پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات ۱۰ تا ۱۸

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی تاثیر ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان بر التیام زخم‌های دیابتی

رسول گنجی[۱]، عباس پیریایی[۱*]، محمد بیات[۱]، معصومه رجبی بذل[۲]، ژاله محسنی فر[۳]، راضیه خیرجو[۱]

[۱] دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی
۲ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
۳ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان آیت الله طالقانی، بخش پاتولوژی

چکیده

سابقه و هدف: *تاثیر مثبت ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در فرایند ترمیم برخی بافت ها گزارش شده است. به نظر می‌رسد این ترشحات به علت دارا بودن متابولیت‌ها و فاکتورهای ویژه، در درمان زخم های دیابتی هم موثر باشد. در این مطالعه بر آن هستیم تا تاثیر ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان را بر استحکام زخم دیابتی بررسی نماییم.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی پلاسبو (تحت درمان با محیط کشت پایه) و دیابتی تجربی (تحت درمان با محیط کشت بهینه) تقسیم شدند. برای القاء دیابت در موش‌ها از تجویز داخل صفاقی آلوکسان استفاده شد و در ناحیه پشت موش‌ها یک برش با ضخامت کامل پوست ایجاد گردید. طی ۲۴ ساعت پس از ایجاد زخم موش های گروه تجربی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بهینه، و گروه پلاسبو نیز ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت پایه را به صورت تزریق داخل وریدی دریافت نمودند. ۱۵ روز بعد از ایجاد زخم، از زخم ها نمونه برداری شد و آزمایش بیومکانیکی از نوع کشش پذیری (tensiometery) روی آنها انجام شد و داده های به دست آمده با آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شد.*

یافته‌ها: *اختلاف وزن و قندخون موش های دیابتی با گروه سالم از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/001$). مقدار نیروی حداکثر گروه دیابتی تجربی (۱/۰۵±۳/۴۵) نسبت به گروه دیابتی کنترل (۰/۵۶±۱/۷۶) و گروه دیابتی پلاسبو (۰/۶۲±۲/۳۰) افزایش معنی داری یافته بود ($p<0/05$). علاوه برآن میزان استرس حداکثر گروه دیابتی تجربی (۰/۱±۰/۳۴) نسبت به گروه دیابتی کنترل (۰/۰۵ ± ۰/۱۸)، و همچنین میزان سفتی ارتجاعی گروه دیابتی تجربی (۱/۰۷±۳/۱۹) در مقایسه با گروه دیابتی پلاسبو (۰/۱۹±۲/۲۰) افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/05$).*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که استفاده از ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان موجب افزایش استحکام زخم دیابتی می‌شود. مطالعات بیشتر با بررسی‌های بافت شناسی و مولکولی توصیه می‌گردد.*

واژگان کلیدی: *دیابت، سلول بنیادی مزانشیمی، محیط کشت بهینه، التیام زخم، تنسیومتری.*

مقدمه

دیابت یک اختلال مزمن متابولیکی است که مشخصه اصلی آن افزایش قند خون (هایپرگلیسمی) است. یکی از عوارض وخیمی که این بیماری به وجود می‌آورد، زخم‌های پوستی است که در اکثر موارد مزمن شده و درمان آن طولانی می‌گردد، و حتی ممکن است به قطع عضو بیانجامد. به طور کلی تولید ناقص سیتوکاین‌ها توسط سلول‌های التهابی و فیروبلاست‌ها، و کاهش آنژیوژنز از فاکتورهای مهمی هستند که باعث مزمن شدن زخم می‌شوند (۶-۱). در زخم‌های دیابتی، فعالیت‌های کموتاکتیک کاهش می‌یابد. در نتیجه پاسخ‌های التهابی ضعیف شده و تولید

آدرس نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیولوژی و علوم تشریح. دکتر عباس پیریایی (**e-mail: piryae@sbmu.ac.ir**)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲٤

Archive of SID
www.SID.ir

فاکتورهای رشد و ماتریکس خارج سلولی (به ویژه کلاژن) و روند رگ‌زایی به شدت کاهش می‌یابد؛ و همین امر موجب مزمن شدن زخم می‌گردد (۱۲-۷).

بر اساس آمارهای جهانی بیش از ۲۷۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت هستند که ۱۵ درصد آنها از زخم‌های دیابتی رنج می‌برند. از طرفی صرف نظر از تروماها، حدود ۶۰ درصد قطع عضوهای اندام تحتانی به خاطر دیابت اتفاق می‌افتد (۱۲،۱۱).

در حال حاضر، جهت تسریع روند التیام زخم چه در زخم‌های طبیعی و چه در زخم‌های دیابتی تمهیدات گوناگونی به کار گرفته می‌شود که از جمله آنها می‌توان به استفاده از ترکیبات آنتی‌سپتیک، آنتی‌بیوتیک‌ها، پاکسازی بستر زخم به روش‌های گوناگون، بانداژ مناسب، استفاده از تحریکات الکتریکی، امواج اولتراسوند، امواج مغناطیسی، امواج لیزر، ذرات نانو، برخی سیتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد و برخی ترکیبات شیمیایی اشاره نمود (۱۹-۱۳). لازم به ذکر است که هزینه این درمان‌ها بسیار بالا و کاربرد آنها مشکل است. بنابراین همچنان به ابداع یک شیوه درمانی جدید برای ترمیم این زخم های مزمن نیازمندیم.

به تازگی روش‌های درمانی مبتنی بر سلول‌های بنیادی به صورت موفقیت‌آمیزی برای ترمیم و بازسازی برخی بافت‌ها صورت گرفته، و قابلیت‌های درمانی فراوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (Bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs) برای همه روشن شده است. این سلول های بنیادی چندتوان توانایی تمایز به انواع زیادی از سلول‌ها به ویژه سلول‌های مزانشیمی مانند فیبروبلاست، میوبلاست، عضله قلبی، غضروف و استخوان، و همچنین برخی سلول‌های غیرمزانشیمی نظیر سلول‌های عصبی و کبدی را دارند و علاوه بر آن می‌توانند فاکتورهای رشد و سیتوکاین‌هایی را تولید نمایند که در محل آسیب، روند ترمیم را تسریع می‌نمایند (۲۶-۲۰).

در ضمن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت خود را در درمان زخم‌های مدل‌های حیوانی سالم و دیابتی نیز نشان داده‌اند. از طرفی، برخی مطالعات نشان داده‌اند که در افراد مبتلا به دیابت قابلیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به افراد طبیعی پایین تر بوده، بنابراین می‌توان با پیوند سلولهای مزانشیمی سالم افزایش قابل توجهی در سرعت بسته شدن زخم، و تولید اپیتلیوم و عروق خونی جدید ایجاد نمود (۳۱-۲۷). هر چند که بهره گیری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان زخم‌های دیابتی موفقیت آمیز بوده، و بسیاری از مطالعات پیوند موفقیت آمیز این سلول‌ها را در موارد مختلف گزارش نموده‌اند و حتی از این سلول‌ها برای تعدیل سیستم ایمنی استفاده می‌شود. با این وجود به نظر می‌رسد که این سلول‌ها نیز خاصیت ایمنی‌زایی دارند و در عمل برای پایدار بودن پیوند این سلول‌ها باید از سرکوب سیستم ایمنی فرد گیرنده استفاده نمود (۳۲). از طرفی در بسیاری از مطالعات نشان داده شده که بخش عمده تاثیر سلول‌های مزانشیمی بر روند ترمیم بافتی به واسطه ترشحات پاراکراین آنها روی می‌دهد. بنابراین در راهکارهای درمانی جدید می‌توان با حذف خود سلول و استفاده از تولیدات ترشحی آن، نه تنها از مزایای این سلول استفاده نمود، بلکه مشکلات احتمالی حضور سلول در بدن فرد گیرنده را نیز مرتفع ساخت (۳۳، ۳۴). بدین ترتیب در مطالعه حاضر برای بهبود زخم موش‌های دیابتی از محیط کشت بهینه (Conditioned Medium, CM) مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان استفاده گردید. در واقع این محیط شامل متابولیت‌ها، سایتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی است که توسط سلول‌های مزانشیمی به داخل محیط کشت ترشح می‌شوند. تاکنون گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر این محیط کشت بهینه در ترمیم برخی بافت‌ها، به ویژه زخم‌های پوستی و ترمیم شکستگی‌های استخوانی ارائه شده است (۲، ۳۷-۳۵). لذا این تحقیق به منظور بررسی تاثیر ترشحات این سلول‌ها بر استحکام زخم‌های دیابتی در گروه بیولوژی و علوم تشریح دانشکده پزشکی شهیدبهشتی در سال ۱۳۹۲ انجام گردید.

مواد و روشها

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ سالم نژاد Wistar از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در حیوان‌خانه‌ای با شرایط استاندارد (دمای حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل منظم ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) درون قفس‌های پلی اتیلن با سقف توری فلزی مشبک و دسترسی آزاد به آب و خوراک موش نگهداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی پلاسبو (تحت درمان با محیط کشت پایه) و دیابتی تجربی (تحت درمان با محیط کشت بهینه) تقسیم شدند. هر گروه شامل ۶ سر موش بود که در روز پانزدهم پس از ایجاد زخم نمونه‌برداری شدند. همه مراحل نگهداری و تیمارهای انجام روی حیوانات مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی قرار گرفت.

نحوه ایجاد و تایید دیابت

پس از خو گرفتن موش‌ها با حیوان خانه و قبل از القای دیابت، از انتهای دم همه موش‌ها خون ناشتا گرفته شد و قند خون آنها به وسیله دستگاه پرتابل اندازه گیری قندخون (Biomine,

Archive of SID

www.SID.ir

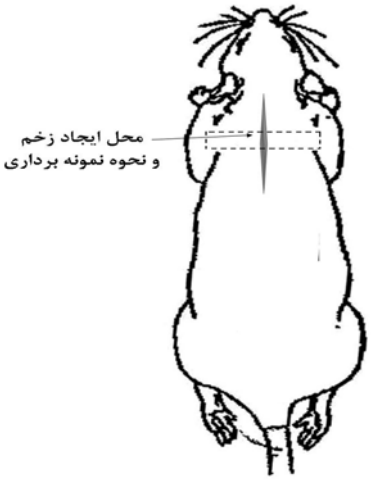
(Righteststm GM300, Switzerland) ثبت شد و موش‌هایی که قند خون طبیعی داشتند، وارد مطالعه شدند. برای القای دیابت از محلول تازه تهیه شده آلوکسان (Aalloxan monohydrate, Sigma Aldrich, USA) در سرم فیزیولوژی استفاده شد و به موش‌های گروه‌های دیابتی ۱۴۰mg/kg آلوکسان به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از گذشت یک هفته دوباره از موش‌ها خون گرفته شد و قند خون آنها ثبت گردید و در صورتی که میزان قند خون آنها بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود، دیابتی محسوب می‌شدند (۳۸). سپس از زمان تزریق آلوکسان به مدت یک ماه تامل شد تا شرایط هیپرگلیسمی در موش‌ها تثبیت شود. لازم به ذکر است که اندازه‌گیری قند خون، به صورت هفتگی برای همه موش‌ها (دیابتی و غیر دیابتی) انجام شد و هر موشی که از نظر این پارامتر دچار اختلال می‌شد، از برنامه تحقیق حذف می‌گردید.

نحوه ایجاد زخم پوستی

برای ایجاد زخم پوستی، ابتدا موش‌ها توسط تزریق داخل عضلانی ۵۰mg/kg کتامین و ۵mg/kg دیازپام بیهوش شدند. موی پشت آنها تراشیده شد و پوست به وسیله بتادین و الکل طبی ضدعفونی گردید. سپس یک برش در پوست ناحیه سینه‌ای فوقانی هر موش، در طول محور سری-دمی، به طول ۲ سانتی‌متر و با ضخامت کامل پوست با تیغ جراحی نمره ۱۵ ایجاد شده، و فاصله دو لبه برش بوسیله یک بخیه در قسمت میانی زخم با فاصله حدود ۳ میلی مترحفظ شد (شکل ۱) (۳۸). پس از ایجاد زخم، موش‌های دیابتی به طور تصادفی به گروه‌های کنترل، پلاسبو و تجربی تقسیم شدند (هر گروه شامل ۶ سر موش).

تهیه، تخلیص و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، از سلول‌های مغز استخوان افراد اهدا کننده‌ای که در بانک سلولی مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان موجود بود، تهیه شد. این سلول‌ها درون فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM (شرکت ایده زیست) به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, UK) و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و یک درصد استرپتومایسین (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در غلظت ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند. محیط کشت فلاسک‌ها هر سه روز تعویض شد و پس از آنکه ۸۰ تا ۹۰ درصد کف فلاسک‌ها با سلول پر می‌شد، سلول‌ها به نسبت ۱ به ۳ پاساژ داده می شدند (۲۲). سرانجام پس از ۴ پاساژ سلولی که سلولهای مزانشیمی تخلیص شده و ازدیاد یافتند، از این سلول‌ها برای انجام مراحل بعدی تحقیق استفاده شد.



شکل ۱. محل ایجاد زخم پوستی در موشها (خط سری-دمی) و نحوه نمونه‌برداری برای آزمایش بیومکانیکی (مستطیل خط چین).

تایید مزانشیمی بودن سلول‌ها

برای تایید مزانشیمی بودن سلولها مورفولوژی آنها در پاساژ ۴ و همچنین قابلیت تمایز چند رده‌ای آنها به سلول‌های استخوان و چربی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی قابلیت تمایز چند رده‌ای، سلول‌ها در ظرف‌های کشت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از رشد کافی، به طور جداگانه تحت القای محیط تمایز چربی (شامل DMEM حاوی µg/ml ۵۰ آسکوربیک-۲ فسفات، ۱۰۰nM دگزامتازون و ۵۰µg/ml اندومتاسین، همگی تهیه شده از Sigma Aldrich, USA) و محیط تمایز استخوان (شامل DMEM حاوی µg/ml ۵۰ آسکوربیک-۲ فسفات، ۱۰nM دگزامتازون و ۱۰mM بتا-گلیسرول فسفات، همگی تهیه شده از Sigma Aldrich, USA) قرار گرفتند. محیط تمایز هر سه روز یک بار تعویض شد و پس از گذشت ۲۱ روز، تمایز سلول‌های مزانشیمی به چربی با رنگ آمیزی Oil red و تمایز به استخوان با رنگ آمیزی Alizarin red بررسی گردید (۲۲).

تهیه محیط کشت بهینه

به منظور تهیه محیط کشت بهینه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پس از آنکه سلول‌های پاساژ ۴ حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد بستر فلاسک های ۷۵ سانتی متری را پر کردند، دو

Archive of SID
www.SID.ir

مرتبه با محلول فسفات بافر سالین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به هر فلاسک ۱۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM فاقد سرم افزوده شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می‌شدند. پس از آن محیط کشت جمع آوری شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰ سانتریفیوژ می‌شد، تا خرده‌های سلولی موجود در آن حذف شود (۲،۳۷). سرانجام محیط مربوطه توسط دستگاه لایوفیلایزر (Christ Alpha1-2 LD plus, Germany) به میزان ۵۰ برابر تغلیظ شده، و تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

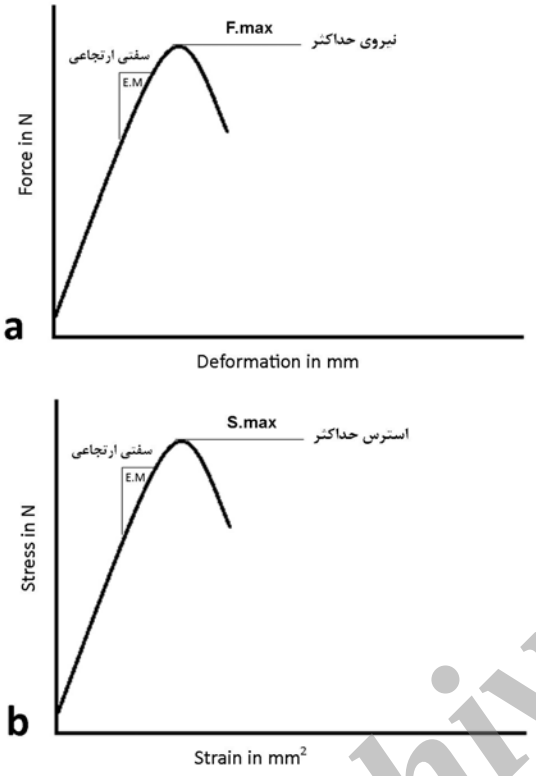
تیمار زخم های پوستی توسط محیط کشت بهینه

گروه کنترل سالم و گروه کنترل دیابتی مداخله درمانی نداشتند. اما گروه دیابتی تجربی تحت تیمار محیط کشت بهینه و گروه دیابتی پلاسبو تحت تیمار محیط کشت پایه قرار گرفتند. برای این منظور موش‌های این دو گروه در فاصله زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از ایجاد زخم، در هر مرحله به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تغلیظ شده مورد نظر را از طریق ورید دمی دریافت نمودند.

نمونه برداری و آزمایش های بیومکانیکی زخم‌های پوستی

همه موش‌های تحت مطالعه، ۱۵ روز پس از ایجاد زخم توسط تزریق دوز بالای کتامین/ دیازپام و القای بیهوشی عمیق قربانی شده و نمونه‌های پوستی مورد نظر به وسیله یک ابزار مخصوص تهیه شد. این ابزار شامل دو تیغ جراحی بود که به وسیله یک گیره با فاصله ۵ میلی متر کنار هم متصل شده بودند. با استفاده از این ابزار برش‌های پوستی به اندازه یکسان، با عرض ۵ میلی متر و طول ۵ سانتی متر (به نحوی که بستر زخم در قسمت میانی آن قرار داشت) تهیه می‌شد (شکل ۱). نمونه‌های پوستی تا زمان انجام آزمایشات بیومکانیکی، درون گاز زخم بندی آغشته به محلول نمکی ۰/۹ درصد و داخل فریزر منفی بیست درجه نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌های بیومکانیکی از دستگاه تنسیومتری (Zwick/Roell, Germany) استفاده شد.

برای این منظور، ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق ذوب شده، دو لبه نمونه به دو گیره ثابت و متحرک دستگاه متصل شد و طبق برنامه‌ریزی نرم افزاری دستگاه، گیره متحرک با سرعت ۱۵ میلیمتر در دقیقه از گیره ثابت دور شد، تا زمانی که ناحیه زخم در اثر کشیدگی دچار پارگی گردید. طی این فرایند، رایانه متصل به دستگاه، منحنی روند تغییر شکل بافتی را براساس نیروی وارده (Load-deformation) رسم نمود، و از طریق آنالیز این منحنی نیروی حداکثر (Maximum Force) بر اساس واحد نیوتن، سفتی ارتجاعی نمونه (Modulus of Elasticity) بر اساس واحد نیوتن بر میلی‌متر و استرس حداکثر (Maximum Stress) نمونه بر اساس واحد نیوتن بر میلیمتر مربع محاسبه و گزارش گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱. منحنی های روند تغییر شکل بافتی براساس نیروی وارده، مربوط به آزمایش بیومکانیکی تنسیومتری نمونه های زخم پوستی. در هر دو نمودار فوق، شیب نمودار (E.M) سفتی ارتجاعی نمونه را برحسب نیوتن بر میلی‌متر نشان می‌دهد و منظور از آن بیشترین شیب قسمت خطی منحنی (در فاز کشیدگی بافت) است. در نمودار نیرو-تغییر شکل (a) بالاترین نقطه نمودار، نیروی حداکثر (F-max) را برحسب نیوتن نشان می‌دهد و منظور از آن بیشترین نیرویی است که بافت قبل از پارگی ماکروسکوپی تحمل نموده است. در نمودار استرس-استرین (b) نیز استرس حداکثر (S-max) که بر حسب نیوتن بر میلیمتر مربع بیان می‌شود، یعنی حداکثر قدرت تحمل نمونه در برابر نیروی کشش دستگاه، تا نقطه‌ای که نمونه دچار پارگی شده و مقامت خود را از دست دهد.

روش تحلیل داده‌ها

همه داده‌های کمی توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد. ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون One-sample Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. داده‌های مربوط به وزن

Archive of SID
www.SID.ir

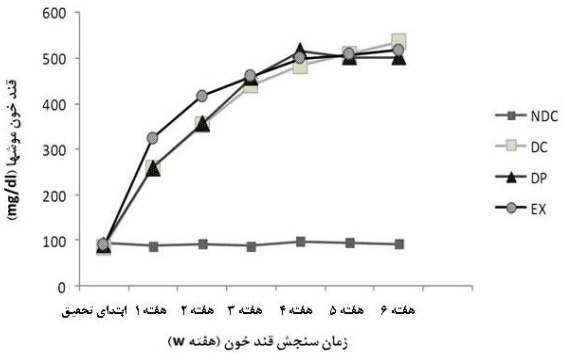
و قند خون موش‌های دیابتی بـه روش Paired student t-test در ابتدای تحقیق و زمان نمونه برداری با یکدیگر مقایسه شـد. همچنین داده‌های آزمایش بیومکانیکی همه گـروه‌هـا بـا روش One way ANOVA و پس آزمون Tukey با یکدیگر مقایسه شد. سرانجام داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیـار ارایـه شد و $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

این تحقیق روی ۲۴ سر موش صحرایی در چهار گروه ۶ نفـره انجام شد.

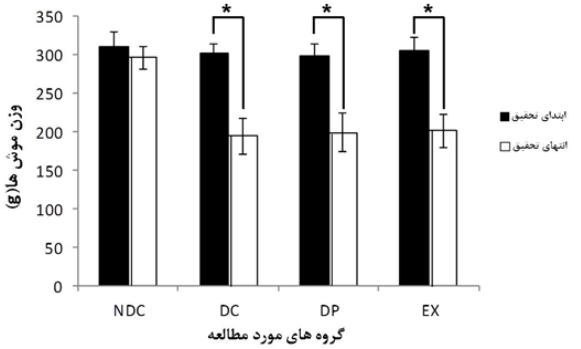
میزان قند خون و وزن

بررسی هفتگی قند خون موش‌ها نشان داد که تمـامی مـوش های گروه های دیـابتی بـا تزریـق تـک دوز آلوکسـان دیـابتی شدند. با وجود آن که قندخون موش‌های کنترل سالم در طول مطالعه ثابـت مانـده بـود و در بـدو تحقیـق ۱۲/۸۴±۹۲ و در انتهای دوره ۶/۰۹±۹۲ میلی گرم بر دسی لیتر بود، میزان قند خون سایر گروه‌ها طی چهار هفته ابتـدایی بـه مـرور افـزایش چشمگیری یافته و از آن پس تا پایان مطالعه ثابـت مانـد. بـه نحوی که قندخون موش‌های کنترل دیابتی از ۱۳/۰۳±۹۴ بـه ۹۳/۰۲±۴۷۳، قندخون مـوش‌هـای گـروه دیـابتی پلاسـبو از ۹/۴۹±۹۱ به ۸۴/۴۶±۴۳۶ و قندخون موش‌های گروه تجربی از ۸/۱۴±۹۶ به ۷۶/۵۱±۴۶۹ افزایش یافت و همه این اختلاف ها از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۲).

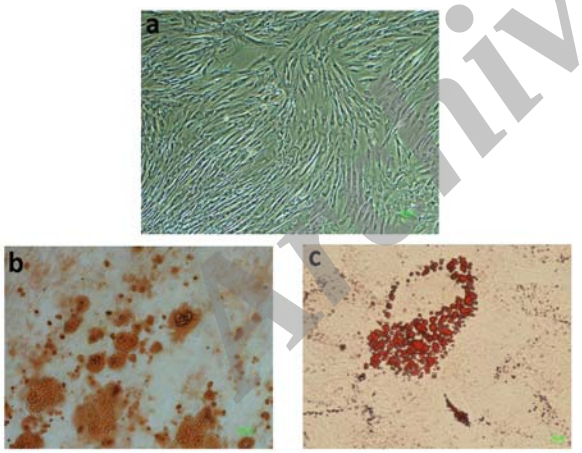


نمودار ۲. میزان قند خون موش‌های مورد بررسی برحسـب زمـان و به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه طی انجـام تحقیـق. NDC: گـروه کنترل سالم DC: گروه دیابتی کنترل، DP: گروه دیابتی پلاسبو، EX: گروه تجربی.

بررسـی وزن مـوش‌هـای مـورد مطالعـه در شـروع تحقیـق و همچنین زمان نمونه برداری نشان داد که، با وجـود آنکـه وزن موش‌های گروه کنترل سالم در طول تحقیق کـاهش انـدک و غیر معنی‌داری را نشان می داد (در بدو تحقیق ۱۹/۵±۳۱۰ و در انتهـای دوره ۱۴/۲۳±۲۹۶)، کـاهش وزن مـوش‌هـای گروه‌های دیابتی کاملا معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$). بـه شـکلی که وزن موش‌هـای گـروه کنتـرل دیـابتی از ۱۲/۶۸±۳۰۲ بـه ۲۳/۱۳±۱۹۴، وزن مـوش‌هـای گـروه دیـابتی پلاسـبو از ۱۵/۳۹±۲۹۸ به ۲۴/۳۰±۱۹۹ و وزن موش‌های گروه تجربـی از ۱۶/۸۶±۳۰۵ به ۲۲/۲۱±۲۰۱ کاهش یافت (نمودار ۳).



نمودار ۳. وزن موش های مورد بررسی بـر حسـب گـروه‌هـای مـورد مطالعه و به تفکیک ابتدا و انتهای مطالعه.NDC : گروه کنترل سـالم DC: گروه دیابتی کنترل، DP: گروه دیـابتی پلاسـبو، EX: گـروه تجربی. علامت ستاره نشانه تفاوت معنی‌دار است ($P<0.05$).



شکل ۲. a) تصاویر فازکنتراست سلول های بنیادی مزانشیمی مغـز استخوان انسـان در پاسـاژ ۴، b) سـلول هـای اسـتخوانی مشـتق از مزانشیم که با Alizarin red رنگ آمیزی شده اند، و c) سـلول هـای چربی مشتق از مزانشیم که با Oil red رنگ آمیزی شده اند.

خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی

هرچند که این سلول‌ها در کشت های ابتـدایی حـاوی برخـی سلول‌های غیر چسبنده نیز بودند، اما پس از انجـام پاسـاژهای سلولی، سرانجام در پاساژ ۴ اکثر ناخالصی‌هـا برطـرف شـده و

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های چسبنده به‌طور کامل یک دست، دوکی شکل و کشیده و دارای ظاهری شبه فیبروبلاستی بودند؛ و هنگامی که ۸۰ درصد کف فلاسک را پر می‌کردند، نمایی مواج که ویژگی سلول‌های مزانشیمی انسان است را نشان می‌دادند (شکل ۲a). همچنین سلول‌های پاساژ چهارمی که تحت القای محیط‌های آدیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفته بودند، پس از گذشت ۲۱ روز به ترتیب به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز یافته بودند، و رنگ‌آمیزی‌های Oil-Red و Alizarin-Red تمایز آن‌ها را تأیید می‌نمود (شکل ۲b و ۲c).

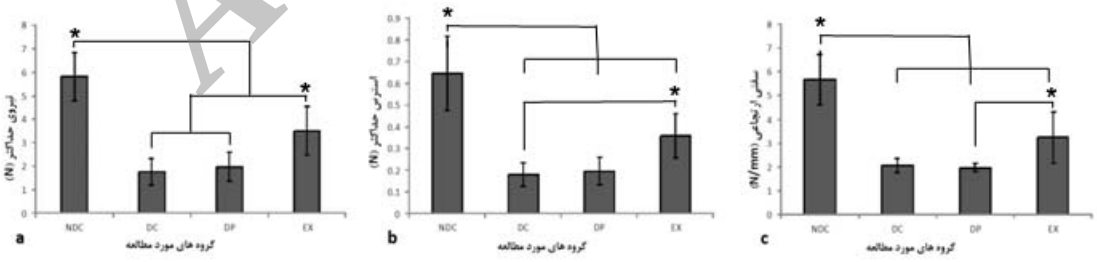
یافته های آزمایش بیومکانیکی زخم‌ها

در این مطالعه به منظور بررسی روند ترمیم زخم های پوستی، از تجزیه و تحلیل معیارهای بیومکانیکی نیروی حداکثر، استرس حداکثر و سفتی ارتجاعی که نشان دهنده میزان استحکام بافت ترمیم یافته هستند استفاده شد. به طور کلی این آزمایشات نشان داد که تمامی معیارهای مورد بررسی در هر سه گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی‌دار یافته‌اند. با این وجود همین معیارها در گروه دیابتی تجربی در مقایسه با گروه‌های کنترل دیابتی و دیابتی پلاسبو افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد (نمودار ۴). به شکلی که مقدار نیروی حداکثر گروه دیابتی تجربی ۱/۰۵±۳/۴۵ بود، درحالی که این معیار در گروه دیابتی کنترل ۰/۵۶±۱/۷۶ و در گروه دیابتی پلاسبو ۰/۶۲±۲/۳۰ ثبت گردید و این اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). علاوه بر آن مقدار استرس حداکثر گروه دیابتی تجربی (۰/۱±۰/۳۴) نسبت به گروه دیابتی کنترل (۰/۰۵ ±۰/۱۸)، و همچنین میزان سفتی ارتجاعی گروه دیابتی تجربی (۱/۰۷±۳/۱۹) در مقایسه با گروه دیابتی پلاسبو (۰/۱۹±۲/۲۰) افزایش معنی‌داری یافته بود ($p<0/05$). بدین ترتیب شاهد افزایش معنی‌دار معیارهای بیومکانیکی در گروه تجربی تحت درمان با محیط کشت بهینه نسبت به گروه‌های دیابتی دیگر بودیم که خود نشان دهنده بهبود فرایند التیام زخم در این گروه می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر نتایج آزمایش بیومکانیکی زخم‌های پوستی ترمیم یافته نشان دهنده بهبود معنی‌دار زخم‌های دیابتی تحت درمان با محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان بود. اختلاف معنی‌دار معیارهای نیروی حداکثر و استرس حداکثر بین گروه دیابتی تجربی و گروه دیابتی کنترل نشان داد که استفاده از این محیط کشت بهینه به صورت تزریق سیستمیک طی دو مرحله در محدوده زمانی ۲۴ ساعت پس از ایجاد زخم، تاثیر مثبتی بر افزایش استحکام زخم می‌گذارد. از طرفی، تفاوت‌های معنی‌دار هر دو معیار نیروی حداکثر و سفتی ارتجاعی بین گروه دیابتی تجربی و دیابتی پلاسبو نشان دهنده آن است که بهبود مشاهده شده در گروه دیابتی تجربی ناشی از ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی (که از آن تحت عنوان سکرتوم سلولی یاد می‌شود) به درون محیط کشت پایه می‌باشد.

طی مطالعات متعددی که در گذشته در خصوص اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر فرآیند التیام زخم پوستی انجام شده بود، مشخص شد که این سلول‌ها روی زخم‌های موش‌های سالم و دیابتی اثرات مثبتی دارند (۳۱-۲۷). اما در موارد استفاده از سلول‌های بنیادی همچنان با مسئله ایمنی‌زایی و تومورزایی



نمودار ۴. نمودارهای مقایسه معیارهای بیومکانیکی نیروی حداکثر (a)، استرس حداکثر (b) و سفتی ارتجاعی (c) گروه های مورد مطالعه. NDC: گروه کنترل سالم DC: گروه دیابتی کنترل، DP: گروه دیابتی پلاسبو، EX: گروه دیابتی تجربی. علامت ستاره نشانه تفاوت معنی‌دار است ($P<0.05$). همانگونه که مشاهده می شود هر سه معیار مورد بررسی در گروه های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافتند. با این وجود، همین معیارها در گروه دیابتی تجربی در مقایسه با گروه های کنترل دیابتی و دیابتی پلاسبو افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

احتمالی روبرو هستیم، و به همین خاطر است که استفاده از محیط کشت بهینه مشتق از این سلول‌ها مورد توجه محققان قرار گرفته است (۳۳، ۳۴). ضمن آن که برخی مطالعات نیز اثر مثبت استفاده از محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در فرایند ترمیم زخم نشان داده‌اند (۲). یافته‌های تحقیق حاضر نیز بیانگر نقش موثر این محیط کشت بهینه در درمان زخم پوستی موش های دیابتی است.

Kwon و همکارانش برای درمان زخم فاسیایی موش‌های صحرایی دیابتی از سلول‌های استرومایی مزانشیمی مغز استخوان بهره گرفتند. آنها نشان دادند که تزریق سیستمیک و موضعی سلول‌ها به حیوان، معیارهای بیومکانیکی، میزان تولید کلاژن و میزان بیان فاکتورهای رشد مهم در فرایند ترمیم زخم را افزایش می دهد و با وجود آنکه در روش تزریق سیستمیک سلول‌ها افزایش معیارهای بیومکانیکی معنی‌دار نبود، اما میزان بیان فاکتورهای رشد نسبت به روش موضعی افزایش بیشتری می‌یافت. لازم به ذکر است که این محققان در مطالعه‌شان از سلول‌های بنیادی سینژنیک (سلول‌هایی که از دوقلوی همسان گرفته شده) استفاده نموده بودند، بنابراین مشکل رد پیوند را نداشتند، اما چنین امکانی در اکثر موارد کاربردی بالینی وجود ندارد (۱). Kuo و همکاران نیز برای درمان زخم موش‌های صحرایی دیابتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن استفاده نمودند و نشان دادند که تزریق وریدی دو مرحله‌ای این سلول‌ها می‌تواند تاثیر افزون‌تری بر روند ترمیم زخم داشته باشد. اما همچنان مشکل ایمنی‌زایی سلول‌های آلوژن امری اجتناب ناپذیر بود (۳۰). به همین خاطر در برخی مطالعات از سلول‌های بنیادی و پیش ساز مغز استخوان خود بیمار (به صورت اتولوگ) برای پیوند استفاده شد (۳۹، ۴۰). همچنین Fiorina و همکارانش با استفاده از تزریق فاکتورهای فراخواننده سلولهای بنیادی (نظیر SDF-1) به موشهای دیابتی، تاثیرگذاری سلول‌های پیش ساز مغز استخوان را بر روند ترمیم زخم بررسی نمودند (۲۸). هرچند در چنین مواردی دیگر شاهد ایمنی زایی و رد پیوند نخواهیم بود، اما با مشکل جدیدی مواجه خواهیم شد و آن ناکارآمدی سلولهای بنیادی افراد دیابتی است، که در گزارشات متعددی به آن اشاره می‌شود.

Stolzing و همکارانش با بررسی سلول‌های مشتق از مغز استخوان موش های دیابتی ثابت کردند که این سلول‌ها توانایی تکثیر و همچنین توانایی تمایز پایین‌تری نسبت به سلول‌های موش‌های سالم دارند (۴۱). همچنین Jin و همکارانش با بررسی بیشتر این سلول‌ها دریافتند که نه تنها خصوصیات تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی موش‌های دیابتی به طور معنی‌داری کاهش یافته، بلکه ترشحات پاراکراین آنها نیز نسبت به موش‌های سالم کاهش معنی‌داری می یابد (۴۲). بنابراین به نظر می‌رسد که بهترین راه برای استفاده از قابلیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون مواجه شدن با مسئله ایمنی‌زایی یا تومورزایی احتمالی آنها به خصوص برای ترمیم زخم‌های پوستی افراد دیابتی، استفاده از فاکتورهای مترشحه سلول‌های آلولوگ و یا هومولوگ آن است. Yew و همکارانش در سال ۲۰۱۱ این محیط بهینه را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان تهیه نموده و از آن برای ترمیم زخم موش‌های سالم استفاده نمودند و نشان دادند که این محیط بر روند التیام زخم‌ها تاثیر قابل ملاحظه‌ای دارد (۲).

در این مطالعه نیز اثر محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان بر استحکام زخم موش‌های دیابتی در شرایط in vivo مورد مطالعه قرار گرفت و بررسی‌های بیومکانیکی زخم‌های ترمیم یافته، اثر مثبت استفاده از این محیط کشت را اثبات نمود. در واقع با تزریق این محیط کشت بهینه به صورت وریدی می‌توان مدت زمان بیشتری فاکتورهای موثر موجود در این محیط را در گردش خون و مایعات بدن داشته باشیم و در صورتی که تزریق در دو مرحله انجام شود می‌تواند اثر بهتری را داشته باشد (۳۰).

از این مطالعه نتیجه گیری می‌شود که تزریق سیستمیک دومرحله‌ای محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان موجب افزایش استحکام زخم پوستی در موش‌های صحرایی دیابتی شده و معیارهای بیومکانیکی زخم‌های ترمیم یافته را افزایش می‌دهد. برای پی بردن به مکانیسم دقیق تاثیر این محیط کشت بهینه تحقیقات بیشتر با استفاده از روش‌های ارزیابی سلولی و مولکولی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین و همکاران این معاونت ابراز می‌دارند. همچنین از مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان به خاطر اهدای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی قدردانی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

REFERENCES

1. Kwon DS, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Danyluk AL, Bansal M, et al. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. Int Wound J 2008; 5: 453–63.
2. Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, et al. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. Cell Transplant 2011; 20 : 693-706.
3. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet 2005; 366:1736–43.
4. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds.J Burn Care Rehabil 2005; 26:306–19.
5. Nagi MK , Embil JM. Becaplermin: Recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. Expert Opin Biol Ther 2002; 2: 211-8
6. Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. Clin Plast Surg 2003; 30: 37-45.
7. Keswani SG, Katz AB, Lim FY, Zoltick P, Radu A, Alaee D, Herlyn M, Crombleholme TM. Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. Wound Repair Regen 2004; 12:497–504.
8. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. Diabetes 1988 ; 37: 371–6.
9. McNeely MJ, Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel VL, Reiber GE, Smith DG, Pecoraro RF. The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration. How great are the risks? Diabetes Care 1995; 18:216–19.
10. Spanheimer RG. Correlation between decreased collagen production in diabetic animals and in cells exposed to diabetic serum: response to insulin. Matrix 1992; 12: 101–7.
11. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet 2005; 366: 1736–43.
12. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. Lancet 2005; 366: 1719–24.
13. Bus SA, Valk G D, van Deursen RW, Armstrong DG, Caravaggi C, Hlavacek P, et al. Specific guidelines on footwear and offloading. Diabetes Metab Res Rev 2008; 24: S192–3.
14. Robson MC, Mustoe TA, Hunt TK. The future of recombinant growth factors in wound healing. Am J Surg 1998; 176:S80–82.
15. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Altrock BW, Pence PC, Heggers JP, Johnston GF.Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. Ann Plast Surg 1992; 29:193–201.
16. Robson MC, Phillips TJ, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, Jensen JL, Steed DL. Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. Wound Repair Regen 2001; 9:347–52.
17. Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. Clin Plast Surg 1998; 25:397–405.
18. Embil JM, Papp K, Sibbald G, Tousignant J, Smiell JM, Wong B, Lau CY. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. Wound Repair Regen 2000; 8:162–8.
19. Tsang MW, Wong WK, Hung CS, Lai KM, Tang W, Cheung EY, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EK. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. Diabetes Care 2003; 26:1856–61.
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284:143–47.
21. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997; 276: 71–74.
22. Piryaei A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. The role of ultraweb nano-fibrillar substrates in the differentiation of *in vitro* mouse bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocyte-like cells. Yakhteh Med J 2010; 12: 275-86.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri S.H, Piryaei A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biol Int 2008; 32: 1183-92.

24. Zaminy A, Shokrgozar MA, Sadeghi Y, Noroozian M, Heidari MH, Piryaei A. Transplantation of Schwann Cells Differentiated from Adipose Stem Cells Improves Functional Recovery in Rat Spinal Cord Injury. Arch Iran Med 2013; 16: 533 – 41.

25. Baghaban Eslaminejad M, Nikmahzar A, Eftekhari Yazdi P, Piryaei A. The structure of Human Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Cartilage in Micromass Culture System. Yakhte Medical Journal 2006; 8: 162-71.

26. Saheli M, Hosseini A, Piryaei A, Fadaei Fathabadi F, Bandehpour M, Salehi M, Norouzian M. Evaluation of the differentiation process of human bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells: An in vitro study. J Iran Anat Sci 2011; 9: 179-90.

27. Badillo Andrea T, Redden Robert A , Zhang Liping , Doolin Edward J, Liechty Kenneth W. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. Cell Tissue Res 2007; 329: 301-311.

28. Fiorina PG, Pietramaggiori G, Scherer SS, Jurewicz M, Mathews JC, Vergani A, et al. The mobilization and effect of endogenous bone marrow progenitor cells in diabetic wound healing. Cell Transplant 2010; 19: 1369-81.

29. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE.. Tredget. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Stem Cells 2007; 25: 2648–59.

30. Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, Wang FS, Chiang VC, Wang CJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. Plast Reconstr Surg 2011; 128: 872-80.

31. Phadnis SM, Ghaskadbi SM, Hardikar AA, Bhonde RR. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic patients portrait unique markers influenced by the diabetic microenvironment. Rev Diabet Stud 2009; 4: 260-70.

32. Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. Hum Gene Ther 2010; 12: 1641-55.

33. Yang JA, Chung HM, Won CH, Sung JH. Potential application of adipose-derived stem cells and their secretory factors to skin: discussion from both clinical and industrial viewpoints. Expert Opin Biol Ther 2010; 4: 495-503.

34. Piryaei A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. Differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. Stem Cell Rev 2011; 1: 103-18.

35. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PLoS One 2008; 3: e1886.

36. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays.Exp Cell Res 2010; 316: 1271-81.

37. Wang CY, Yang HB, Hsu HS, Chen LL, Tsai CC, Tsai KS, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats.J Tissue Eng Regen Med 2012; 6: 559-69.

38. Sharifian Z , Bayat M, Alidoust M , Farahani R.M , Bayat.M, Rezaie F, et al. Histological and gene expression analysis of the effects of pulsed low-level laser therapy on wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. Lasers Med Sci 2014; 29: 1227-35.

39. Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M, Yasuda K. Autologoustransplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. Int Angiol 2003; 22: 344–48.

40. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC. CD34 blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. J Vasc Res 2003; 40: 368–77.

41. Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes Induced Changes in Rat Mesenchymal Stem Cells. Cells Tissues Organs 2010; 191:453–65.

42. Jin P, Zhang X, Wu Y, Li L, Yin Q, Zheng L, et al. Streptozotocin-Induced Diabetic Rat–Derived Bone MarrowmMesenchymal Stem Cells HavemImpaired Abilities in Proliferation, Paracrine, Antiapoptosis, and Myogenic Differentiation. Transplant Proc 2010; 42: 2745–52.

Archive of SID

www.SID.ir