مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۱، ۲۶-۱۷
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.234436.2637
Archive of SID

بهبودی علایم بالینی در مدل تجربی سندرم زجر تنفسی حاد در گوسفند پس از پیوند اتولوگ با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان

جواد عباسی[۱] محمدرضا مخبر دزفولی[۱،۳] سیروس صادقیان چالشتری[۱،۳*] محمد مهدی دهقان[۲،۳] علیرضا وجهی[۲،۳]
حسین بهاروند[۴،۵] مصطفی قانعی[۶] معصومه جباری‌فخر[۳،۷]

۱) گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳) پژوهشکده تحقیقات زیست‌پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴) گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۵) گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
۶) مرکز تحقیقات مدیریت سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۷) فارغ التحصیل دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۸ آذر ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۷ اسفند ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS) یکی از اختلالات ریوی است که سبب مرگ در انسان و دام می‌شود و بدلیل نبود درمان دارویی ویژه برای آن، دستیابی به رویکردهای درمانی جدید مثل درمان با سلول‌های بنیادی، یک نیاز ضروری است. **هدف:** ارزیابی اثرات درمانی پیوند داخل نایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs) در بهبود علائم بالینی در مدل تجربی ARDS ایجاد شده با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) ایکلای سویه-B5:O55 در گوسفند هدف مطالعه حاضر می‌باشد. **روش کار:** در این مطالعه از ۱۰ رأس گوسفند نر نژاد شال با سن ۴-۳ ماه، بعد از قرار دادن تصادفی در دو گروه تیمار و کنترل استفاده شد. از گوسفندهای گروه تیمار بعد از بیهوشی با کتأمین و زایلازین نمونه مغز استخوان اخذ و در اتاق تمیز BM-MSCs جداسازی، تکثیر و با ارزیابی مارکرهای سطحی شناسایی شدند. سپس مدل تجربی ARDS، از طریق تزریق داخل نایی LPS با دوز ۴۰۰ µg/kg، ایجاد شد. علائم بالینی و تهیه تصاویر رادیوگرافی قبل و ۲۴ ساعت بعد از تزریق LPS انجام گرفت. بعد از تأیید التهاب، گوسفندها بیهوش و در موقعیت جناغی از طریق کاتتر لاواژ در محل دو شاخه‌شدن نای در گروه تیمار BM-MSCs پاساژ سوم به میزان ۵۰×۱۰^{۶} سلول بصورت پیوند اتولوگ و در گروه کنترل PBS انتقال داده شد. سپس علائم بالینی در ساعات ۱۲،۶،۳و روزهای ۱،۲، ۳و۷ در هر دو گروه ثبت و نهایتا بر اساس سیستم اسکوربندی مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند. **نتایج:** بررسی داده‌ها نشان داد پیوند BM-MSCs سبب بهبودی معنی‌دار در علایم بالینی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، صداهای تنفسی، سرفه، وضعیت مخاطات، ترشحات بینی، اشتها و وضعیت جسمانی در مقایسه با گروه کنترل شد. کاهش معنی‌دار در تعداد تنفس و دمای بدن از ساعت ۱۲ و در تعداد ضربان قلب از ساعت ۲۴ به بعد آغاز شد. همچنین تغییرات صداهای تنفسی در روز اول بعد از پیوند، وضعیت جسمانی، مخاطات و اشتها در روز سوم، وقوع سرفه و ترشحات غیر طبیعی از بینی در روز هفتم به حالت قبل از ایجاد التهاب (زمان ۲۴-) بازگشته بود و میانه اسکور برای آن‌ها صفر بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** این مطالعه نشان داد که پیوند BM-MSCs می‌تواند بصورت معنی‌داری سبب بهبودی و کاهش در شدت علایم بالینی ARDS شود.

واژه‌های کلیدی: BM-MSCs، ARDS، علائم بالینی، درمان با سلول‌های بنیادی، گوسفند

مقدمه

بیماری‌های ریوی یک از عوامل اصلی مرگ در انسان و دام هستند و به علت شیوع بالای بیماری‌های ریوی در سراسر جهان، توسعه استراتژی‌های پیشگیرانه و روش‌های درمانی جدید به‌منظور کاهش بیماری‌های ریوی و افزایش کیفیت زندگی اهمیت بسیاری دارند. سندرم زجر تنفسی حاد (Acute respiratory distress syndrome) (ARDS) برای اولین بار در سال ۱۹۶۷ به عنوان یک سندرم بالینی نارسایی حاد تنفسی شناخته شد. این سندرم نمایانگر یک اختلال تنفسی پیشرونده است (۳) که اعتقاد بر این است که در ابتدا، یک آسیب مستقیم ریوی یا غیر مستقیم خارج ریوی، منجر به افزایش یا تکثیر واسطه‌های التهابی می‌شود که این واسطه‌ها باعث تجمع نوتروفیل‌ها و سپس مهاجرت آن‌ها از سطوح اندوتلیال عروق و اپیتلیوم آلوئول‌ها شده که سبب آزادسازی پروتئازها، سیتوکین‌ها و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. این واسطه‌ها منجر به نفوذپذیری پاتولوژیک عروق، شکاف در سد اپیتلیوم آلوئول‌ها و نکروز سلول‌های آلوئولی تیپ I و II می‌شوند که نهایتا منجر به ادم ریه، تشکیل غشای هیالینی و از دست دادن سورفاکتانت می‌شود که سبب کاهش کمپلیانس ریوی شده و تبادل هوا را دشوار می‌کند (۲). بنابراین ARDS با علائم ۱) شروع حاد تنگی نفس، ۲) فشار اکسیژن شریانی کاهش یافته (هیپوکسمی)، ۳) عدم وجود شواهد کلینیکی نارسایی اولیه قلب چپ و ۴) پیدایش ارتشاحات ریوی منتشر در کلیشه‌های رادیوگرافی مشخص می‌شود (۲۲).

www.SID.ir
*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۰۰ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: s.sadeghian@ut.ac.ir

Archive of SID

درمـان دارویی ویژه‌ای بـرای ARDS وجود نـدارد و درمان‌های آن حمایتی هستند، که شامل تجویز اکسیژن، تهویه مکانیکی، مایع درمانی، حمایت تغذیه‌ای و اسـتراحت اسـت. علی رغم انجام تدابیر درمانی میزان مـرگ و میر ناشـی از ARDS در انسـان حدود ۵۰-۳۰٪ اسـت (۱۹). از طرفی با توجه به میزان شیوع بیماری‌های حاد ریوی در حیوانات، شناخت بهتـر نشـانه‌های بالینـی ARDS و روش‌های درمانی جدیـد می‌تواند به دامپزشـکان در تشـخیص و درمان بیماری کمک کند و از طرفی میتوان از آن به عنوان مدل حیوانی آزمایشـگاهی در توسـعه و اصلاح روش‌های مدرن پیوند سلول‌های بنیادی استفاده کرد (۲۴). لذا دستیابی به رویکردهای درمانی جدید که نه تنها به تخفیف علائم بیماری کمک کنند بلکه بر دوره طبیعی بیماری مربوطه نیز تأثیر بگذارند، یک نیاز ضروری محسوب می‌شود (۲۱). یک استراتژی برای درمان ARDS، که می‌تواند جایگزین سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال آسیب‌دیده شود و از نشت مایعات و ماکرومولکول‌ها به داخل آلوئول‌ها جلوگیری کند، روش سلول درمانی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells (MSC))، سلول‌های بنیادی چندقوه با قدرت تکثیری بالا و توانایی تمایز به رده‌های سـلولی مختلف و خصوصا اثرات آن‌ها در تعدیل ایمنی بدن(۵)، باعث شده تا از این سلول‌ها به عنوان ابزاری کاربردی در جهت اهداف سـلول درمانی به منظور درمان بیماری‌های ریوی استفاده نمود.

محققین خواص سـلول‌های بنیادی مزانشـیمی مغز استخوان را در آسـیب حاد ریه ناشی از لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتری اشیریشیاکلای (E. coli) را در مدل‌های حیوانی موش و رت بررسی کرده‌اند. نتایج آن‌ها نشان داده که این سلول‌ها از طریق ترشح آنژیوپویتین و عامل رشد کراتینوسیت (۱۰) و با کاهش میزان پروتئین تام، آلبومین و IgM در مایع شستشـوی برونشی-آلوئولی (Bronchoalveolar Lavage (BAL)) سبب بازیابی یکپارچگی غشـاء مویرگی-آلوئولی و با ترشـح آنتاگونیست گیرنده IL-۱ (۱۰)، کاهش میزان TNF-α و MIP-۲ و افزایش میزان IL-۱۰ در پلاسما و BAL (۶) و بـا کاهش نوتروفیل‌ها در BAL (۷) سـبب کاهش التهاب در ریه می‌شوند.

لـذا هـدف از این مطالعـه ارزیابی اثـرات درمانی پیونـد داخل نایی سـلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز اسـتخوان (BM-MSCs) (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) در بهبـود علائـم بالینی در مدل تجربی ARDS ایجاد شده با LPS باکتری ایشریشیا کُلای سویهB5:O55 در گوسفند است.

مواد و روش کار

نگهداری و آماده سازی گوسفندها: برای انجام این تحقیق از ۱۰ رأس گوسفند نر نژاد شال در رده سنی ۴-۳ ماه با میانگین وزن ۳/۷kg ±۳۰ استفاده شد. گوسفندان به مدت ۳۰ روز با شرایط یکسان محیطی و تغذیه‌ای در مرکز تحقیقاتی امین آباد دانشـکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری شدند و سـپس با انجام معاینات بالینی، آزمایشات خون شناسی و انگل شناسی از سلامت کامل آن‌ها اطمینان حاصل شد. گوسفندان مورد نظر بطور تصادفی در دو گروه کنترل (دریافت کنندهPBS (Phosphate Bapher Sulfate) به عنوان دارونما) و تیمار (دریافت کننده سـلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان) قرار داده شدند. سپس از گوسفندان گروه تیمار نمونه مغز استخوان اخذ و جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه تهران انتقال داده شد.

قبل از شـروع مطالعه، ابتدا گوسـفندها از مرکـز تحقیقاتی امین آباد به پژوهشـکده تحقیقات زیست پزشـکی منتقل و تا ۴۸ ساعت به منظور سـازگاری با محیط و رفع اسـترس حمل و نقل نگهداری شـدند و سپس مطالعه آغاز شد.

نمونه‌گیری مغز اسـتخوان و کشت سـلول‌های بنیادی مزانشیمی: به منظور کاهش احتمال پس زدن پیوند سلول‌ها، مغز استخوان اخذ شده از هر گوسفند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از آن به همان گوسفند پیوند خودی زده شـد. بدین منظور گوسـفندهای گروه تیمار پس از پرهیز غذایی ۱۲ ساعته، ابتدا ۲/۵ mg/kg انروفلوکساسین ۵٪(ابوریحان-ایران) و ۵ mg/kg ترامادول (شیمی دارو-ایران) به عنوان داروی ضد درد به صورت داخل عضلانی تزریق شـد. پس از گذشـت یک ساعت گوسفندها بوسیله تزریـق کتأمیـن ۱۰٪ (۱۰ mg/kg، Alfasan-Holland) و زایلازیـن (۰/۱ mg/kg، Interchemie-Holland) بصـورت عضلانـی بیهوش شدند. سپس ناحیه بال استخوان ایلیوم لگن بصورت آسپسی جراحی آماده شـد، سپس پوست ناحیه به اندازه ۲۰ ml برش داده شد و با رؤیت کرست استخوان ایلیوم، حدود ۵ ml مغز استخوان با سرنگ حاوی ۱ ml هپارین (۷۰۰ U/ml، IMAGEN) و سوزن جمشیدی نمره ۱۳ اخذ شد.

نمونه‌های مغز اسـتخوان اخذ شـده بلافاصله به اتاق تمیز (Clean Room) پژوهشکده زیست‌پزشکی انتقال داده شدند. در اتاق تمیز کلاس B و در زیر هود لامینار کلاس II جداسـازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شـد. بطوریکه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نمونه گرفته شـده به نسبت ۱:۱ با محیط کشـت DMEM (حاوی گلوکز بالا) حاوی FBS ۲۰٪+ Penicillin/ Streptomycin (محیط A) رقیق شـد. هر ۵ ml از نمونه بدسـت آمده به آرامی و از دیواره فالکون بر روی ۳ ml فایکول قرار گرفت؛ بطوری که دو لایه مجزا تشکیل و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰ g سانتریفیوژ شد که سه لایه مجزا تشکیل شد:

- لایه ۱ (لایه بالایی): حاوی محیط کشت اضافه شده به مغز استخوان و پلاسما
- لایـه ۲ (لایه میانی): لایه شـیری رنگ حاوی بافی‌کوت، فایکول و سلول‌های تک هسته‌ای
- لایه ۳ (لایه پایینی): حاوی گلبول‌های قرمز

www.SID.ir

Archive of SID

در مرحله بعد به آرامی توسط پیپت، محتویات لایه ۲ جمع آوری شد و در یک فالکون استریل جدید منتقل و به نسبت ۱:۱ با محیط A مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با دور g ۴۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی خارج و رسوب تشکیل شده مجدداً با محیط A به حالت تعلیق در آمد و در همان شرایط سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی داخل فالکون دور ریخته شد و رسوب بدست آمده با محیط A مخلوط و سپس محتویات به داخل فلاسک کشت سلول انتقال داده شد و فلاسک‌ها در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و با شرایط رطوبت ۹۵٪ و CO2 ۵٪ قرار داده شدند. هر ۳-۲ روز محیط کشت فلاسک‌ها با محیط A تازه تعویض، بطوریکه سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum (FBS) مورد استفاده در محیط کشت به تدریج به غلظت ۱۰٪ تغییر داده شد.

شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان توسط فلوسایتومتری: برای شناسایی از سلول‌های پاساژ سوم جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. ابتدا شست‌وشو و جداسازی سلول‌های sBM-MSCs (sheep Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) از کف فلاسک با استفاده از آنزیم تریپسین و سپس شمارش سلول‌ها (۱۰۶ سلول در حجم ml ۱) انجام شد. در مرحله بعد سلول‌های جمع‌آوری و در دور g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی خارج گردید و µl ۱۰۰ محلول ۱٪ سرم آلبومین گاوی به سلول‌ها اضافه شد. ۶۰-۳۰ دقیقه بعد محلول رویی (سرم آلبومین گاوی) خارج گردید و µl ۱۰۰ محیط کشت و آنتی‌بادی کنژوگه (جدول ۱) به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها برای مدت یک ساعت در دمای اتاق به دور از نور قرار داده شدند. سپس سلول‌ها سه بار با PBS (سانتریفیوژ با دور g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای c^o ۴) شستشو داده شدند. تمام مراحل برای آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل با همان غلظت آنتی‌بادی‌های اصلی انجام شد. نهایتاً نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD Bioscience, USA) FACSCanto II قرائت و توسط نرم‌افزار FlowJo نسخه ۷/۶/۱ آنالیز شدند.

ایجاد مدل تجربی سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS): قبل از ایجاد التهاب، علائم حیاتی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، صداهای تنفسی، وجود یا عدم وجود سرفه، وضعیت اشتها، وجود یا عدم وجود ترشحات بینی، وضعیت مخاطات و وضعیت جسمانی در نمونه فرمی که از قبل طراحی شده بود ثبت شد. پس از بیهوشی گوسفندها با کتأمین و زایلازین، دام‌ها در موقعیت جناغی قرار داده شدند و لوله نایی به داخل نای هدایت که با رفلکس سرفه ورود لوله به داخل نای تأیید می‌شد. در ادامه کاتتر لاواژ (شرکت سوپا) از داخل لوله نایی به آرامی تا محل دو شاخه شدن نای هدایت شد. سپس لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتری ایکلای سویه B5:O55 (Sigma-Aldrich) با دوز µg/kg ۴۰۰ به آرامی در داخل ریه تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد تمامی علائم حیاتی ذکر شده در بالا مجدداً ثبت شد. همچنین برای بررسی وضعیت پارانشیم ریه و اطمینان از ایجاد التهاب حاد، تصاویر رادیوگرافی قبل و ۲۴ ساعت بعد از تزریق LPS تهیه شد. لازم به ذکر است دوز LPS مورد استفاده در این مطالعه بعد از بررسی دوزهای مختلف (µg/kg ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰) در گوسفند بدست آمد. بطوریکه دوزهای کمتر از µg/kg ۴۰۰ سبب ایجاد التهاب ریه معنی‌دار نشدند و دوز بالاتر از µg/kg ۴۰۰ هم سبب مرگ شد.

پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: ۲۴ ساعت بعد از ایجاد التهاب حاد ریه، تدابیر آماده سازی و بیهوشی گوسفندها با کتأمین ۱۰٪ و زایلازین در هر دو گروه انجام شد. سپس گوسفندها در موقعیت جناغی قرار داده شدند و لوله نایی به داخل نای هدایت و کاتتر لاواژ از داخل لوله نایی تا محل دو شاخه شدن نای هدایت شد. سپس در گروه تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ سوم به میزان ۵۰×۱۰^۶ سلول که در محلول PBS رقیق شده بودند بصورت پیوند اتولوگ به گوسفندها پیوند زده شد. در مقابل در گروه کنترل تنها PBS به داخل ریه‌ها انتقال داده شد. تمامی گوسفندها تا زمان هوشیاری کامل در اتاق مراقب‌های ویژه (ICU) پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی تحت مراقبت کامل بودند و سپس به اتاق نگهداری منتقل می‌شدند.

ثبت علائم بالینی: معاینات بالینی قبل و بعد از تزریق LPS و در ساعات ۳، ۶، ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ پس از پیوند سلول‌های بنیادی در گروه تیمار و پس از تزریق PBS در گروه شاهد بررسی و همه اطلاعات شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، تغییرات در صداهای تنفسی، وجود یا عدم وجود سرفه، وضعیت اشتها، وجود یا عدم وجود ترشحات بینی، وضعیت مخاطات و وضعیت جسمانی در فرم‌های پیش بینی شده ثبت شد و سپس اسکورهای بالینی مربوطه برای هر گوسفند در هر زمان مطابق جدول ۲ محاسبه و ثبت شد (۱). این سیستم اسکوربندی بر پایه معیارهای ارزیابی شده بالینی است که بصورت انفرادی و برای هر یک از دام‌ها سنجیده شده و برای بدست آوردن اسکور تام با هم جمع شدند. مؤلفه‌های اسکور بالینی طبق علائم اصلی ذکر شده در متون علمی و پژوهشهای منتشر شده در این زمینه تعیین گردید (۱۳،۱۶).

آنالیز آماری: نتایج بدست آمده با بهره گیری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تعداد ضربان قلب، تنفس و میزان دما بصورت میانگین± انحراف معیار بیان شد و جهت مقایسه از آزمون‌های آماری Independent Samples T-Test و Repeated measurement ANOVA استفاده شد. سایر علائم بالینی مطابق سیستم اسکوربندی محاسبه و برای مقایسه آماری از آزمون‌های غیرپارامتری Mann-Whitney و Friedman Test استفاده شد. مقادیر $p<۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان: روند

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. آنتی‌بادی‌های کثروگه استفاده شده در فلوسایتومتری برای تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان.

نوع آنتی بادی	شماره‌کاتالوگ	شرکت
PE-conjugated CD۴۵	۱۰۳۱۲۱	Biolegend, Inc
PE-conjugated CD۳۱	Ab۴۶۷۳۳	Abcam, Inc
PE-conjugated CD۴۴	Ab۴۶۷۹۳	Abcam, Inc
PE-conjugated CD۲۹	Ab۳۶۲۱۹	Abcam, Inc

جدول ۲. تشریح اسکوربندی علائم بالینی التهاب حاد ریه در گوسفند.

اسکوربندی / علائم بالینی	۰	۱	۲	۳	۴
گوش کردن صداهای ریه	طبیعی	-	-	صداهای غیر طبیعی (کراکل، ویز)	-
سرفه	ندارد	سرفه تک	سرفه‌های تکرار شونده غیرارادی (تحریک رفلکس سرفه)	سرفه‌های تکرار شونده ارادی (بدون تحریک رفلکس سرفه)	
ترشحات بینی	عدم وجود ترشح	ترشح سروزی	ترشح سروموکوسی	ترشح‌موکوپرولنت	ترشح‌پرولنت
وضعیت مخاطات	طبیعی	اندکی پرخون	شدید اپرخون	سیانوتیک	-
اشتها	اشتها طبیعی	اندکی کاهش اشتها (<۵۰٪)	کاهش اشتها (<۵۰٪)	بی اشتها	-
وضعیت جسمانی	طبیعی (هوشیار و سریع (واکنش نشان می‌دهد	گنگ (dull) (به آهستگی واکنش نشان می‌دهد)	افسرده (depressed) (به طور واضحی به آهستگی واکنش نشان می‌دهد)	از پا افتاده (recumbent) (خوابیده)	-

رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان گوسفند در روزهای مختلف به صورت زیر بود: سلول‌هایی که تازه از مغز استخوان جدا شده بودند کروی و همراه با دیگر سلول‌ها شامل سلول‌های هماتوپویتیک و گلبول‌های قرمز بودند. به دلیل خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به تدریج و با تعویض محیط کشت و پاساژ دادن سلول، درصد خلوص آن‌ها بالا رفت و سایر سلول‌ها حذف شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ابتدا زائده دار بودند و سپس ظاهری شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل داشتند بطوریکه بعد از دو هفته، ۹۰-۸۰٪ کف ظرف کشت را سلول‌های دوکی شکل پوشانده بودند که در این مرحله سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. در مطالعه حاضر سلول‌ها بعد از سه پاساژ متوالی مورفولوژی پهن و کشیده و الگوی گردابی داشتند.

تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان توسط فلوسایتومتری: نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها شاخص‌های سطحی سلولی CD۲۹ و CD۴۴ را به ترتیب با فراوانی ۹۱٪ و ۸۹٪ بیان کردند و بیان شاخص‌های CD۴۵ (نشانگر سلول‌های هماتوپویتیک) و CD۳۱ (نشانگر سلول‌های اندوتلیال) منفی بود (۲۱). این نتایج به خوبی مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی را تأیید کردند.

مدل تجربی سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS): نتایج بررسی‌ها یک روز پس از تزریق LPS نسبت به حالت طبیعی نشان دهنده وقوع التهاب حاد بود. تغییر در صداهای تنفسی هنگام معاینات به صورت شنیدن صداهای کراکل و ویز یکطرفه یا دو طرفه، سختی تنفس، وقوع سرفه، افزایش تعداد تنفس (p=۰/۰۱۸)، افزایش تعداد ضربان قلب (p=۰/۰۱۴)، افزایش دمای بدن (p=۰/۰۰۱)، پرخونی مخاطات، ترشحات غیر طبیعی از بینی، کاهش اشتها و غیر طبیعی شدن وضعیت جسمانی همگی تأییدی بر درگیری حاد ریوی بودند. نتایج تصاویر رادیوگرافی نیز نشان دادند ریه‌ها قبل از تزریق LPS کاملاً طبیعی و کنتراست مناسب بین ریه‌های پر از هوا با سایه قلب، عروق منشعب از قلب و عروق ریوی وجود داشت اما ۲۴ ساعت بعد از تزریق LPS الگوی رادیوگرافی غیر طبیعی ریه (الگوی مخلوط با غلبه الگوی آلوئولار) دیده شد و روند التهاب کاملاً مشهود بود. افزایش دانسیته در قفسه سینه و کاهش کنتراست به‌دلیل پر شدن هوای آلوئول‌ها توسط مایعات یا بقایای سلولی، کلاپس آلوئول‌ها و افزایش ضخامت دیواره برونش‌ها و برونشیول‌ها مشاهده گردید. غالب درگیری‌ها در نواحی خلفی و پشتی ریه که در هر دو نمای عمود بر هم جانبی و شکمی-پشتی مشاهده می‌شدند.

علائم بالینی: الف) بررسی تعداد ضربان قلب، تنفس و درجه حرارت راست روده‌ای: همان‌طورکه در جدول ۳ مشاهده می‌شود ۲۴ ساعت پس از تزریق LPS افزایش مشخصی در تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و درجه حرارت راست روده‌ای در هر دو گروه (زمان صفر) به وجود آمد که نشان‌دهنده شکل‌گیری التهاب در ریه است. پس از سلول‌درمانی در گروه تیمار از ساعت ۶ روند کاهشی در تعداد ضربان قلب مشاهده شد. این کاهش در تعداد ضربان قلب در روزهای ۱، ۲ و ۳ نسبت به زمان صفر و در مقایسه با زمان‌های مشابه در گروه شاهد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

تعداد تنفس در گروه تیمار از ساعت ۳ پس از تجویز سلول‌های بنیادی روند کاهشی را نشان داد. این کاهش در ساعت ۱۲و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. تغییرات تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و دمای راست روده‌ای گوسفند (میانگین±انحراف معیار) در زمان‌های مختلف قبل و بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان/PBS در گروه‌های تیمار و شاهد. * تغییرات معنی‌دار نسبت به زمان صفر در همان گروه. # تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه شاهد در همان زمان.

گروه	زمان (ساعت)	-۲۴	۰	۳	۶	۱۲	۲۴ (روز اول)	۴۸ (روز دوم)	۷۲ (روز سوم)	۱۶۸ (روز هفتم)
تعداد ضربان در دقیقه قلب	تیمار	*۸۶/۴±۴/۳	۱۰۹/۴±۳/۲۸	۱۱۰/۰±۱۱/۸۳	۱۰۴/۲±۱۲/۱۳	۱۰۰/۸±۱۱/۲۱	#*۹۵/۰۰±۱/۵۸	#*۹۲/۶±۲/۵۰	#*۹۲/۶۰±۴/۰۳	۹۱/۶±۶/۳۴
	شاهد	*۸۵/۸±۲/۱۶	۱۰۷/۸±۴/۶۰	۱۱۰/۲±۵/۵۸	۱۱۰/۴±۶/۲۲	۱۰۷/۲±۵/۸۹	۱۰۷/۸±۴۰/۶۰	۱۰۶/۴±۵/۳۱	۱۰۲/۸±۹/۵۴	۱۰۴/۰±۴/۴۷
تعداد تنفس در دقیقه	تیمار	*۲۲/۶±۱/۸۱	۴۲/۶±۵/۶۸	۴۱/۰±۵/۰۹	۳۸/۲±۹/۰۹	*۳۶/۰±۴/۸۴	#*۳۵/۲±۴/۴۳	#*۳۱/۲±۴/۲۰	#*۲۹/۰±۳/۹۳	#*۲۵/۰۰ ±۳/۰۸
	شاهد	*۲۲/۲±۲/۱۶	۴۱/۲±۳/۲۷	۴۰/۶±۳/۲۸	۴۱/۴±۳/۷۸	۴۲/۴±۲/۳۰	۴۱/۸±۷/۵۲	۳۹/۴±۱/۵۱	۳۷/۰±۱/۵۸	۳۴/۸±۵/۷۱
دمای راست روده‌ای (oC)	تیمار	*۳۹/۱۶±.۲	۴۰/۱۰±.۱۴	۴۰/۰۶±.۱۶	۳۹/۸۸±.۲۵	*۳۹/۶۴±.۲۴	#*۳۹/۴۸±.۰۴	#*۳۹/۳۸±.۲۰	#*۳۹/۲۸±.۲۶	#*۳۹/۲۲±.۲۲
	شاهد	*۳۹/۱±.۱۵	۴۰/۰۶±.۲۰	۴۰/۰۸±.۲۵	۴۰/۱۴±.۱۶	۴۰/۰۸±.۱۶	۴۰/۰۲±.۵۱	۴۰/۰۸±.۱۰	۳۹/۹۴±.۰۸	۳۹/۸±.۰۷

نسبت به زمان صفر معنی‌دار بود که میزان ($p<۰/۰۵$) بود. همچنین نتایج مقایسه بین دو گروه در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

همانطور که از جدول ۲ مشاهده می‌شود ۳ ساعت پس از شروع سلول‌درمانی کاهش دما آغاز شده است. بطوریکه این کاهش دما تا انتهای مطالعه ادامه داشته تا اینکه به سطح پایه برگشته است. این کاهش دمای راست روده در ساعت ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ در مقایسه با زمان صفر معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). بررسی آماری بین دو گروه نیز حاکی از معنی‌داری در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ بود ($p<۰/۰۵$).

بنابراین نتایج تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و درجه حرارت راست روده‌ای در گروه تیمار نشان‌دهنده تأثیری گذاری بسیار مناسب سلول-های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در کاهش این علائم در مدل تجربی ARDS است. همچنین لازم به ذکر است مقایسه آماری داده-های ضربان قلب، تنفس و دمای راست روده‌ای در گروه شاهد در زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، که این بیان کننده بی اثر بودن PBS در کاهش این سه علامت بالینی در گوسفندهای مبتلا به التهاب حاد ریه است.

ب) بررسی صداهای تنفسی، سرفه، اشتها، ترشحات بینی، مخاطات و وضعیت جسمانی: در معاینات بالینی گوسفندها، قبل از شروع مطالعه در هر دو گروه تیمار و شاهد، صداهای ریوی، اشتها، مخاطات و وضعیت جسمانی طبیعی بودند و سرفه و ترشحات بینی وجود نداشت و تمامی علائم دارای میانه اسکور صفر بودند اما پس از تزریق LPS (زمان صفر) صداهای ریوی غیرطبیعی شدند که میانه اسکور در هر دو گروه ۳ بود. همچنین در زمان صفر، تغییر در اشتها، خروج ترشحات از بینی و سرفه در هر دو گروه رخ داد. بطوریکه میانه اسکور برای آن‌ها در هر دو گروه ۲ بود. تغییر رنگ مخاطات و غیر طبیعی شدن وضعیت جسمانی در هر دو گروه در زمان صفر دارای میانه اسکور یک بودند.

۲۴ ساعت بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تغییرات در صداهای ریوی به تدریج کاهش یافت بطوریکه دو روز بعد از پیوند سلول‌ها، صداهای ریوی طبیعی (همانند زمان ۲۴-) و با میانه اسکور صفر بودند و مقایسه آماری نیز نشان داد در گروه تیمار در روزهای ۳ و ۷ نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

بهبودی در اشتهای گوسفندها در گروه تیمار از ساعت ۶ با میانه اسکور ۱ آغاز شد، بطوریکه در روز سه اشتها کاملاً طبیعی با میانه اسکور صفر بود. مقایسه نتایج بین دو گروه نیز حکایت از حضور ارتباطی معنی‌دار در ساعت ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ داشت ($p<۰/۰۵$).

در گروه تیمار ۲۴ ساعت پس از تزریق سلول‌های بنیادی روند کاهشی در ترشحات بینی با میانه اسکور ۲ آغاز شد، بطوریکه پس از یک هفته از پیوند سلول‌ها ترشحاتی از بینی وجود نداشت (همانند زمان ۲۴-) و میانه اسکور صفر بود. مقایسه نتایج بین دو گروه نیز در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

بررسی نتایج سرفه نیز نشان داد در گروه تیمار از روز دوم کاهش در تعداد سرفه با میانه اسکور ۲ رخ داده است تا اینکه در روز هفتم سرفه‌ای حتی با تحریک رفلکس وجود نداشت و میانه اسکور صفر بود. مقایسه آماری نیز نشان داد در گروه تیمار در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

در گروه تیمار شدت پرخونی ناشی از التهاب، ۴۸ساعت پس از زمان پیوند سلول‌های بنیادی با میانه اسکور ۱ روند کاهشی را نشان داد و در ساعت ۷۲ به حالت قبل از ایجاد التهاب (زمان ۲۴-) با میانه اسکور صفر بازگشت و در ساعات ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۱۶۸ تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p<۰/۰۵$).

همچنین سلول درمانی در گروه تیمار سبب شد تا ۴۸ساعت بعد از پیوند این سلول‌ها به تدریج رفتار عمومی و وضعیت جسمانی گوسفندها با میانه اسکور ۱ به حالت طبیعی برگردد و در روز سوم درمان کاملاً هوشیاری اولیه خود را بدست آوردند که میانه اسکور صفر بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز نشانگر بازگشت معنی‌دار هوشیاری گوسفندها در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ در

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه با گروه شاهد بود ($p<0/05$).

این درحالی است که در گروه شاهد صداهای ریه و ترشحات بینی تا روز هفتم غیر طبیعی بودند و میانه اسکور برای آن‌ها ۳بود، وضعیت غیرطبیعی مخاطات و جسمانی گوسفندها و همچنین سرفه تا آخر مطالعه ادامه داشت و از روز سوم به بعد کاهش مختصری در وضعیت این علائم مشاهده شد بطوریکه در پایان روز هفتم میانه اسکور ۲ بود. در مورد وضعیت اشتهای گوسفندها در گروه کنترل نیز باید گفت اشتهای آن‌ها هیچگاه به حالت قبل از التهاب (زمان ۲۴-) برنگشت و در میانه اسکور ۱ باقی ماند.

این نتایج به خوبی نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (گروه تیمار) برخلاف PBS (گروه شاهد) تأثیر بسیار مثبتی در بهبود علائم بالینی مرتبط با ARDS داشته‌اند.

بحث

بیماری‌های ریوی یک از عوامل اصلی مرگ و میر در انسان و دام هستند و درمان‌های دارویی فعلی در بسیاری از بیماری‌های ریوی تأثیرگذاری لازم را ندارند (۱۲). در سندرم زجر تنفس حاد (ARDS) درمان دارویی ویژه‌ای وجود ندارد و درمان‌های موجود رویکرد حمایتی دارند. لذا دستیابی به روش‌های درمانی جدید مانند درمان با سلول‌های بنیادی که مطالعه حاضر نیز بر همین اساس پایه‌ریزی شد می‌تواند راه‌حل مناسبی برای درمان این سندرم و دیگر بیماری‌های ریوی باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان در مدل تجربی ARDS درگوسفند به خوبی تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و دمای بدن را بعد از التهاب کاهش می‌دهد و به سطح پایه بر می‌گرداند. همچنین پیوند این سلول‌ها سبب شد تغییراتی که در صداهای تنفسی، اشتها، مخاطات، وضعیت جسمانی، وقوع سرفه و خروج ترشحات بینی در اثر التهاب ریه ایجاد شده بود، بهبود یافته و به وضعیت قبل از التهاب (زمان ۲۴-) بازگردند. مطالعاتی که محققین در این ارتباط انجام داده‌اند، موید این مطلب است که استراتژی جدید درمانی به کمک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند سبب کاهش قابل توجه در التهاب حاد ریه ناشی از تزریق LPS شود (۱۰).

تاکنون مطالعات کمی بر روی مدل حیوانی بزرگ مثل گوسفند صورت گرفته است (۳) و مشابه مطالعه حاضر که بصورت بالینی و پیوند اتولوگ انجام گرفته است، تاکنون مطالعه‌ای گزارش نشده است. مطالعات پیش بالینی در مدل حیوانی بزرگ دارای کارایی بهتری در مقایسه با جوندگان کوچک دارد (۱۱). تعدای از محققین بیان کرده‌اند با توجه به ویژگی‌های مدل حیوانی بزرگ (مانند گوسفند) از جمله تبادلات گازی، مانیتورینگ همودینامیک و پذیرفتن تهویه با فشار مثبت مشابه بیماران مبتلا به سندرم دیسترس تنفسی حاد می‌توان از این مدل حیوانی برای مقایسه با بیماران سندرم دیسترس تنفسی حاد انسانی استفاده مناسب کرد که بسیاری از این ویژگی‌ها را نمی‌توان به سادگی در مدل حیوانی کوچک ایجاد کرد (۳).

Rojas و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که پیوند آلوژن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به روش داخل نایی به مدل تجربی ARDS ایجاد شده با LPS باکتری ایکلای در گوسفند شدت التهاب را کاهش می‌دهد. آن‌ها همچنین بیان کردند که پیوند سلول‌های بنیادی به روش داخل نایی، فاکتورهای همودینامیکی افزایش یافته در نتیجه التهاب را کاهش می‌دهند و در مطالعه حاضر که پیوند بصورت اتولوگ انجام گرفت سلول‌های بنیادی در روزهای ۱، ۲ و ۳ سبب کاهش معنی‌دار در تعداد ضربان قلب نسبت به گروه شاهد شد (۱۸).

در مطالعه دیگری محققین نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به روش داخل وریدی شدت التهاب حاد ریه در مدل گوسفندی که بصورت تجربی دچار پنومونی باکتریایی شده بودند را کاهش می‌دهد. آن‌ها همچنین بیان کردند که پیوند سلول‌های بنیادی سبب کاهش معنی‌دار در تعداد ضربان قلب در مقایسه با گروه شاهد بعد از ۲۴ ساعت می‌شود (۳) که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که نشان داد ۶ ساعت پس از پیوند سلول روند کاهشی در تعداد ضربان قلب رخ می‌دهد بطوریکه این کاهش در روزهای ۱، ۲ و ۳ پس از پیوند سلول معنی‌دار بوده است، همخوانی دارد.

با توجه به ماهیت چندقوه‌ای طبیعی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و توانایی آن‌ها برای ترشح عوامل پاراکرین مختلف از قبیل عوامل رشد، فاکتورهای تنظیم کننده نفوذپذیری اندوتلیال و اپیتلیال و سیتوکین‌های ضد التهابی می‌توانند در درمان اختلالات عمده‌ای که زمینه ساز بروز ARDS هستند، مؤثر باشند (۹). حفظ یکپارچگی اندوتلیوم عروق کوچک ریوی برای جلوگیری از نشت مایعات غنی از پروتئین از پلاسما و همچنین سلول‌های التهابی ضروری است تا از وقوع ادم آلوئولی جلوگیری شود. یکی از مکانیسم‌های اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اثرات مؤثر آن‌ها بر روی اندوتلیوم آسیب دیده است. فاکتورهای متعدد پاراکرینی تولید شده توسط این سلول‌ها مثل آنژیوپویتین ۱ و عامل رشد کراتینوسیت ((KGF) Keratinocyte Growth Factor) بصورت بالقوه بر روی اندوتلیوم آسیب دیده نقش دارند (۸). آنژیوپویتین ۱ پیش ماده‌ای برای گیرنده Tei۲ اندوتلیال است که به عنوان محافظت کننده اندوتلیوم و عامل تثبیت کننده عروقی عمل کرده و نفوذپذیری اندوتلیال را کاهش می‌دهد و مانع چسبندگی لکوسیت‌ها به اندوتلیوم و فعل و انفعالات متعاقب آن می‌شوند (۱۵).

در مطالعات دیگر به جهت اینکه بر روی مدل‌های حیوانی کوچک انجام گرفته است وضعیت علایم بالینی مورد توجه قرار نگرفته بود. از این رو به ذکر مواردی که آن‌ها بررسی کرده اند پرداخته می‌شود.

در مطالعه‌ای محققین بیان کردند تجویز هر دو نوع سیستمیک و داخل ریوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان علی‌رغم

www.SID.ir

Archive of SID

حداقل پیوند سلول‌های بنیادی در ریه منجر به کاهش مرگ‌ومیر، التهاب و بهبود کلیرانس مایع آلوئولی می‌شـود. در تجویز سیستمیک سلول‌ها در مویرگ‌های ریوی به دام می‌افتند و اثرات خود را نمایان می‌کنند (۱۷). اما با این حال تجویز داخل نایی سلول‌های مزانشیمی انسانی را در التهاب ریوی ایجاد شده با باکتری ایشریشیا کُلای در رت نسبت به تجویز داخل وریدی آن ارجح دانستند (۴).

Gupta و همکاران در سـال ۲۰۱۲، چهار ساعت بعد از ایجاد التهاب ریه توسـط LPS باکتری *E.Coli* در موش، آن‌ها را از طریق پیوند داخل نایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز اسـتخوان تحت درمان قرار دادند. درصد بهبود گروه درمان در مقایسـه با گروه شـاهد که تنها PBS دریافت کرده بودند به ترتیب ۸۰٪ در مقابل ۴۲٪ پس از ۴۸ ساعت و ۶۴٪ در مقابل ۱۸٪ بعد از ۷۲ سـاعت گزارش شـد. آن‌ها بیان کردند سلول‌های بنیادی مزانشیمی شدت آسیب ریه را از طریق کاهش نفوذ مایعات به ریه و کاهش غلظت پروتئین در مایعات برونکوآلوئولار محدود کرده است (۶).

در مطالعه‌ای پژوهشگران بیان کردند که استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشـیمی مغز اسـتخوان بصورت داخـل وریدی سـبب کاهش التهاب ریه و حفظ یکپارچگی غشـاء مویرگی-آلوئولی در موش می‌شـوند. آن‌ها نشـان دادند که میزان سـلول‌های التهابی (خصوصاً نوتروفیل‌ها)، میزان سـایتوکین‌ها (IFN-γ، TNF-α و IL۶) و همچنیـن میزان پروتئین تام، آلبومین و IgM در مایعات لاواژ شده از ریه کاهش یافته است (۱۰).

Xu و همکاران در سال ۲۰۱۱، LPS را بصورت داخل صفاقی در موش تزریق کردند و یک سـاعت بعد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان را بصورت داخل وریدی پیوند زدند. نتایج آن‌ها نشان داد که پیوند این سـلول‌ها سبب کاهش التهاب و ادم ریه می-شوند. بطوریکه سلول‌های التهابی هم بصورت سیستمیک و هم بصورت موضعی کاهش یافته بودند. آن‌ها همچنین نشان دادند که غلظت سرمی IFN-γ، IL۱β و MIP بعد از پیوند سلول‌های بنیادی کاهش می‌یابند. بررسی هیستولوژی نیز کاهش چشمگیر نوتروفیل‌های ریه را در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پیوند سلول نشان داد (۲۴).

همچنین Krasnodembskaya و همکاران در سـال ۲۰۱۰، نشان دادند که ۴ سـاعت بعد از ایجاد مدل پنومونی ناشـی از *E.Coli* در موش، پیوند سـلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به روش داخل نایی سـبب کاهش قابل ملاحظـه‌ای در التهاب ریه (از طریق ارزیابی تعداد نوتروفیل‌های مایع برونکوآلوئولار ریه) می‌شود (۷).

محققیـن در مطالعـه‌ای، از طریـق تزریـق LPS باکتـری ایکلای در موش، التهاب ریه ایجاد و نشـان دادند اسـتفاده ازسـلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش داخل وریدی از طریق ترشح آنژیوپوئتین و عامل رشد کراتینوسیت، موجب بازیابی نفوذپذیری اندوتلیال عروق آلوئولی می‌شوند (۱۰). سـلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان همچنین با ترشح آنتاگونیسـت گیرنده IL-۱ سبب کاهش تجمع کلاژن، فیبروز و متالوپروتئیناز ماتریکس زمینه‌ای می‌شوند (۱۴).

بطور کلی نتایج مطالعات انجام گرفته بر روی حیوانات آزمایشـگاهی نشان‌دهنده تأثیر مناسب سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی التهاب ریه بوده بطوریکه پیوند این سلول‌ها از پیشرفت التهاب جلوگیری کرده و سبب بهبودی در بافت ریه شده‌اند. در مطالعه حاضر نیز بررسی علائم بالینی بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مدل تجربی ARDS در گوسـفند نشان داد که پیوند این سـلول‌ها سبب بهبودی قابل توجه در علائم بالینی می‌شوند که می‌توان گفت نتیجه کاهش التهاب ریه و بهبودی در بافت ریه است.

نتیجه‌گیـری: آنچه از مطالعـه حاضر می‌توان به آن اشـاره نمود آن است که در روند جلوگیری از پیشرفت التهاب تجربی بوسیله LPS باکتری ایکلای، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نقش مؤثری دارند، بطوریکه پیوند داخل نایی این سلول‌ها در گوسفند مبتلا به ARDS تجربی سـبب بهبودی معنی‌دار در علایم بالینی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، صداهای تنفسی، وقوع سرفه، پرخونی مخاطات، ترشـحات غیر طبیعی از بینی، اشتها و وضعیت جسمانی شد و این علائم همگی در گروه تیمار به حالت قبل از ایجاد التهاب بازگشتند. بنابراین این مطالعه نشـان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز اسـتخوان می‌توانند در روند درمان و بهبودی ARDS مؤثر باشـند، اگرچه مطالعات بیشتری در این زمینه باید انجام شود تا بتوان روش درمان با سـلول‌های بنیادی را به یک روش روتیـن در درمان بیماری‌های ریوی توصیه کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری صمیمانه کارکنان موسسه تحقیقاتی امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Amrine, D. E., White, B. J., Larson, R., Anderson, D. E., Mosier, D. A., Cernicchiaro, N. (2013) Precision and accuracy of clinical illness scores, compared with pulmonary consolidation scores, in Holstein calves with experimentally induced Mycoplasma bovis pneumonia. Am J Vet Res. 74: 310-315.
2. Abraham, E. (2003) Neutrophils and acute lung injury. Crit Care Med. 31: S195-S199.
3. Asmussen, S., Ito, H., Traber, D. L., Lee, J. W., Cox, R. A., Hawkins, H. K., Enkhbaatar, P.

www.SID.ir

Archive of SID

(2014) Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. Thorax. 69: 819-825.

4. Devaney, J., Horie, S., Masterson, C., Elliman, S., Barry, F., O'Brien, T., Laffey, J. G. (2015) Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by E. coli in the rat. Thorax.70: 1468-3296.
5. Doyonnas, R., LaBarge, M. A., Sacco, A., Charlton, C., Blau, H. M. (2004) Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 13507-12.
6. Gupta, N., Su, X., Popov, B., Lee, J. W., Serikov, V., Matthay, M. A. (2012) Intra-pulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. J Immunol. 179: 1855-1563.
7. Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J. W., Matthay, M. A. (2010) Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. Stem Cells. 28: 2229-2238.
8. Kwak, H. J., So, J. N., Lee, S. J., Kim, I., Koh, G. Y. (1999) Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. FEBS Lett. 448: 249-253.
9. Lee, J. W., Fang X. Fau., Gupta, N., Serikov, V., Matthay, M. A. (2009) Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. Proc Natl Acad Sci USA. 106: 16357-16362.
10. Mei, S. H. J., McCarter, S. D., Deng, Y., Parker, C. H., Liles, W. C., Stewart, D. J. (2007) Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. PLoS Med. 4: 1525-1537.
11. Moodley, Y., Sturm, M., Shaw, K., Shimbori, C., Tan, D. B., Kolb, M., Graham, R. (2016) Human mesenchymal stem cells attenuate early damage in a ventilated pig model of acute lung injury. Stem Cell Res. 17: 25-31.
12. Mokhber Dezfouli, M. R., Sadeghian Chaleshtori, S., Dehghan, M. M., Tavanaeimanesh, H., Baharvand, H., Tahamtani, Y. (2017) The therapeutic potential of differentiated lung cells from embryonic stem cells in lung diseases. Cur Stem Cell Res & Ther. 12: 80-84.
13. Mokhber Dezfouli, M. R., Lotfollahzadeh, S., Heidari Sureshjani, M., Dehghan, M. M., Nikbakht, Gh. R., Eftekhari, Z., Tavanaeimanesh, H., Sadeghian Chaleshtori, S., Jani, M., Arab Yarmohammadi, M. (2017) Changes in clinical signs after treatment in calves with experimental colisepticemia with *Escherichia coli*. J Vet Res. 72: 63-71.
14. Ortiz, L., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A. C., Torres, G., Go, K., Phinney, D. G. (2007) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. Proc Natl Acad Sci USA. 104: 11002-11007.
15. Pizurki, L., Zhou, Z., Glynos, K., Roussos, C., Papapetropoulos, A. (2003) Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. Br J Pharmacol. 139: 329-336
16. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. (2007) Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. (10th ed.) Elsevier Health Sciences, Philadelphia, USA. p. 847-89.
17. Rojas, M., Xu J., Woods, C. R., Mora, A. L., Spears, W., Roman, J., Brigham, K. L. (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 33: 1445-152.
18. Mauricio, R., Nayra, C., Ergin, K., John, R. T., Eder, C., Robert, D., Anthony, T., Christian, B. (2014) Human adult bone marrow-derived stem cells decrease severity of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in sheep . Stem Cell Res & Ther. 5: 42-55.
19. Rubenfeld, G. D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D. P., Neff, M., Hudson, L. D. (2005) Incidence and outcomes of acute lung injury. New England Journal of Medicine. 353:

www.SID.ir

Archive of SID

1685-1693.

20. Sadeghian Chaleshtori, S., Mokhber Dezfouli, M. R., Dehghan, M. M., Tavanaeimanesh, H. (2016) Generation of Lung and Airway Epithelial Cells from Embryonic Stem Cells In Vitro. Criti Rev in Eukar Gene Expr. 26: 1-9.
21. Tagami, T., Kushimoto, S., Tosa, R., Omura, M., Yonezawa, K., Akiyama, G., Hirama, H., Yokota, H. (2011) Plasma neutrophil elastase correlates with pulmonary vascular permeability: a prospective observational study in patients with pneumonia. Respiro. 16: 953-958.
22. Volk, S. W., Theoret, C. (2013) Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. ound Repa Regen. 21: 382-394.
23. Xu, J., Woods, C., Mora, A. L., Mora, A., Joodi, R., Brigham, K. L., Iyer, S., Rojas, M. (2007) Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. Ame J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 293: 131-141.

www.SID.ir

Archive of SID

Improvement of Clinical Signs in Experimental Model of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) in Sheep Following Autograft of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs)

Abbasi, J.[1], Mokhber Dezfouli, M.R.[1,3], Sadeghian Chaleshtori, S.[1,3*], Dehghan, M.M.[2,3], Vajhi, A.[2,3], Baharvand, H.[4,5], Ghanei, M.[6], Jabari Fakhr, M.[7,3]

[1]Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]Department of Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[3]Institute of Biomedical Research, University of Tehran, Tehran, Iran
[4]Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
[5]Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran.
[6]Health Management Research Centre, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[7]Graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
(Received 29 November 2017, Accepted 26 February 2018)

Abstract:

BACKGROUND: ARDS is a lung disorder that causes death in human and livestock and new therapeutic approaches such as stem cell therapy are essential because of lack of specific drug therapies for it. **OBJECTIVES:** Evaluation of the therapeutic effects of intrapulmonary transplantation of BM-MSCs to improve clinical signs in experimental model of ARDS created by lipopolysaccharide(LPS) *E.Coli* strains-O55:B5 in sheep is the aim of this study. **METHODS:** In this study, 10 male sheep 3-4 months old were used after random placement into two groups, treatment and control. Of sheep in the treatment group, after anesthesia with ketamine and xylazine bone marrow samples were collected and in the clean room BM-MSCs were isolated, amplified and were identified with the evaluation of surface markers. Then experimental model of ARDS was induced by endotracheal injection of LPS at dose of 400 µg/kg. Clinical signs and radiograph images were performed before and 24 hours after injection of LPS. After confirming inflammation, the sheep were anesthetized and on sternal position 50×10^6 cells of BM-MSCs third passage were transferred in treatment group as autograft by the catheter lavage in the bifurcation of the trachea and PBS in control group. Then clinical signs were recorded at 3, 6 and 12h and on days 1, 2, 3 and 7 in both groups, and finally were analyzed based on the scored system. **RESULTS:** The data showed transplantation of BM-MSCs caused significant improvement in clinical signs including heart rate, respiratory rate, body temperature, respiratory sounds, cough, mucosal status, nasal secretions, appetite and physical condition compared with control group. A significant decrease in respiratory rate and body temperature from 12 h and in heart rate from 24 h to next was begun. Also, changes in breathing sounds on the first day after transplantation, physical condition, mucous membranes and appetite on the third day, the occurrence of cough and abnormal discharge from the nose on the seventh day had returned to pre-inflammation (-24 time) and the median score was zero for them. **CONCLUSIONS:** This study showed that transplantation of BM-MSCs can improve and cause reduction in the severity of the clinical signs of ARDS, significantly.

Keyword: ARDS, BM-MSCs, clinical signs, stem cell therapy, sheep

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Conjugated antibodies used in flow cytometry to confirm bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs).

Table 2. Explain score for clinical signs of acute inflammation of the lungs in sheep.

Table 3. Changes in heart rate, respiration rate and rectal temperature of sheep (mean±SD) at various times before and after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells/PBS in groups of treatment and control.

***Corresponding author's email: s.sadeghian@ut.ac.ir, Tel: 021-61117000, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir