Basal Membrane of Dorsal Root Ganglia Schwann Cells Explain the Biphasic Pattern of the Peripheral Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Mol Neurosci*. 2014; 54(4): 704–13 .
18. Muona P, Jaakkola S, Salonen V, Peltonen J. Diabetes Induces the Formation of Larne Diameter Collagen Fibrils in the Sciatic Nerves of BB Rats. *Matrix*. 1989; 9(1): 62–7 .
19. Tan KCB, Chow W-S, Ai VHG, Metz C, Bucala R, Lam KSL, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)* [Internet]. 2005; 4(1): 28–37.
20. Hill R. Extracellular matrix remodelling in



- human diabetic neuropathy. *J Anat.* 2009; 214(2): 219–25 .
21. Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo R V. The nature and biology of basement membranes.
22. Alovskaya a, Alekseeva T, Phillips JB, King V, Brown R. Fibronectin, Collagen, Fibrin-Components of Extracellular Matrix for Nerve regeneration. *Top Tissue Eng.* 2007; 3: 1–27 .
23. Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhang L, Guo Q, et al. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in. *Cell Transplant.* 2012; 23: 97–110.
24. Stracke H, Gaus W, Achenbach U, Federlin K, Bretzel RG. Benfotiamine in Diabetic Polyneuropathy (BENDIP): Results of a Randomised, Double Blind, Placebo-controlled Clinical Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes [Internet].* 2008; 116(10): 600–5. Matrix Biol [Internet]. 2017; 57–58: 1–11.

**Evaluating the viability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured on decellularized sciatic nerve scaffold of STZ-induced hyperglycemic male Wistar rats treated by benfotiamine**

Vafadar- Ghasemi L, M.Sc, Behnam-Rassouli M, Ph.D.\*, Moghadam-Matin M, Ph.D.,  
Mahdavi-Shahri N, Ph.D.

- Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

\* Email corresponding author: behnam@um.ac.ir

Received: 11 Aug. 2018

Accepted: 9 Oct. 2018

---

**Abstract**

**Aim:** The purpose of this study was to investigate the effects of benfotiamine treatment of hyperglycemic rats on viability of adipose tissue- derived mesenchymal stem cells on sciatic nerve acellular scaffolds.

**Material and method:** After induction of hyperglycemia (STZ) and treatment with benfotiamine segments for 4 and 8 weeks from the middle part of the sciatic nerves were decellularized using Sandell method and seeded with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. after 8 days of culture cells viability in the culture medium was evaluated by MTT assay and adhesion of the cells to the scaffold was examined by scanning electron microscopy (SEM).

**Results:** In comparison with intact group, cell viability of untreated hyperglycemic rats was significantly decreased while, there was no significant difference between benfotiamine treated group and intact. Results of electron microscopy confirmed adhesion of the cells on the scaffolds.

**Conclusion:** In hyperglycemic condition it is likely that glycosylation of ECM constituents and the production of AGEs decrease the inducible effects of ECM on the level of cell viability and probably cell adhesion to the scaffolds. It seems that benfotiamine treatment of hyperglycemic rats by reduction of glycation and AGEs production may prevent the structural changes of the ECM.

**Key Words:** Hyperglycemia, Acellular scaffolds of sciatic nerve, Adipose derived stem cells, Benfotiamine, Extracellular matrix