Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(98): 49-58

Effect of Human Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells Conditioned media on KGF and TGF-β1 Genes Expression in Diabetic Rats Wound

Raziyeh Kheirjou[1], Mohammad Hasan Heidari[1], Mohammad Bayat[1], Masoumeh Rajabi Bazl[2], Rasoul Ganji[1], Abbas Piryaei[1*]

1- Department of Biology and Anatomical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Clinical Biochemistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 25 Jan 2015, Accepted: 15 Apr 2015

Abstract

Background: Wound healing is a complex process that is impaired in diabetic patients due to several factors. So far, the positive effects of mesenchymal stem cells secretions in wound healing process have been reported. In this study, we investigated the effect of human mesenchymal stem cells Conditioned media on expression of effective factors involved in wound healing.

Materials and Methods: 27 rats were divided into 5 groups: no wound control, normal control, diabetic control, diabetic placebo and diabetic experimental. Diabetes was induced by Alloxan. A wound was created on the back of the rats. Then, the conditioned medium was prepared from mesenchymal stem cells. Diabetic experimental rats received 200 microliter of conditioned medium intravenously. The wounds were sampled and expression of KGF and TGF-β1 genes was examined by RT-PCR on days four and seven after wounding.

Results: In the diabetic experimental group, expression of KGF gene at fourth and seventh days had been non-significantly increased in comparison to diabetic control group. While, expression of TGF-β1 gene in diabetic experimental group compared to diabetic control group had been significantly ($p<0.05$) increased on fourth day, and non-significantly increased on seventh day.

Conclusion: It seems that using the conditioned medium derived from human mesenchymal stem cells positively affects the expression of trophic and inflammatory factors involved in diabetic skin wound healing.

Keywords: Conditioned medium, Gene expression, Mesenchymal stem cells, Diabetic wound healing

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology and Anatomical Sciences School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: piryae@sbmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۵ (شماره پیاپی ۹۸)، مرداد ۱۳۹۴، ۵۸-۴۹

تاثیر ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان بر بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 در زخم موش‌های صحرایی دیابتی

راضیه خیرجو[۱]، محمد حسن حیدری[۲]، محمد بیات[۲]، معصومه رجبی بذل[۳]، رسول گنجی[۱]، عباس پیریایی[۴*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- استادیار ، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: التیام زخم فرآیند پیچیده‌ای است که در بیماران دیابتی به خاطر عوامل مختلفی مختل شده است. تاکنون، تاثیر مثبت ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در فرآیند ترمیم زخم گزارش شده است. ما در این مطالعه تاثیر ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان را بر بیان فاکتورهای موثر در ترمیم زخم بررسی کردیم.

مواد و روش ها: ۲۷ سر موش صحرایی به ۵ گروه سالم بدون زخم، کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی پلاسبو و دیابتی تجربی تقسیم شدند و برای القاء دیابت، از آلوکسان استفاده شد. در ناحیه پشت موش‌ها یک زخم ایجاد گردید. سپس از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، محیط کشت بهینه تهیه شد. موش‌های گروه دیابتی تجربی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بهینه را به صورت تزریق داخل وریدی دریافت نمودند. چهار و هفت روز پس از ایجاد زخم، از زخم‌ها نمونه برداری شد و بیان فاکتورهای KGF و TGF-β1 به وسیله‌ی تکنیک RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در گروه دیابتی تجربی بیان ژن KGF در روزهای چهارم و هفتم، نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش غیر معنی‌دار یافته بود. در حالی که بیان ژن TGF-β1 در گروه دیابتی تجربی نسبت به گروه کنترل دیابتی در روز چهارم افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و در روز هفتم افزایش غیر معنی‌دار یافته بود.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد استفاده از محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان، تاثیر مثبتی بر بیان فاکتورهای تروفیک و التهابی درگیر در ترمیم زخم پوستی دیابتی داشته باشد.

واژگان کلیدی: محیط کشت بهینه، بیان ژن، سلول های بنیادی مزانشیمی، ترمیم زخم دیابتی

* **نویسنده مسئول**: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی

Email: piryae@sbmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

مقدمه

التیام زخم فرآیند پیچیده‌ای است شامل برهم کنش‌های میان انواع مختلفی از سلول‌ها، فاکتورهای رشد و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی(۱). این فرآیند پویای ترمیم زخم به سیگنال‌های سیستمیک هم‌چون فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و آنزیم‌های پروتئولیتیک نیز وابسته است(۲). با وجود پیشرفت در علم پزشکی و افزایش درک فرآیندهای سلولی و مولکولی وقایع زیستی، امروزه زخم‌های پوستی هم‌چنان به عنوان یک بحران برای سلامت انسان مطرح می‌باشند. یکی از مسائل مهمی که در این زمینه با آن رو به رو هستیم، عدم وجود درمان قابل قبول برای زخم‌هایی است که درمان آن‌ها به طول می‌انجامد. زخم‌های مزمن ناشی از بیماری دیابت یکی از آن‌هاست(۲، ۳).

طی سال‌های اخیر، دانشمندان زیادی برای درمان بسیاری از بیماری‌های صعب العلاج به استفاده از فن آوری سلول‌های بنیادی روی آورده‌اند که این راهکار شامل درمان زخم‌های دیابتی هم می‌شود. امروزه به خوبی می‌دانیم که این سلول‌ها نقش مهمی در فرآیندهای ترمیم بافت دارند(۴، ۵).

در برخی مطالعات آمده است که قابلیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی در افراد دیابتی نسبت به افراد طبیعی پایین‌تر می‌باشد. بنابراین می‌توان با پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی سالم، سرعت بسته شدن زخم و تولید اپیتلیوم و عروق خونی جدید را به طور قابل توجه افزایش داد(۱۱-۶). با وجود گزارشات موفقیت آمیز پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برخی از مطالعات، به نظر می‌رسد که این سلول‌ها دارای خاصیت ایمنی‌زایی می‌باشند و در عمل برای پایدار بودن این پیوند، باید از سرکوب سیستم ایمنی فرد گیرنده استفاده شود(۱۲). با استفاده از نتایج به دست آمده در برخی از مطالعات که تاثیر سلول‌های مزانشیمی بر روند ترمیم بافتی را به واسطه ترشحات پاراکرین آن‌ها گزارش کرده‌اند، در راهکارهای درمانی جدید می‌توان با حذف خود سلول و استفاده از تولیدات ترشحی آن، علاوه بر استفاده از مزایای این سلول‌ها، مشکلات احتمالی حضور این سلول‌ها در بدن فرد گیرنده را مرتفع ساخت(۱۳، ۱۴). در بعضی از مطالعات نیز از محیط کشتی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آن کشت داده شده (محیط کشت بهینه) و حاوی فاکتورهای مترشحه این سلول‌هاست و هم‌چنین تحت شرایط خاصی تهیه و تغلیظ گشته است به صورت اختصاصی برای ترمیم زخم افراد غیر دیابتی و دیابتی و ترمیم شکستگی‌های استخوانی استفاده شده است. این مطالعات تأثیر این محیط کشت بهینه بر تسریع بهبود زخم و ترمیم بافت را به اثبات رسانده‌اند(۱۷-۱۵).

در مطالعه حاضر، برای بهبود زخم موش‌های دیابتی از محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان استفاده گردید و به منظور بررسی تأثیر ترشحات این سلول‌ها، بیان فاکتور رشد تغییر شکل دهنده بتا یک (TGF-β1) و فاکتور رشد کراتینوسیت (KGF) در روند ترمیم زخم‌های دیابتی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۲۷ سر موش صحرایی نر بالغ سالم نژاد ویستار از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. موش‌ها در حیوان‌خانه‌ای با شریط استاندارد و دسترسی آزاد به آب و خوراک موش نگهداری شدند و به صورت تصادفی به ۵ گروه سالم بدون زخم، کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی پلاسبو (تحت درمان با محیط کشت پایه) و دیابتی تجربی (تحت درمان با محیط کشت بهینه) تقسیم شدند. گروه اول شامل ۳ سر بود و بقیه گروه‌ها ۶ سر را دربر می‌گرفتند که در روز چهارم از ۳ سر و و در روز هفتم از ۳ سر دیگر پس از ایجاد زخم نمونه‌برداری شد. کلیه‌ی مراحل نگهداری و تیمارهای انجام شده روی حیوانات، طبق جلسه‌ی ۱۴۳ مورخ

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

۹۲/۹/۱۰ مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی قرار گرفت.

نحوه ایجاد و تأیید دیابت

پس از سازگاری موش‌ها با حیوان‌خانه و قبل از القای دیابت، از انتهای دم همه موش‌ها خون ناشتا گرفته شد و قند خون آن‌ها به وسیله دستگاه پرتابل اندازه‌گیری قندخون(Biomine, Rightesttm GM300، سوئد) ثبت شد و موش‌هایی که قند خون طبیعی داشتند وارد مطالعه شدند. پودر آلوکسان (آلوکسان مونوهیدرات، شرکت سیگما آلدریچ، امریکا) در سرم فیزیولوژی تازه حل شد. سپس به منظور القای دیابت، ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر آلوکسان به صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه‌های دیابتی تزریق گردید. پس از گذشت یک هفته، مجددا از موش‌ها خون گرفته شد و قند خون آن‌ها ثبت گردید. در صورتی که میزان قند خون آن‌ها بالای ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود، دیابتی محسوب می‌شدند(۱۸). بعد از زمان تزریق آلوکسان به مدت یک ماه درنگ شد تا شرایط هایپرگلیسمی در موش‌ها تثبیت شود. لازم به ذکر است که اندازه‌گیری قندخون 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 از طریق تزریق داخل عضلانی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین (شرکت روتکس، آلمان) و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم دیازپام (شرکت گسترش و سرمایه گذاری دارویی، ایران) بی‌هوش شدند. پس از تراشیدن موی پشت آن‌ها و ضد عفونی کردن پوست، یک برش به وسیله‌ی تیغ جراحی شماره ۱۵ در این ناحیه ایجاد شد. طول این برش ۲ سانتی‌متر بود و فاصله دو لبه آن به وسیله یک بخیه در قسمت میانی زخم با فاصله تقریبی ۳ میلی‌متر حفظ شد(۱۸). پس از ایجاد زخم، موش‌های دیابتی به طور تصادفی به گروه‌های کنترل، پلاسبو و تجربی تقسیم شدند.

تهیه و تأیید سلول های 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 به منظور خالص سازی و تکثیر، تحت پاساژهای متوالی قرار گرفتند(۱۹) و پس از انجام پاساژ چهارم، از آن‌ها برای انجام مراحل بعدی تحقیق استفاده شد.

هم‌چنین برای تایید مزانشیمی بودن سلول‌ها، ویژگی‌های آن‌ها در پاساژ چهارم مورد ارزیابی قرار گرفت که عبارت بودند از: چسبندگی سلول‌ها به کف ظرف، ظاهر دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی سلول‌ها، قابلیت تمایز چند رده‌ای آن‌ها به سلول‌های استخوان و چربی تحت القای محیط‌های تمایز چربی و تمایز استخوان(۱۹).

تهیه محیط کشت بهینه

برای تهیه محیط کشت بهینه، زمانی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ چهارم حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد سطح فلاسک‌ها را پر کردند، دو مرتبه با محلول فسفات بافر سالین شسته شدند. سپس به هر فلاسک، محیط کشت DMEM (شرکت ایده زیست، ایران) فاقد سرم افزوده شد و برای ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از آن محیط کشت جمع‌آوری گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰ سانتریفیوژ (شرکت اپندورف، آلمان) شد تا خرده‌های سلولی موجود در آن حذف شود(۱۵، ۱۷). سرانجام محیط به دست آمده از طریق دستگاه لایوفیلایزر (Christ Alpha1-2 LD plus، آلمان) تا ۵۰ برابر تغلیظ شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

تیمار زخم های پوستی به کمک محیط کشت بهینه

دو گروه دیابتی تجربی و دیابتی پلاسبو به ترتیب تحت تیمار با محیط کشت بهینه و محیط کشت پایه قرار گرفتند و بقیه گروه‌ها مداخله درمانی نداشتند. بدین منظور، در فاصله زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از ایجاد زخم، در هر مرحله ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تغلیظ شده مورد نظر به صورت داخل وریدی به موش‌های این دو گروه تزریق شد.

نمونه‌برداری و آزمایش‌های مولکولی زخم‌های پوستی

در روزهای چهارم و هفتم پس از ایجاد زخم، موش‌های تحت مطالعه از طریق تزریق دوز بالای کتامین و دیازپام و القای بی‌هوشی عمیق قربانی شدند و نمونه‌های مورد نظر از ضخامت کامل پوست در محل بستر زخم تهیه شد. استخراج RNA از نمونه‌ها طبق پروتکل مربوطه در شرایط عاری از RNase و DNase و به کمک بافر لیز کننده RNX-Plus (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. RNA های کل سلول‌ها، از طریق آنزیم DNase (شرکت ترموساینتیفیک، امریکا) تیمار گردیدند و مقدار ۲ میکروگرم از آن‌ها با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت ترموسیاینتیفیک، امریکا) به cDNA تبدیل شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مخلوطی به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. این مخلوط شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت آمپلیکون، دانمارک)، ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو (ژن فن آوران، ایران)، ۱ میکرولیتر پرایمر پیرو (ژن فن آوران، ایران)، ۱ میکرولیتر cDNA و ۷ میکرولیتر آب مقطر بود. شرایط حرارتی دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندورف، آلمان) جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بدین شرح بود: دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه هر چرخه شامل مرحله دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای ژن GAPDH (گلیسرآلدئید۳- فسفات دهیدروژناز) به عنوان کنترل داخلی، در دمای ۵۸/۶ درجه سانتی‌گراد برای ژن KGF و در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد و برای ژن TGF-β1 به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در آخر، مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرها، کد ژن‌ها و طول محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نام ژن	توالی پرایمر	کد	طول محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (جفت باز)
KGF	F: 5´AGCGATCAACTCAAGGTCCA 3´ R: 5´GCTAGAACAGTTCACGCTCG 3´	NM-۰۲۲۱۸۲/۱	۲۰۸
TGF-β1	F: 5´CCTGCAAGACCATCGACATG 3´ R: 5´TGTTGTACAAAGCGAGCACC 3´	NM-۰۲۱۵۷۸/۲	۱۵۳
GAPDH	F: 5´AAACCTGCCAAGTATGATG 3´ R:5´GCATCAAAGGTGGAAGAATG 3´	NM-۰۱۷۰۰۸/۴	۱۴۲

(F): پرایمر پیشرو، (R): پرایمر پیرو

پس از انجام واکنش، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به مدت یک ساعت و با ولتاژ ۱۰۰ ولت برروی ژل آگاروز ۲ درصد بارگذاری گردیدند (الکتروفورز پدیده نوژن، ایران). ژل‌ها از طریق رنگ DNA گرین ویور (شرکت آریاتوس، ایران) رنگ آمیزی شدند و با دستگاه ژل داک (آران تجهیز، ایران)

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

عکس‌برداری گردیدند(شکل 1A). در نهایت، برای هر نمونه، دانسیته باندKGF و TGF-β1 به کمک نرم افزار Image J به دانسیته باند GAPDH همان نمونه نرمال شد و دانسیته به دست آمده گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه گردید. سرانجام برای رسم نمودار، میزان بیان ژن‌های تحت بررسی در پوست سالم بدون زخم برابر با یک در نظر گرفته شد و سایر گروه‌ها با آن و هم‌چنین با یکدیگر مقایسه شدند.

روش تحلیل داده‌ها

کلیه‌ی داده‌های کمی به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تحلیل شدند. ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها به وسیله‌ی آزمون کولموگروف اسمیرنوف تک نمونه بررسی شد. از آن‌جایی که داده‌های آزمایش مولکولی توزیع نرمالی نداشت، با روش مان ویتنی با یکدیگر مقایسه شدند. سرانجام داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند و ۰/۰۵ $p<$ از نظر آماری معنی‌دار محسوب گردید.

یافته ها

داده‌های آزمایش مولکولی نشان داد که در گروه کنترل سالم نسبت به گروه سالم بدون زخم، بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 در روز چهارم پس از ایجاد زخم تغییری رخ نداده؛ اما در روز هفتم میزان بیان ژن KGF در گروه کنترل سالم ۱±۲/۳۳ برابر و بیان ژن TGF-β1 به میزان ۰/۳۲±۱/۵۲ برابر افزایش داشت که این میزان افزایش در سطح ۰/۰۵$>p$ معنی‌دار بود.

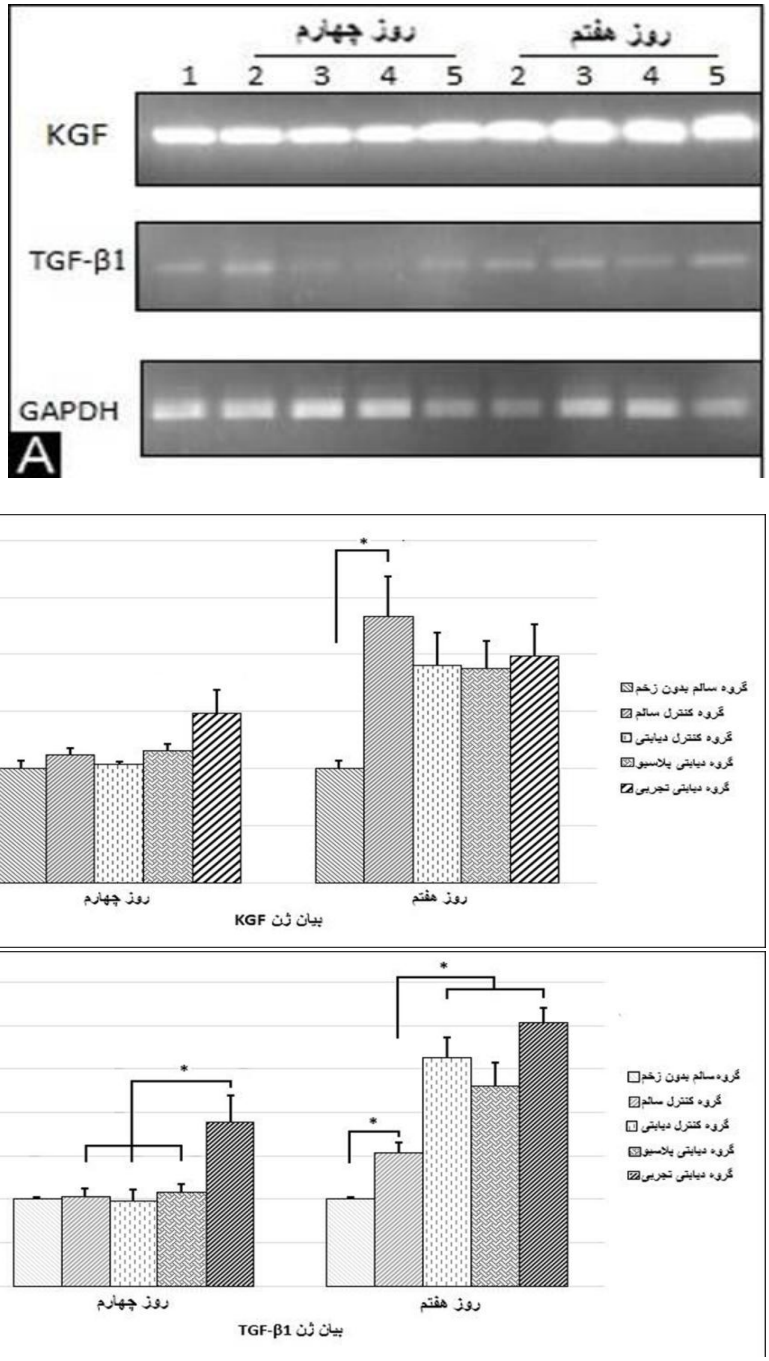
در موش‌های گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم، بیان ژن KGF در روز چهارم تفاوتی نداشت، اما در روز هفتم به صورت غیر معنی‌داری کاهش یافته بود. بیان ژن TGF-β1 نیز در روز چهارم، در موش‌های گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم تفاوتی را نشان نداد، اما در روز هفتم با افزایش معنی‌داری(۰/۰۵>p) همراه بود و به میزان ۰/۵۸۹±۲/۶۲۹ برابر بیان آن در پوست سالم بدون زخم رسید.

مقایسه داده‌های آزمایش مولکولی موش‌های گروه دیابتی تجربی با گروه کنترل دیابتی، برای بیان ژن KGF در روز چهارم و هفتم، افزایش معنی‌داری را نشان نداد. بیان ژن TGF-β1 در موش‌های گروه دیابتی تجربی روز چهارم در مقایسه با گروه کنترل دیابتی، افزایش معنی‌داری (۰/۰۵>p) یافته بود، به طوری که میزان بیان این ژن در گروه دیابتی تجربی به ۰/۷۶±۱/۸۸ برابر بیان آن در گروه سالم بدون زخم رسید. با وجود این که بیان این ژن در گروه دیابتی تجربی در روز هفتم در مقایسه با گروه کنترل دیابتی با افزایش همراه بود، اما تفاوت آن‌ها معنی‌دار نبود.

با مقایسه داده‌های به دست آمده از بیان ژن KGF در موش‌های گروه دیابتی تجربی و گروه کنترل سالم در روز چهارم، به افزایش غیر معنی‌داری در گروه دیابتی تجربی رسیدیم. اما مقایسه این دو گروه در روز هفتم، کاهش غیر معنی‌داری را در گروه دیابتی تجربی نشان داد. بیان ژن TGF-β1 در موش‌های گروه دیابتی تجربی روز چهارم و هفتم در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری(۰/۰۵>p) داشت، به صورتی که میزان بیان این ژن در روز چهارم به ۰/۷۶±۱/۸۸ برابر و در روز هفتم به ۰/۴±۳/۰۴ برابر بیان آن در گروه سالم بدون زخم رسیده بود.

هم‌چنین در موش‌های گروه کنترل دیابتی و گروه دیابتی پلاسبو، هیچ‌گونه تفاوتی بین داده‌های حاصل از بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 چه در روز چهارم و چه در روز هفتم پس از زخم مشاهده نشد(شکل 1B و 1C).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017



شکل۱. A) باندهای حاصل از واکنش RT-PCR بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 در روز چهارم و هفتم پس از ایجاد زخم. ۱)گروه سالم بدون زخم، ۲)گروه کنترل سالم، ۳)گروه کنترل دیابتی، ۴)گروه دیابتی پلاسبو و ۵)گروه دیابتی تجربی. B) نمودار بیان ژن KGF، C) نمودار بیان ژن TGF-β1؛ در هر دو نمودار داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است. علامت ستاره نشانه تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

بحث

در این تحقیق به منظور ارزیابی تاثیر محیط کشت بهینه حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر پارامترهای مولکولی دخیل در ترمیم زخم، به بررسی میزان بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 پرداخته شد. نتایج آزمایش مولکولی زخم‌های کنترل سالم، بیان‌گر افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 نسبت به پوست سالم بدون زخم در روز هفتم بود. در مطالعه‌ای که توسط ورنر و همکاران

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

انجام گرفت، نشان داده شد که بیان ژن KGF در روند ترمیم زخم طی ۲۴ ساعت پس از جراحت به میزان چشم‌گیری افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد و بیان این ژن مجددا از روز چهارم تا هشتم روند صعودی را نشان می‌دهد(۲۰). در مطالعه دیگری که توسط فرانک و همکاران انجام شد، مشخص گردید که بیان ژن TGF-β1 در روند ترمیم زخم طبیعی طی ۲۴ ساعت پس از ایجاد زخم، افزایش یافته و تا روز سوم در سطح بالا باقی می‌ماند و پس از آن روند نزولی در پیش گرفته و سپس از روز پنجم تا هفتم مجددا افزایش می‌یابد و پس از آن روند نزولی به خود می‌گیرد(۲۱). در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که وجود اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه در روز هفتم با روند افزایشی بیان ژن KGF در این روز و افزایش دوباره بیان ژن TGF-β1 قابل توجیه است.

بیان ژن TGF-β1 در زخم‌های گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم که در روز هفتم با افزایش معنی‌داری همراه بود، با بررسی که توسط اکوآ و همکاران در خصوص وضعیت التهابی در زخم‌های دیابتی انجام گرفت، مطابقت دارد. به این صورت که در فرآیند معیوب ترمیم زخم در افراد دیابتی، با کاهش نفوذ اولیه سلول‌های التهابی مواجه هستیم. از طرفی در چنین زخم‌هایی، پس ازشروع التهاب، ماندگاری نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به عنوان منبع بیان TGF-β1 موجب بروز یک پاسخ التهابی طولانی مدت می‌گردد(۲۲) و هر دوی این رخدادها به طور بالقوه مانع از التیام طبیعی زخم می‌شوند.

ارزیابی روند ترمیم زخم‌های دیابتی تحت درمان با محیط کشت بهینه، حاکی از افزایش معنی‌دار بیان ژن TGF-β1 در گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل دیابتی و دیابتی پلاسبو در روز چهارم بود. با توجه به طولانی بودن پاسخ التهابی در زخم‌های دیابتی و افزایش بیان ژن TGF-β1 در این زخم‌ها، افزایش بیشتر این ژن را در گروه تیمار شده با محیط کشت بهینه می‌توان با تأخیری بودن نوع زخم و نقش‌های متعدد فاکتور TGF-β1 توجیه نمود. نتایج مطالعه اشکروفت و همکاران نشان داد که TGF-β1 یک واسطه محوری و چند توان در ترمیم بافت است که هم در نفوذ و فعال سازی سلول‌های التهابی شرکت می‌کند و هم تاثیرات ایمونوساپرسیو دارد(۲۳). با در نظر گرفتن تاخیری بودن این نوع زخم که هم در شروع پاسخ التهابی و هم در پایان آن وجود دارد و با توجه به طولانی بودن پاسخ التهابی که پیش‌تر ذکر شد، می‌توان افزایش بیان ژن TGF-β1 در گروه تجربی روز چهارم را به راه اندازی پاسخ التهابی نسبت داد و افزایش بیان آن را در روز هفتم به عملکرد آن در سرکوب پاسخ التهابی طولانی مدت مربوط دانست.

در ضمن، نتایج حاصل از بررسی‌هایی که توسط بادیلو و همکاران و وون و همکاران بر زخم‌های دیابتی تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شد، نشان داد که بیان ژن TGF-β1 در روز سوم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل می‌یابد(۶). این در حالی است که آن‌ها نیز مشابه یافته‌های مطالعه حاضر، افزایش غیر معنی‌داری را در بیان ژن‌های KGF و TGF-β1 در روز هفتم گزارش نمودند(۱).

در تحلیل انجام شده توسط چن و همکاران روی محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیاری از واسطه‌های ترمیم بافت از جمله سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و فاکتورهای رشد به خصوص VEGF، EGF، KGF، TGF-β1را ترشح می‌کنند(۲۴). مطالعه پیشین ما نیز که در همین راستا و با سنجش استحکام زخم به روش تنسیومتری در روز پانزدهم(۲۵) و ارزیابی‌های بافت شناسی (داده‌ها هنوز منتشر نشده) انجام شد، حاکی از افزایش استحکام زخم و هم‌چنین بهبود پارامترهای بافت شناسی در گروه دیابتی تیمار شده با محیط کشت بهینه در مقایسه با گروه کنترل دیابتی است.

در نهایت، با مقایسه داده‌های مربوط به گروه کنترل دیابتی و دیابتی پلاسبو که همواره یکسان بوده و تفاوتی با یکدیگر نشان ندادند، می‌توان گفت که تفاوت‌های مشاهده شده در گروه تجربی ناشی از تأثیر مثبت محیط کشت بهینه است.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

در واقع، در مطالعه حاضر، تزریق دو مرحله ای محیط کشت بهینه موجب گردید که فاکتورهای موثر این محیط را برای مدت زمان بیشتری در جریان گردش خون و مایعات بدن داشته باشیم و در نتیجه تاثیر این فاکتورها را در ترمیم زخم مشاهده نماییم.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان می‌تواند تأثیر مثبتی بر بیان فاکتورهای تروفیک و التهابی درگیر در ترمیم زخم پوستی دیابتی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۱۳/۱۴۶۵ در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از مسئولان این معاونت به دلیل حمایت مالی‌شان و هم‌چنین مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان برای اهدای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

منابع

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. International wound journal. 2008;5(3):453-63.
2. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. Journal of Burn Care & Research. 2005; 26(4): 306-19.
3. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. The Lancet. 2005; 366(9498):1736-43.
4. Teoh H-K, Cheong S-K. Induced pluripotent stem cells in research and therapy. Malays J Pathol. 2012;34(1):1-13.
5. Burt RK, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr WG, Craig R, et al. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. Jama. 2008;299(8):925-36.
6. Badillo AT, Redden RA, Zhang L, Doolin EJ, Liechty KW. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. Cell and tissue research. 2007;329(2):301-11.
7. Fiorina P, 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 transplantation. 2010;19(11):1369-81.
8. Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, et al. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. Journal of surgical research. 2006; 136(2): 336-41.
9. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Stem cells. 2007;25(10):2648-59.
10. Kuo Y-R, Wang C-T, Cheng J-T, Wang F-S, Chiang Y-C, Wang C-J. Bone marrow–derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. Plastic and reconstructive surgery. 2011;128(4):872-80.
11. 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. The review of diabetic studies: RDS. 2009;6(4):260-70.
12. Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. Human gene therapy. 2010;21(12):1641-55.
13. Yang J-A, Chung H-M, Won C-H, Sung J-H. Potential application of adipose-derived stem cells and their secretory factors to skin: discussion from both clinical and industrial viewpoints. Expert opinion on biological therapy. 2010;10(4):495-503.
14. Yoon BS, Moon J-H, Jun EK, Kim J, Maeng I, Kim JS, et al. Secretory Profiles and Wound Healing Effects of Human Amniotic Fluid–Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem cells and development. 2009;19(6):887-902.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:33 +0330 on Sunday November 19th 2017

15. Yew T-L, Hung Y-T, Li H-Y, Chen H-W, Chen L-L, Tsai K-S, et al. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. Cell transplantation. 2011; 20(5):693-706.
16. Ansari MM, Sreekumar T, Chandra V, Dubey PK, Kumar GS, Amarpal SG. Therapeutic potential of canine bone marrow derived mesenchymal stem cells and its conditioned media in diabetic rat wound healing. J Stem Cell Res Ther. 2013;3(141):2-6.
17. Wang CY, Yang HB, Chen LL, Tsai CC, Tsai KS, Yew TL, et al., editors. Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats. J Tissue Eng Regen Med 2011; 10: 461–472.
18. Sharifian Z, Bayat M, Alidoust M, Farahani RM, 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 in medical science. 2014;29(3):1227-35.
19. 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 Medical Journal. 2010;12(2):275-86.
20. Werner S, Breeden M, Hübner G, Greenhalgh DG, Longaker MT. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. Journal of Investigative Dermatology. 1994;103(4):469-73.
21. Saed GM, Collins KL, Diamond MP. Transforming Growth Factors β1, β2 and β3 and their Receptors are Differentially Expressed in Human Peritoneal Fibroblasts in Response to Hypoxia. American Journal of Reproductive Immunology. 2002;48(6):387-93.
22. Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. Chemokines and diabetic wound healing. Vascular. 2007;15(6):350-5.
23. Ashcroft GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-β. Microbes and infection. 1999;1(15):1275-82.
24. Chen L, Tredget EE, Wu P, Wu Y, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PloS one. 2008; 3(4):e1886-7.
25. Ganji R, Piryaei A, Bayat M, RajabiBazl M, Mohsenifar Z, Kheirjoo R. The effect of human bone marrow-mesenchymal stem cells secretoms on diabetic wound healing. Pejouhesh. 2014;38(1):10-8.