مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۸، آبان ۱۳۹۴
صفحه: ۷۲۶-۷۱۷

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Science
Vol. 23, No.8, Oct-Nov 2015
Pages: 717-726

# بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر کنترل قندخون در رت‌های دیابتی

علی مرادی[۱]، سارا محمدی[۲]، داریوش حمیدی علمداری[*۳]

**چکیده**

**مقدمه:** دیابت شیرین نوعی اختلال متابولیک به علت اختلال در ترشح انسولین تخریب سلول‌های بتا، بنا به دلایل خودایمن، نکروز و مقاومت به انسولین است. اخیراً استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یکی از روش‌های درمانی برای دیابت پیشنهاد شده است. سلول‌های بنیادی بافت چربی علت دسترسی آسان و نیز توان تکثیری بالا و رد ایمونولوژیک کمتر در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند.

**روش بررسی:** مطالعه از نوع تجربی-مداخله ای است. در این مطالعه سلول‌های بنیادی بافت چربی حاصل از عمل لیپوساکشن خالص‌سازی شده و پس از شمارش توسط لام نئوبار برای شناسایی و اثبات وجود سلول‌های بنیادی توسط فلوسایتومتری بررسی شدند. تعداد ۱۶ عدد رت نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰-۳۰۰ گرم توسط استرپتوزوسین با دوز ۶۰ mg/kg دیابتی شدند و بعد از آن به صورت تصادفی به دو گروه هشت‌تایی تقسیم شدند. گروه دیابتی کنترل تحت تیمار با نرمال سالین قرار گرفتند و گروه تحت درمان، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی به تعداد $۱.۵\times۱۰^{6}$ را دریافت کردند. برای بررسی بهبود عملکرد در طول ۲۵ روز پس از پیوند سلول‌ها هر روز یکبار قند خون رت‌ها توسط دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** بررسی نتایج حاصل از فلوسایتومتری حاکی از بیان درصد بالای ۲۹CD و ۹۰CD در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی بود. همچنین بررسی قند خون رت‌های دیابتیک در طی دوره درمان نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار($p=۰/۰۰۰۱$) قند خون در رت‌های گروه دریافت‌کننده سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با گروه کنترل داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده بعد از تایید سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی با استفاده از آنتی‌ژن‌های سطح سلولی و تزریق آن به رت‌های دیابتی به طور معنی‌داری قند خون را کاهش داد.

**واژه‌های کلیدی:** دیابت، سلول‌های بنیادی، بافت چربی، گلوکز

۱،۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و علوم تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۵۱۱۸۲۰۲۲۵۰۵ ، پست الکترونیکی: hamidiad@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

**مقدمه**

دیابت نوعی اختلال متابولیک است که در آن بدن توانایی استفاده از قند را از دست می‌دهد. این بیماری به علت اختلال در ترشح انسولین و یا مقاومت به ترشح انسولین به وجود می‌آید و در هر دو حالت موجب افزایش گلوکز خون(هیپرگلیسمی) و دفع گلوکز در ادرار(گلیکوزوری) می‌شود. سلول‌های بتای بالغ که در جزایر لانگرهانس پانکراس قرار دارند، مسؤول ترشح انسولین هستند(۱،۲). مکانیسم تخریب سلول‌های بتا در دیابت نوع ۱ نتیجه بیماری خودایمنی و خود التهابی می‌باشد. در دیابت نوع دو مانند دیابت نوع یک، دیده شده که کاهش جرم سلولی(سلول‌های بتا) وجود دارد(۳،۴). در مجموع دیابت نوع دو بیشتر به سبک زندگی فرد مرتبط می‌باشد(۵). البته بعضی محققین معتقدند که واکنش‌های ایمنی و التهابی در دیابت نوع دو نیز دخیل می‌باشند (۵). افراد دیابتی در دراز مدت دارای ناهنجاری‌هائی از قبیل نوروپاتی، نفروپاتی، رتینوپاتی و بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شوند.

حفظ توده سلول‌های بتای پانکراسی از تعادل بین نئوژنز، تکثیر و آپوپتوز ناشی می‌شود. شناسایی سلول‌های پیش‌ساز(بنیادی) پانکراسی و مکانیسم‌های کنترل‌کننده تمایز و تکثیر آنها از اهمیت زیادی برای توسعه روش‌های جدید در درمان دیابت برخوردار است. شواهد غیرمستقیم پیشنهاد می‌کنند که سلول‌های بتا پس از تولد، از سلول‌های بنیادی که اکثراً در مجرای پانکراس قرار دارند شکل می‌گیرند(۶). برخی دیگر از مطالعات عقیده دارند که سلول‌های بنیادی پانکراسی در مغز استخوان، طحال و یا درون جزایر لانگرهانس قرار دارند و تمایز این سلول‌ها باعث ایجاد سلول‌های بتا می‌گردد، همچنین نشان داده شده که سلول‌های متمایز بافت اگزوکرین و سلول‌های اندوکرینی(غیر بتا) نیز می‌توانند به سلول‌های بتا تمایز یابند(۷).

مرگ سلول‌های بتا که در هر دو نوع دیابت صورت می‌گیرد می‌تواند از طریق پیوند رفع گردد. پیوند بافت پانکراس ممکن است توسط سیستم ایمنی و یا خودایمنی رد شود. مشکل اصلی که در پیوند بافت و اندام با آن روبرو هستیم، کمبود افراد اهداکننده می‌باشد. در حال حاضر تدابیر گسترده‌ای برای درمان دیابت در حال بررسی و سرمایه‌گذاری است. این تدابیر به صورت زیر تقسیم‌بندی می‌شوند.

استفاده از انسولین، استفاده از جزایر لانگرهانس اگزوژن استخراج شده از پانکراس انسان و خوک که در برخی موارد به علت عفونت رتروویورسی قابل قبول نیست، القاء بیان انسولین در سلول‌های سوماتیک که دارای بعضی از خصوصیات سلول‌های بتا هستند. بنابراین، راه‌حل جدیدی مانند سلول‌درمانی برای درمان دیابت موردنیاز است و خود سلول‌های بتا، سلول‌های تمایزیافته(سلول‌های کبد، روده، طحال و...) و یا سلول‌های بنیادی می‌توانند در این زمینه مورد استفاده قرار گیرند(۸،۹).

در سال‌های اخیر از سلول‌های بنیادی برای جبران سلول‌های از دست رفته، استفاده می‌کنند. هر چند که این پژوهش‌ها چشم‌اندازهای وسیعی را در علم ایجاد نموده‌اند، اما همواره کاربرد آنها به صورت عملی با چالش‌هایی همراه بوده است. اما در این میان سلول‌درمانی و استفاده از سلول‌ها، به ویژه سلول‌های بنیادی برای ترمیم بافت‌های از دست رفته، نتایج مفیدی را در برداشته‌اند. به عنوان مثال در انسان، سلول‌های بنیادی مرانشیمی مشتق شده از بافت چربی، رشد سریع‌تری نسبت به سلول‌های بنیادی خون بندناف و استخوان دارند و همچنین توانایی تکثیری سلول‌های خون بندناف نسبت به سلول‌های مغز استخوان بیشتر است(۱۰،۱۱). بسیاری از مارکرهای بیان شده در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی، مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌باشند، که از آن جمله می‌توان به ژن‌های مرتبط با رگ‌زائی، ژن‌های دخیل در اتصالات سلولی، پروتئین‌های ماتریکس، فاکتورهای رشد و پروتئازها اشاره نمود البته باید ذکر نمود که بین آنها تفاوت‌هایی در بیان مارکرهای CD۴۹، CD۵۴، CD۳۴ و CD۱۰۶ مشاهده می‌شود. مهمترین امتیاز سلول‌های بنیادی بافت چربی این است که آنها را می‌توان به راحتی از بیماران به دست آورد و همچنین به سادگی کشت داد. تکثیر سریع، حفظ خصوصیات چندتوانی به مدت طولانی و بعد از چندین پاساژ و نشان می‌دهد که این سلول‌ها می‌توانند



Archive of SID
www.SID.ir

انتخاب مناسبی برای اهداف سلول‌درمانی باشند. البته هنوز احتمال تشکیل تراتوما در استفاده از این سلول‌ها وجود دارد. تکنیک‌های مورد استفاده برای تولید این سلول‌ها باید به دقت مورد مطالعه و بررسی قرار گیرند، تا بتوان سلول‌های ایمن و کارآمد، جهت درمان بیماری‌ها به دست آورد(۱۲،۱۳).

بنابر این هدف از این مطالعه استفاده از سلول‌های بنیادی است که بعد از تمایز به سلول‌های بتا در پانکراس قابلیت تولید انسولین و در نتیجه درمان دیابت را داشته باشند.

**روش بررسی**

جدا و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی بافت چربی:

قطعات چربی از ناحیه اطراف شکم بیماران مراجعه‌کننده به بخش جراحی جهت عمل لیپوساکشن گرفته شد. بافت موردنظر بعد از عمل لیپوساکشن درون محفظه استریل در دمای محیط به آزمایشگاه منتقل شد. بافت با PBS حاوی آنتی‌بیوتیک( پنی‌سیلین–استرپتومایسین) ( Sigma, USA) در چهار نوبت شستشو داده شد تا مطمئن شویم که خون از محلول خارج شده است. سپس برای جدا شدن سلول‌ها، بافت موردنظر توسط آنزیم کلاژناز -۱( Sigma, USA) به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت. بعد از این مرحله، فعالیت آنزیمی به سرعت خنثی و با دور ۵۰۰۰ RPM سانتریفیوژ و پلاک سلولی به دست آمد. گلبول‌های قرمز موجود با محلول بافر لیزکننده تریس( Merck, Germany) حذف شدند. سلول‌های به دست آمده برای شمارش و تزریق به مدل حیوانی و بررسی با فلوسایتومتری استفاده گردیدند(۱۱،۱۲،۱۴).

شمارش سلول‌های بنیادی بافت چربی:

برای شمارش سلولی، به ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS اضافه شد، سپس با استفاده از لام نئوبار و با بزرگنمایی ۲۰ تعداد سلول‌ها شمارش شد. میانگین اعداد حاصل در فرمول زیر که نشان‌دهنده تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر(Cell/mL) سوسپانسیون سلولی است قرار داده شد و در نهایت تعداد کل سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی محاسبه گردید.

*تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر = میانگین سلول‌های شمارش‌شده در چهار مربع × فاکتور رقت × $10^4$*

*تعداد کل سلول‌ها در محلول سلولی = تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر × حجم کل سوسپانسیون سلولی*

شناسایی و اثبات وجود سلول‌های بنیادی بافت چربی با تکنیک فلوسایتومتری:

با جداسازی سلول‌های بافت چربی حال باید از وجود سلول‌های بنیادی اطمینان حاصل کرد. به این منظور پس از تخلیص و جداسازی سلول‌ها، جهت تعیین نوع مارکرهای موجود در سطح سلول‌های بنیادی، با آنتی‌بادی‌های اولیه نشان‌دار شده با ماده فلورسنت سلول‌ها انکوبه شدند.

برای تعیین ویژگی فنوتیپ سلول‌های بنیادی بافت چربی، میزان بیان شاخص‌های سطح سلولی $CD_{29}$ و $CD_{90}$ در این سلول‌ها ارزیابی شد. به این منظور lμ ۱۰۰ از سوسپانسیون سلولی داخل میکروتیوپ ریخته و با ۴ میلی‌لیتر PBS شستشو گردید سپس با دور g ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به سلول‌ها ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی موشی بر ضد $CD_{29}$ انسانی حاوی رنگ ایزوتیوسیانید فلئورسین(Invitrogen, USA) (FITC: Fluorescein Isothiocyanate Isomer I) و $CD_{90}$ انسانی حاوی رنگ فیکواریتین(Invitrogen, USA) (RPE: R.Phy Coerythrin) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و با پارافر مالدهید ۱٪ فیکس گردیدند(۱۵،۱۶). در نهایت، ارزیابی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری در دو کانال ۱FL برای FITC و ۲FL برای PE انجام شد. آنالیز داده‌ها و رسم گراف‌ها با استفاده از نرم‌افزار WinMDI ۲/۸ و مقایسه آنتی‌بادی هر گیرنده سلولی با ایزوتیپ کنترل هم‌رنگ خود انجام گردید.

پرورش و نگهداری حیوانات:

در این مطالعه از رت‌های صحرائی نر بالغ با وزن حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. رت‌های صحرایی از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد تهیه شدند. حیوانات همگی در شرایط استاندارد حیوان خانه‌ای ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی دسترسی کافی به آب و غذا و دمای ۱±۲۵ درجه



Archive of SID
www.SID.ir

سانتی‌گراد و در هر قفس ۴ حیوان در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی مشهد نگهداری شدند.

گروه‌بندی حیوانات:

برای انجام این مطالعه، رت‌ها در دو گروه ۸ تائی یک گروه کنترل تحت درمان با نرمال سالین و گروه دیگر رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین و درمان‌شده با سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی در نظر گرفته شدند.

ایجاد مدل حیوانی دیابت:

جهت القای دیابت در رت‌ها، استرپتوزوتوسین (Stereptozotocin) (Enzolife sciences, USA) با دوز ۶۰mg/kg به صورت داخل صفاقی(IP) به حیوان تزریق شد. STZ در سرم فیزیولوژی سرد حل شده و به صورت تازه استفاده شد. تزریق دارو باید سریع و حجم تزریق خیلی زیاد نباشد

(۰/۳ سی‌سی برای هر رت).۷۲ ساعت بعد از القای دیابت از دم حیوان خون‌گیری شد. میزان قند خون با دستگاه گلوکومتر Bionime GM300 series, USA اندازه‌گیری شد. حیوان با قند خون ناشتای بیشتر از ۲۵۰ mg/dl دیابتی تلقی گردید.

پیوند سلول‌ها به حیوانات دیابتی شده:

پس از القاء بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰٪ و با دوز ۵۰mg/kg و زایلازین ۲٪ با دوز ۱۰ mg/kg دم موش را به مدت یک دقیقه در آب گرم نگه داشته تا عروق دم متسع شوند و بدین‌سان سیاهرگ دمی نمایان شود. سپس به کمک سرنگ انسولینی 5/. ml PBS حاوی $۱/۵\times۱۰^{6}$ عدد سلول بنیادی استخراج شده از بافت چربی به سیاهرگ دم رت‌های دیابتی گروه تزریق گردید، ۰/۵ ml نرمال سالین هم به رت‌های دیابتی گروه کنترل تزریق شد.

ارزیابی بهبود عملکردی:

بعد از پیوند سلولی، هر ۵ روز یک‌بار به مدت ۲۵ روز، سطح گلوکز خون رت‌های هر ۲ گروه اندازه‌گیری شد. برای این منظور حیواناتی که از شب پیش ناشتا نگه داشته شده بودند با لانست زدن مستقیم روی دم حیوان یک قطره خون روی نوار مخصوص دستگاه گلوکومتر(Bionime) قرار داده شد. به این ترتیب میزان قند خون ناشتا(FBS) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل یافته‌های مربوط به مطالعه و بررسی آماری تحلیل‌های آماری برای مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز آزمون‌های واریانس یک‌طرفه آزمون تعقیبی توکی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ انجام گرفت. نتایج به صورت انحراف معیار ± متوسط نشان داده شده‌اند. از لحاظ آماری مقادیر $p<۰/۰۵$ به عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

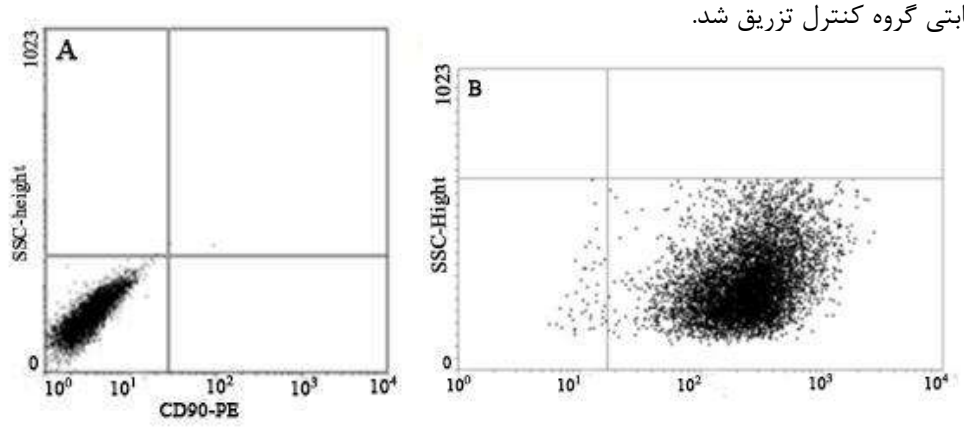
## نتایج

بررسی نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی:

در این مطالعه بعد از استخراج سلول‌های بنیادی بافت چربی، جهت تایید این سلول‌ها، درصد بیان گیرنده‌های سطحی سلول‌های بنیادی استرومایی مشتق از بافت چربی($CD_{29}$) و ($CD_{90}$) با استفاده از فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

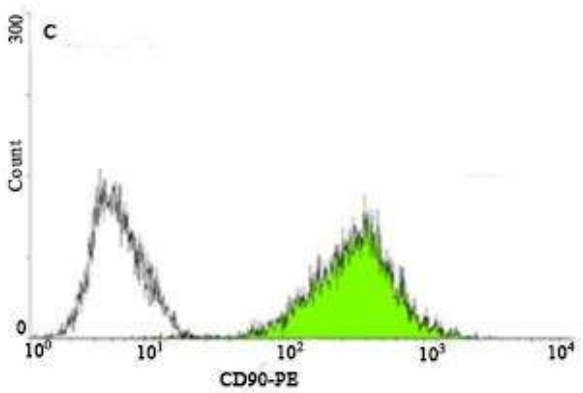
بررسی بیان گیرنده سطحی $CD_{90}$ کونژوگه با RPE (R.Phy Coerythrin):

بررسی فلوسیتومتری نمونه‌های گرفته شده از بافت نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی گیرنده سطحی $CD_{90}$ را به طور معنی‌داری بیان کرده است(شکل ۱).





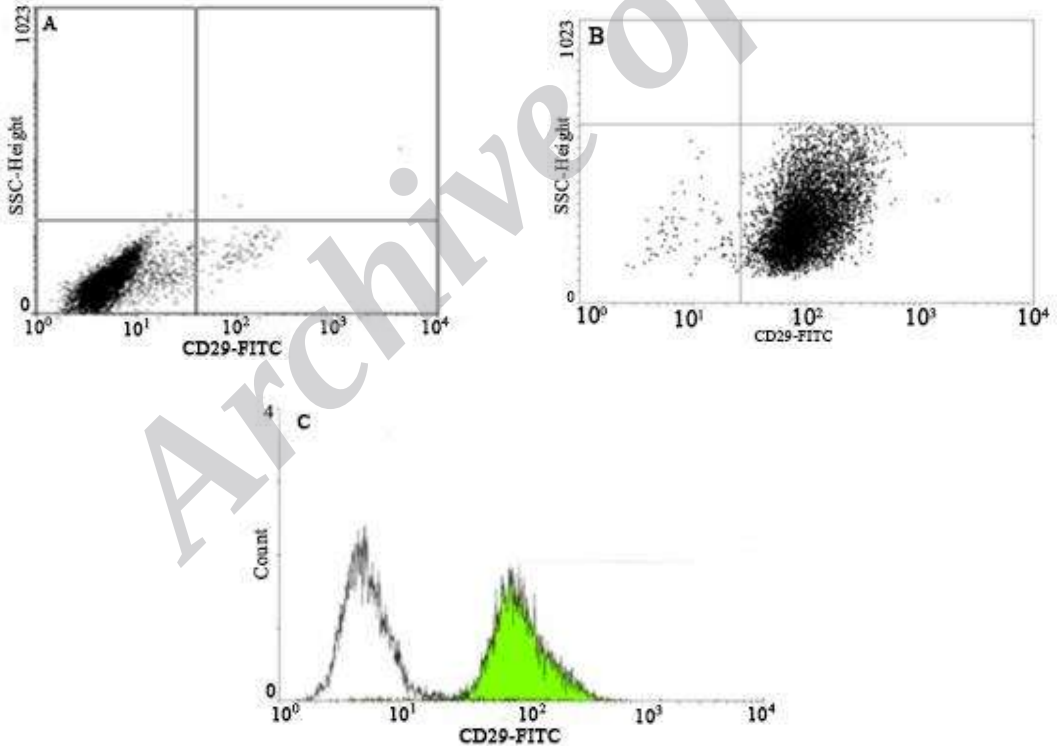

Archive of SID
www.SID.ir




شکل ۱: نتایج بررسی گیرنده $CD_{90}$ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

A: نمودار نقطه‌ای سلول‌های معین‌شده که نشان‌دهنده پراکندگی بالای آنها در مربع پایین و چپ است(گروه کنترل). B: نمودار نقطه‌ای سلول‌های معین شده که نشان‌دهنده پراکندگی بالای(۹۹/۳٪) آنها در مربع پایین و راست است. C: هیستوگرام مقایسه تمایل به راست کاملاً واضح سلول‌های بیان‌کننده سلولی $CD_{90}$ با سلول‌های گروه کنترل

بررسی بیان گیرنده سطحی $CD_{29}$ کونژوگه با FITC (Fluorescein Isothiocyanate) بررسی فلوسیتومتری نمونه‌های گرفته شده از بافت نشـــان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی گیرنده سطحی $CD_{29}$ را به طور معنی‌داری بیان کرده است شکل ۲.




شکل ۲: نتایج بررسی بیان گیرنده $CD_{29}$ توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

A نمودار نقطه ای سلول های معین شده که نشاندهنده پراکندگی بالای آنها در مربع پایین و چپ است (گروه کنترل). B: نمودار نقطه‌ای سلول‌های معین شده(گیت شده) که نشان‌دهنده پراکندگی بالای(۹۸/۵۲٪) آنها در مربع پایین و راست است. C : هیستوگرام مقایسه تمایل به راست کاملاً واضح سلول های بیان‌کننده گیرنده سلولی $CD_{29}$ با سلول‌های گروه کنترل

Archive of SID



www.SID.ir

بررسی میزان قند خون:

برای بررسی نتایج حاصل از تزریق سلول‌های بنیادی بافت چربی بر میزان گلوکز در رت‌های دیابتی در طی مدت زمان ۲۵ روز به فاصله هر پنج روز میزان قند خون اندازه‌گیری شد که بیشترین تاثیر در زمان ۲۵ روز دیده شد (جدول ۱.)

جدول ۱: توزیع میزان قند خون رت‌ها در زمان‌های مختلف به تفکیک گروه درمانی. نتایج به صورت mean±SD بیان شده‌اند.

| | پارامتر | وزن(g) | قند خون (mg/dl) |
|---|---|---|---|
| گروه کنترل دیابتی تعداد ۸ | روز صفر | ۲۶۵±۲۲ | ۲۷۵.۱±۲.۱۲ |
| | روز پنجم | ۲۶۰±۱۴ | ۳۱۵±۳.۱* |
| | روز دهم | ۲۵۲±۱۸* | ۳۵۶.۲±۲.۴۵* |
| | روز پانزدهم | ۲۴۶±۱۶* | ۴۰۳.۲±۲.۴* |
| | روز بیستم | ۲۳۸±۱۴* | ۴۴۵.۴±۶.۳* |
| | روز بیست و پنجم | ۲۳۵±۱۸* | ۴۹۳.۵±۲.۶۵* |
| گروه دیابتی تیمار شده با سلول‌های بنیادی بافت چربی، تعداد ۸ | روز صفر | ۲۷۵±۲۲ | ۲۷۲.۴±۲.۴۵ |
| | روز پنجم | ۲۶۶±۱۸ | ۳۱۴.۴±۴.۳۵* |
| | روز دهم | ۲۵۴±۱۳* | ۳۵۵.۶±۲.۷۵* |
| | روز پانزدهم | ۲۴۸±۱۶* | ۳۶۹±۴.۶* |
| | روز بیستم | ۲۴۸±۱۴* | ۳۳۹.۸±۴.۴* |
| | روز بیست و پنجم | ۲۴۹±۱۵* | ۳۱۰.۵±۴.۳ |

## بحث

دیابت شیرین نوعی بیماری متابولیک است که به علت اختلال در ترشح انسولین و یا مقاومت بافت‌ها نسبت به آن به وجود می‌آید. دیابت شیرین به نوع یک(دیابت وابسته به انسولین) و نوع دو(دیابت مستقل از انسولین) تقسیم می‌شود. دیابت نوع یک به علت خودایمنی نسبت به سلول‌های بتا بروز می‌کند و دیابت نوع دو که پیچیده‌تر می‌باشد، به علت مقاومت بافت‌های عضلانی و چربی به انسولین و عدم ترشح جبرانی آن ایجاد می‌شود(۱۷،۱۸). دیابت نوع دو ۹۵٪ بیماران دیابتی را تحت تأثیر قرار داده تنها ۵٪ افراد دیابتی دارای دیابت نوع یک می‌باشند، از آنجا که بیماری دیابت دارای مشکلات اقتصادی، اجتماعی و روانی گسترده‌ای می‌باشد، نیاز شدیدی برای درمان این بیماری احساس می‌شود. با وجود پیشرفت‌های زیادی که تاکنون در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی صورت گرفته است، هنوز تعداد زیادی از بیماری‌ها نظیر دیابت وجود دارند که دامنگیر افراد در سنین مختلف می‌شوند و علاوه بر ناگوار بودن آن برای بیمار، بار عاطفی و اقتصادی سنگینی نیز بر خانواده‌ها و جامعه تحصیل می‌نماید. اخیراً استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یکی از روش‌های درمانی برای این افراد پیشنهاد شده است(۱۶،۱۹). اساس کار در سلول درمانی به صورت زیر تعریف شده است:

در اولین مرحله سلول‌های مناسب به بدن بیمار وارد می‌شوند که این سلول‌ها می‌توانند از بدن خود فرد(پیوند اتولوگ) و یا بدن فردی دیگر(پیوند آلوگرافت) باشند. بهترین روش وارد کردن سلول‌ها، تزریق سیستمیک آنها به داخل جریان خون می‌باشد. فرض بر آن است که سلول‌ها بعد از ورود به جریان خون از جدار عروق عبور کرده و وارد بافت‌های صدمه دیده می‌شوند(لانه گزینی(Homing)). سلول های پیوندی در ارگان صدمه دیده، تحت تأثیر ریز محیط(Niche) جدید خود به سلول‌های بافت مورد نظر تمایز یافته و در نهایت از لحاظ ساختاری و عملکردی جایگزین بافت صدمه دیده می‌شوند(۱۱،۲۰).

میانگین وزن رت‌های دیابتی شده همانطور که انتظار می‌رفت کاهش معنی‌داری نشان داد به طوریکه در گروه کنترل در روز صفر از(۲۶۵± ۲۲g) به ۲۳۵± ۱۸g در روز بیست و



Archive of SID
www.SID.ir

پنجم رسید. همچنین در گروه رت‌های تیمار شده با سلول‌های بنیادی بافت چربی کاهش وزن از روز صفر(۲۷۵±۲۲) تا روز پانزدهم(۲۴۸± ۱۶g) دیده شد اما از روز پانزدهم به بعد تا روز بیست و پنجم تغییرات معنی‌داری نسبت به روز پانزدهم دیده نشد. دلیل آن می‌تواند به علت تاثیر سلول‌های بنیادی در تولید انسولین و کاهش قند خون و بهبود وضعیت رت‌ها در این بازه زمانی باشد. میزان قند خون در رت‌های دیابتی گروه کنترل از زمان صفر(۲۷۵±۲/۲۱) به ۴۹۳/۵±۲/۶۵ در روز بیست و پنجم افزایش یافت اما در رت‌های دیابتی تیمار شده با سلول های بنیادی بافت چربی روند افزایش از روز صفر(۲۷۲/۴±۲/۴۵) تا روز پانزدهم(۳۶۹±۴/۶) دیده شد که این فاصله زمانی می‌تواند بیانگر زمان لازم برای جایگزینی سلول‌های بنیادی و تمایز آن به سلول‌های بتا جهت تولید هورمون انسولین باشد. اما بعد از روز پانزدهم تا روز بیست و پنجم(۳۱۰/۵±۴/۳) روند کاهش معنی‌دار قند خون دیده شد که نشان‌دهنده عملکرد صحیح سلول‌های بنیادی می‌باشد(P<۰/۰۵). نتایج به دست آمده هم‌راستا با مطالعاتی بود که نتایج آنها حکایت از کاهش عوارض ناشی از دیابت پس از پیوند سلول‌های بنیادی داشت که به چند مورد از مطالعات مربوطه در ذیل اشاره شده است:

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط Wilson و همکاران بر روی قابلیت کشت و تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی انجام گردید مشخص شد می‌توان از سلول های بنیادی جدا شده از بافت چربی به عنوان یک منبع جدید و مهم برای تمایز به انواع مختلفی از سلول‌ها استفاده کرد(۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Taha در سال ۲۰۱۰ انجام شد، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی موش‌های ۱۲-۱۴ هفته‌ای جدا شدند. این سلول‌ها را با روش فلوسایتومتری ارزیابی کردند. هر دو نوع سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی تازه از بافت جدا شده و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی چندین بار پاساژ داده شده به صورت چندتوان هستند یعنی قابلیت تمایز به چندین رده سلولی از جمله رده‌های سلولی استخوانی، چربی و غضروف دارند. در نهایت به این نتیجه رسیدند که بافت چربی دارای جمعیتی از سلول‌های بنیادی است که به نظر می‌رسد یک سلول انتخابی با توان بالای بالقوه برای درمان‌های جایگزینی آینده باشد(Carcia)(۱۴) و همکاران در سال ۲۰۱۰ مقدار $۱\times۱۰^{۶}$ عدد سلول بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی را به رت‌های دیابتی شده نوع II تزریق کردند. این مطالعه حاکی از کاهش قند خون در طول دوره درمان بود (۲۲). Yong zhao و تیم تحقیقاتی‌اش در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ موفق به استفاده از سلول‌های بنیادی خون بندناف در درمان دیابت شدند(۲۳،۲۴). Ende و همکاران در سال ۲۰۰۴ تاثیر سلول‌های بنیادی خون بندناف پیوندزده شده به موش‌های دیابتی نوع I را در کاهش قندخون نشان دادند(۲۵).

بنابراین، اگرچه هنوز از کاربردهای کلینیکی سلول‌های بنیادی در درمان دیابت دور هستیم، نتایج آزمایشگاهی تا حدودی نوید بخش درمان می‌باشند. قابلیت سلول‌های بنیادی در درمان این بیماری هنوز در مراحل آغازین است و تکنولوژی‌های موجود در مهندسی سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های ترشح‌کننده انسولین، در این امر کمک خواهند کرد. اطلاعاتی که از بیولوژی سلول‌های بنیادی، تکامل سلول‌های بتا و عملکرد سلول در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک به دست می‌آیند نیز در این زمینه کمک بسیاری خواهند نمود. امیدواریم که پیشرفت‌های آتی چراغ امیدواری را در دل بیماران روشن نمایند.

## نتیجه‌گیری

امروزه با توجه به اهمیت دیابت در زندگی افراد که در حالت حاد همراه با مشکلات بینایی، زخم پا و برخی مشکلات دیگر می‌باشد و همچنین به علت اینکه بار مالی آن بر جامعه بسیار سنگین است، یافتن راه درمانی غیرتهاجمی مانند استفاده از سلول‌های بنیادی می‌تواند گامی بسیار بزرگ در این زمینه باشد. بنابراین در این تحقیق سعی شد که کاربرد سلول‌های بنیادی بافت چربی که دارای مرحله جداسازی راحت و قابلیت تبدیل به سلول‌های دیگر را دارند در درمان رت‌های دیابتی مورد ارزیابی قرار گیرد. در این تحقیق مشاهده شد این سلول‌ها قادرند بعد از تزریق به رت‌های



Archive of SID
www.SID.ir

دیابتی به طور قابل توجهی میزان قند خون را کاهش دهند. از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به این مورد اشاره کرد که در این تحقیق بهتر بود تا میزان c-peptide نیز اندازه‌گیری می‌شد که به علت بالا بودن قیمت آن موفق به انجام آن نشدیم.

**سپاسگزاری**

از تمام اساتید گروه بیوشیمی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و همچنین دوستانمان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## *References:*

1- Eickhoff H, Guimaraes A, Louro TM, Seica RM, Sousa FC. ***Insulin resistance and beta cell function before and after sleeve gastrectomy in obese patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes.*** Surg endo 2015; 29(2): 438-43.

2- Zhang T, He H, Yang HL, Huang HJ, Zhang MF, An ZM, et al. ***[Study of glycated albumin cut-off point in diabetes mellitus and impaired glucose regulation].*** Sichuan da xue xue bao Yi xue ban = J Sichuan Uni Med sci edition 2014; 45(2): 274-77.

3- Xu T, Shi M, Qiu YX, Wang YG. ***[Study on correlation of glucagons, type 2 diabetes and impaired glucose regulation].*** Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica 2014; 39(12): 2356-63.

4- Yiu KH, Tse HF. ***Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial progenitor cell characteristics and function.*** Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biolo 2014; 34(6): 1136-43.

5- Sharma A, Ezekowitz JA. ***Diabetes, impaired fasting glucose, and heart failure: it's not all about the sugar.*** Euro J heart failure 2014; 16(11): 1153-56.

6- Hu MJ, Ruan GP, Yao X, Ruan GH, Wang JX, Pang RQ, et al. ***Induced autologous stem cell transplantation for treatment of rabbit type 1 diabetes.*** Cell biolo inter 2013; 37(6): 624-32.

7- Wang L, Zhao S, Mao H, Zhou L, Wang ZJ, Wang HX. ***Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of type 2 diabetes mellitus.*** Chinese med J 2011; 124(22): 3622-28.

8- Noguchi H. ***Recent advances in stem cell research for the treatment of diabetes.*** World journal of stem cells. 2009; 1(1): 36-42.

9- Mimeault M, Batra SK. ***Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer.*** Gut. 2008; 57(10): 1456-68.

10- Bahk JY, Han H, Lee YS. ***Stem cell treatment for complicated diabetes.*** Inter J stem cells 2008; 1(1): 91-5.

11- Lock LT, Tzanakakis ES. ***Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes.*** Tissue engineering 2007; 13(7): 1399-412.



Archive of SID
www.SID.ir

*12-* Krishna KA, Rao GV, Rao KS. ***Stem cell-based therapy for the treatment of Type 1 diabetes mellitus.*** Regenerative med 2007; 2(2): 171-77.

*13-* Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. ***Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus.*** Stem cells 2011; 29(1): 5-10.

*14-* Taha MF, Hedayati V. ***Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells.*** Tissue & cell 2010;42(4): 211-16.

*15-* Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. ***Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus.*** Frontiers in endo 2014; 5: 86.

*16-* Wen Y, Chen B, Ildstad ST. ***Stem cell-based strategies for the treatment of type 1 diabetes mellitus.*** Exp opi biolo therapy 2011; 11(1): 41-53.

*17-* Saito T, Watanabe M, Nishida J, Izumi T, Omura M, Takagi T, et al. ***Lifestyle modification and prevention of type 2 diabetes in overweight Japanese with impaired fasting glucose levels: a randomized controlled trial.*** Archives of internal medicine 2011; 171(15): 1352-60.

*18-* Nakagami T, Iwamoto Y. ***[Diabetes mellitus and impaired glucose regulation].*** Nihon rinsho Japanese J clini med 2011; 69 Suppl 1: 388-93.

*19-* A LoCascio S, Spinelli J, Kurtz J. ***Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of autoimmunity in type 1 diabetes.*** Current stem cell research & therapy 2011; 6(1): 29-37.

*20-* Zhao Y, Lin B, Dingeldein M, Guo C, Hwang D, Holterman MJ. ***New type of human blood stem cell: a double-edged sword for the treatment of type 1 diabetes.*** Translat res: J labora clinic med 2010; 155(5): 211-16.

*21-* Wilson B, Liotta LA, Petricoiniii E. ***Dynamic protein pathway activation mapping of adipose-derived stem cell differentiation implicates novel regulators of adipocyte differentiation.*** Molecular & cellular proteomics: MCP 2013; 12(9): 2522-35.

*22-* Garcia MM, Fandel TM, Lin G, Shindel AW, Banie L, Lin CS, et al. ***Treatment of erectile dysfunction in the obese type 2 diabetic ZDF rat with adipose tissue-derived stem cells.*** J sexual med 2010; 7(1 pt 1): 89-98.

*23-* Zhao Y, Mazzone T. ***Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes.*** Autoimmunity reviews 2010; 10(2): 103-07.

*24-* Zhao Y, Hwang D, Guo C. ***Immune modulation of blood-derived stem cell as a comprehensive tool for treating type 1 diabetes.*** Discovery medicine 2009; 8(43): 219-22.

*25-* Ende N, Chen R, Reddi AS. ***Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulitis in type 1 diabetic mice.*** Biochemi biophysi res communi 2004; 325(3): 665-69.

Archive of SID



www.SID.ir

# *Effect of Adipose tissue-derived Stem Cells on the Control of the Blood Glucose Level in Diabetic Rats*

***Moradi A (PhD)[1], Mohammadi S(MSc)[2], Hamidi Alamdari D(PhD)[*3]***

*[1,2] Department of Biochemistry & Molecular Biology, Faculty of Medicin, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

*[3] Biochemistry and Nutrition Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

***Received:*** 19 Apr 2015 ***Accepted:*** 6 Aug 2015

***Abstract***

***Introduction:*** Mellitus Diabetes belongs to a group of metabolic diseases, which is caused due to the disturbance in insulin secretion, destruction of beta cells, auto immune reasons, necrosis as well as insulin resistance. Stem cells therapy has recently been suggested as a treatment method of Diabetes. Since adipose tissue-derived stem cells present wide availability, easy access, hight proliferation and less immunological rejection, the present study aimed to investigate their effect on the control of the blood glucose level.

***Methods:*** In this experimental-interventional study, adipose tissue-derived stem cells, harvested from the liposuction surgery were purified and after being counted by neubuaer lam, were evaluated via flow cytometry in order to identify and approve the existence of stem cells. Sixteen male wistar rats weighing about 250-300 gr, induced diabetes by streptozotocin (60 mg/kg), which were divided randomly into two groups of eight. Group 1 (Diabetes control) received the normal saline treatment, and group 2 (treatment) received $1.5x10^6$ adipose tissue-derived stem cells. In order to evaluate the improvement process, blood glucose level of rats was measured by glucometer every day for a period of 25 days after the tissues transaction.

***Results:*** The results of flow cytometry indicated high percentages of CD29 and CD90 in mesenchymal adipose tissue-derived stem cells. The blood glucose level of diabetic rats revealed a significant reduction ($P < 0.001$) in blood glucose level in the rats treated with derived adipose tissue-derived stem cells in comparison with the control group.

***Conclusion:*** The findings of the present study revealed a signification decrease of blood glucose level after confirmation of stem cells isolated from the adipose tissue using cell surface antigens and its injection into diabetic rats ($P <0.001$) .

***Keywords:*** Adipose tissue; Diabetes; Glucose; Stem cells

***This paper should be cited as:***

Moradi A, Mohammadi S, Hamidi Alamdari D. ***Effect of adipose tissue-derived stem cells on the control of the blood glucose level in diabetic rats***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(8): 717-26.

***Corresponding author: Tel: 051182022505, Email: hamidiad@mums.ac.ir***

Archive of SID

www.SID.ir