مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ٤، مهر و آبان ۱٤۰۰(شماره پی در پی ۱٤۷)

اثر هیدروژل ژلاتینی حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم در موش‌های صحرایی نر دیابتی

سونا زارع [۱و۲]، محمدعلی نیلفروش‌زاده[۱]، رحیم احمدی [۲و۳*]، الهام ابکار[٤]

[۱]مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، [۲]گروه زیست‌شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران، [۳] کالج بین المللی اوسینا، بوداپست، مجارستان، [٤]گروه زیست‌شناسی، واحد تهران، دانشگاه آزاد علوم پزشکی، تهران، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰٦/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: علی‌رغم پژوهش‌های بسیار در مورد به کارگیری سلول‌های بنیادی در ترمیم زخم‌های دیابتی، اما نتایج هنوز هم چالش برانگیز می‌باشند. هدف از این تحقیق تعیین اثرات هیدروژل ژلاتینی حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم دیابتی در مدل حیوانی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ـ آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی جداسازی و تعیین هویت شدند. هیدروژل ژلاتین با استفاده از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی ساخته شد. القای دیابت در موش‌های صحرایی‌نر نژاد ویستار از طریق تزریق استرپتوزوتوسین انجام شد. متعاقباً زخم‌هایی به ضخامت ۰/۸سانتی‌متر در پشت موش‌ها ایجاد شد. حیوانات به دو گروه شاهد(تحت تیمار با نرمال‌سالین) و تیمار با هیدروژل حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی تقسیم‌بندی شدند. التیام زخم در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ روز پس از تیمار، از طریق تصاویر تهیه شده از زخم، ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی‌تست و آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: مساحت سطح زخم در گروه تیمار با "هیدروژل + سلول‌های بنیادی مزانشیمی" کاهش معنی‌داری در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ در مقایسه با اولین روز تیمار داشت(به ترتیب$p<0/01$، $p<0/001$ و $p<0/001$). بر خلاف گروه شاهد، مساحت سطح زخم در روز ۱٤ نسبت به روز ۷ در گروه تیمار دچار کاهش معنی‌داری گردید($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی انتقال یافته به وسیله هیدروژل ژلاتین به محل زخم، باعث ترمیم سریع‌تر زخم دیابتی شده و بر این اساس قابلیت استفاده به عنوان پانسمان زخمهای دیابتی را دارد.

واژه‌های کلیدی: هیدروژل ژلاتین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زخم دیابتی، موش صحرایی.

***نویسنده مسئول: رحیم احمدی، همدان،** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، گروه زیست‌شناسی

Email:drrahahmadi@yahoo.com

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قرن حاضر به شمار می‌رود که دارای نرخ بالای مرگ و میر در میان جوامع بشری است. این بیماری با عوارض متعددی از قبیل؛ عوارض چشمی، قلبی - عروقی، کلیوی و به ویژه زخم‌های مزمن پوستی همراه است که این زخم‌ها دارای تأخیر در بهبود هستند(۱). در واقع دیابت مسئول تأخیر یا اختلال در بهبود زخم است که اغلب منجر به تشکیل زخم مزمن می‌شود. زخم دیابتی یکی از عوارض مزمن دیابت است که به نوبه خود منجر عوارض بالینی مهم و حتی قطع عضو می‌شود. در افراد دیابتی به دلیل عدم تولید انسولین کافی، قند موجود در پلاسما افزایش یافته و همین امر سبب تنگی عروق خونی شده و متعاقباً اکسیژن‌رسانی به محل زخم کمتر می‌گردد. اختلال در اکسیژن رسانی به بافت آسیب دیده سبب اختلال در بهبود زخم دیابتی می‌شود(۲ و۱). درمان زخم‌های دیابتی یکی از چالش برانگیزترین موضوعات درمانی در پژوهش‌های پزشکی است. در سرتاسر جهان درمان‌های گوناگونی جهت التیام زخم‌ها به ویژه زخم‌های دیابتی تحت بررسی است و اخیراً استفاده از سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در التیام زخم دیابتی مورد توجه محققین قرار گرفته است(۲). سلول‌های بنیادی مزانشیم گروهی از سلول‌های بنیادی بالغ هستند که به صورت طبیعی در بدن وجود داشته و حضور این سلول‌ها در بافت‌های مختلف گزارش شده است. از مهم‌ترین ویژگی های این سلول‌ها، تعدیل سیستم ایمنی و چندتوان بودن آنهاست. بر این اساس، حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در موضع جراحت از شدت واکنش ایمنی بدن کاسته و آن را تعدیل می‌کند(۳) و این امر می‌تواند تأثیر به سزایی در التیام زخم‌ها داشته باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع متعددی مانند مغز استخوان و بافت چربی به دست می‌آیند. بافت چربی نوعی بافت همبند شل است که اغلب سلول‌های آن از نوع چربی می‌باشند، اما در عین حال دارای مخزن قابل توجهی از سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد(٤).

یافته‌های پژوهش‌های انجام یافته در خصوص تأثیر سلول‌های بنیادی بر ترمیم زخم‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی می‌توانند تأثیرات مثبتی در ترمیم آسیب‌های پوستی و زخم‌ها داشته باشد(٦ و٥). پژوهش‌های آزمایشگاهی در رابطه با اثر سلول‌های مزانشیمی بر التیام زخم‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادرند سبب تسریع در ترمیم زخم شوند(۷). یافته‌های پژوهشی بیانگر اثرات قابل ملاحظه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم آسیب‌های گوناگون پوستی بوده، همچنین بررسی‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم نیز اثر قابل توجهی دارند(۹ و ۸).

از سویی ژلاتین زیست پلیمری ناشی از هیدرولیز جزئی کلاژن است که به خاطر خواص زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، غیرسمی

بودن و نداشتن مواد سرطان‌زا در ساختار خود به طور گسترده در کاربردهای زیستی، پزشکی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از ژلاتین در دارو رسانی، پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت استفاده‌های بیشماری می کنند(۱۰). در صورتی که نیاز به بستر سه بعدی و ساختار داربست سلولی باشد، می‌توان ژلاتین را با استفاده از روش‌های مختلف به صورت اسفنج متخلخل سه بعدی تبدیل کرد. اسفنج متخلخل ژلاتین بستر مناسبی برای قرارگیری و رشد سلول‌ها به ویژه سلول‌های بنیادی ایجاد می‌کند تا بتوانند به آن بچسبند و رشد و تکثیر یابند. برای ساخت این بستر سه بعدی می‌توان از پیوندهای دایمی کوالانسی یا موقت هیدروژنی استفاده کرد . با استفاده از مولکول‌های شیمیایی یا آنزیم‌های زیستی، پیوندهای عرضی کوالانسی کنترل شده‌ای بین زنجیرهای پلیمر ایجاد می شود تا پلیمر سه بعدی شده و تثبیت گردد. هم‌چنین می‌توان با استفاده از پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین زنجیرهای مجاور ژلاتین مایع را به هیدروژل تبدیل کرد(۱۲ و۱۱).

با توجه به شیوع قابل توجه دیابت در جوامع مختلف و به تبع آن شیوع قابل توجه زخم‌های دیابتی مزمن در مبتلایان که سبب تحمیل هزینه‌های سنگینی درمانی بر سیستم سلامتی می‌گردد و نیز از آنجا که ترمیم زخم‌های دیابتی به روش‌های موسوم به سادگی امکان‌پذیر نبوده و به کارگیری روشهای مرسوم درمانی دارای نارسایی‌های متعددی است و هم‌چنین با توجه به گسترش امکان استفاده از هیدروژل‌های حاوی سلول‌های بنیادی به صورت پانسمان‌های بیولوژیک در ترمیم زخم‌ها و نیز از آنجا که پژوهش‌های انجام یافته در این خصوص هنوز با چالش‌های جدی همراه هست و نیاز به پژوهش‌های پایه‌ای بسیاری در مدل حیوانی جهت نیل به نتایج قابل قبول به منظور امکان استفاده از سلول‌های بنیادی در ترمیم زخم‌های دیابتی در نمونه‌های انسانی وجود دارد، بنابراین هدف از این مطالعه تعیین و اثر هیدروژل ژلاتینی حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم در موش‌های صحرایی نر دیابتی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ــ آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، بر مبنای پژوهش‌های پیشین(۱۳)، هیدروژل ژلاتین با غلظت۱۰ درصد وزنی/ حجمی تهیه شد. با توجه به حجم نهایی مورد نظر، پودر ژلاتین با ترازو وزن و به زیر هود منتقل و دوبار تحت اشعه UV قرار گرفت. سپس پودر ژلاتین در آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه حل گردید. متعاقباً برای ایجاد اتصالات عرضی بین رشته‌های ژلاتین از روش آنزیمی استفاده شد. در روش آنزیمی، آنزیم ترانس گلوتامیناز ۱۰ درصد به میزان ٤٠ میکرولیتر به ازای هر ۱ میلی‌لیتر محلول ژلاتین به ظرف اضافه شد. بعد از مخلوط شدن، مواد ظرف به مدت ٢٤ ساعت به انکوباتور منتقل شدند تا پیوندهای عرضی زنجیره‌های ژلاتین ایجاد شود. جهت بررسی خواص فیزیکی

سطحی هیدروژل از جمله تخلخل سنجی، تصویربرداری با میکروسکوپ SEM قرار گرفت(۱٤).

جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، با رعایت اصول اخلاق در پزشکی و دریافت رضایت نامه کتبی و بر مبنای نظر متخصص آماری در خصوص در نظرگیری حداقل جامعه آماری، ۱۰ بیمار متقاضی لیپوساکشن مراجعه کننده به مرکز پژوهش‌های پوست و سلول‌های بنیادی تحت بررسی تست‌های ویروسی سیفیلیس، ایدز، اپستاین بار، سایتومگالوویروس و هپاتیت قرار گرفتند تا سلامتی دهنده سلول‌های بنیادی تأیید شود. عمل جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی بر مبنای پژوهش‌های پیشین انجام گرفت(۱۵). به طور خلاصه بافت چربی پس از ریز ریز شدن تحت اثر کلاژناز نوع ۱ به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفته و بعد از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، لایه آبی و لایه چربی از هم جدا شدند. پلت حاصل در PBS شستشو داده شد و از صافی ۱۰۰ میکرومتری عبور داده شد. سلول‌های خونی لیز شده به مدت ۲ دقیقه با بافر حاوی آمونیوم کلراید، پتاسیم بی کربنات و EDTA انکوبه شده و متعاقباً مورد سانتریفیوژ قرار گرفته و از طریق شستشو با PBS از نمونه حذف شدند و بدین ترتیب پلت حاصل که حاوی فراکشن عروقی استرومایی بود، در محیط کشت کامل شامل محیط کشت پایه حداقل(α– MEM)، بافر HEPES، سدیم پیرووات و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ـ استرپتومایسین و گلوتامین قرار گرفته و در نهایت با PBS دوباره به حالت سوسپانسیون درآمد. به منظور تعیین تعداد سلول‌ها شمارش با لام نئوبار پس از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله انجام گرفت و به طور معمول از هر ۱ گرم بافت چربی حدود ۱×۱۰^{۵} سلول به دست آمد. سلول‌های به دست آمده در غلظت ۲×۱۰^{۳} سلول در هر سانتی‌متر مربع، بر روی ظرف مناسب کشت شده و پاساژ سلول‌ها تا رسیدن به حد یکنواختی مناسب انجام شد. این سلول‌ها پس از پاساژ سوم از نظر آلودگی‌های ویروسی، مایکوپلاسما و اندوتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جهت اثبات ماهیت مزانشیمی بودن سلول‌های کشت شده و تکثیر یافته با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نمونه‌های سلولی از نظر بیان سلول‌ها مارکرهای CD90 و CD105 مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین جهت بررسی پتانسیل تمایزی، قابلیت تمایز سلول‌ها به رده سلولی استخوان و چربی مورد بررسی قرار گرفت(۱٦). بدین منظور نمونه‌های سلولی در پلیت شش خانه قرار داده شدند و سپس با استفاده از محیط‌های تمایزی و فاکتورهای رشد اختصاصی مورد نیاز کشت شدند. بعد از ۲۱ روز سلول‌های تمایز یافته به استخوان با استفاده از رنگ آلیزارین رد و سلول‌های تمایز یافته به چربی با استفاده از رنگ اویل رد رنگ‌آمیزی شدند و تحت تصویربرداری قرار گرفتند.

جهت کشت سلول‌ها بر روی هیدروژل مطابق پژوهش‌های پیشین(۱۷)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تریپسینه شده و بر روی هیدروژل منتقل شدند. هیدروژل حاوی سلول در انکوباتور قرار داده شد و هر روز تعویض محیط انجام گرفت و رشد و چسبندگی سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفت.

به منظور بررسی میزان سمیت هیدروژل برای سلول‌ها از تست MTT استفاده شد(۱۸) و نتایج به صورت درصد زنده‌مانی نسبی سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شد.

بر اساس پژوهش‌های پیشین(۱۹) مدل دیابت با استفاده از تزریق یک دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین(STZ) به صورت داخل صفاقی، در رت‌ها القا گردید. پس از گذشت سه روز از تزریق، علایم دیابت مانند پرنوشی و پر ادراری در رت‌ها ظاهر گردید. چهار روز پس از تزریق، سطح گلوکز در نمونه‌خون گرفته شده از دم اندازه‌گیری شد و رت‌هایی که میزان گلوکز خون آن‌ها بیش از ۲٤٦ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود، به عنوان رت‌های دیابتی در نظر گرفته شدند.

جهت ایجاد زخم در موش‌های دیابتی طبق پروتکل مرسوم(۲۰) موش‌ها بیهوش شده و ناحیه پشتی آن‌ها کاملاً موزدایی شد و با الکل و بتادین ضدعفونی گردید و پس از آن با قرار دادن پانچ ۰/۸ میلی‌متر استریل در ناحیه پشتی موش‌ها، زخمی مشابه قالب با برداشتن تمام ضخامت پوست شامل اپیدرم و درم ایجاد شد. آن‌گاه ناحیه زخم با گاز استریل و نرمال سالین تمیز گردید.

موش‌های دیابتی دارای زخم به به دو گروه ۷ سری شامل؛ گروه شاهد(تحت تیمار با نرمال‌سالین) و گروه تست(تحت تیمار با هیدروژل حاوی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی) تقسیم‌بندی شدند. در گروه شاهد محل زخم با نرمال سالین تیمار گردید. در گروه تجربی، ابتدا هیدروژل حاوی سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی قرار داده شد و سپس لایه سیلیکونی محافظ زخم بر روی زخم قرار گرفته و با چسب شفاف پوشانده شد.

در این مرحله، ظاهر زخم، میزان ترمیم و بسته شدن آن در روزهای ۰، ۷، ۱٤ و ۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. عکس‌برداری از حیوان‌ها در شرایط یکسان و استاندارد در اتاق عمل در روزهای ۰، ۷، ۱٤ و ۲۱ انجام شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تی‌تست، تی مستقل، آنالیز واریانس درون آزمودنی یک‌طرفه و تعقیبی بنفرونی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژیک نتایج نشان دادند غلظت ۱۰ درصد ژلاتین تهیه شده از قوام خوبی برخوردار بود(شکل ۱). رنگ نمونه‌ها شیری و از شفافیت نسبی برخوردار بود، بر اساس نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپ SEM و تفسیر مشاهدات ابژکتیو انجام

گرفته به وسیله متخصص حوزه میکروسکوپ SEM ، مشخص شد هیدروژل های ساخته شده با استفاده از روش‌های آنزیمی و شیمیایی در مقایسه با روش فیزیکی دارای منافذ کوچک‌تر بودند، این امر نشان دهنده ایجاد پیوندهای عرضی بیشتر و قوی‌تر کوالانسی در این هیدروژل‌ها بود(جدول۲).

نتایج حاصل از بررسیMTT نشان داد که درصد زنده مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی هیدروژل برابر ۰/۵۵±۸۵ بود که مطابق با تجربیات محققین این پژوهش مبین سیتوتوکسیسیته قابل قبول جهت پیوند سلول‌ها به بافت‌های هدف می‌باشد.

نتایج نشان دادند که سلول‌های جداسازی شده از بافت چربی به روش آنزیمی مورد استفاده در این پژوهش دارای زنده مانی بالایی بود. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های جدا شده از بافت چربی انسان نشان دادند که میزان زنده مانی این سلول‌ها در روز جداسازی برابر ۹۸/۹۶ درصد و میزان آپاپتوز آنها برابر ۱/۰٤درصد بود(شکل۳).

هم‌چنین بررسی بیان مارکرهای تخصصی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی با فلوسایتومتری نشان دادند که این سلول‌ها مارکرهای CD90 و CD105 را بیان می‌کنند و این امر موید ماهیت مزانشیمی سلول‌های جدا شده از بافت چربی بود(شکل ٤).

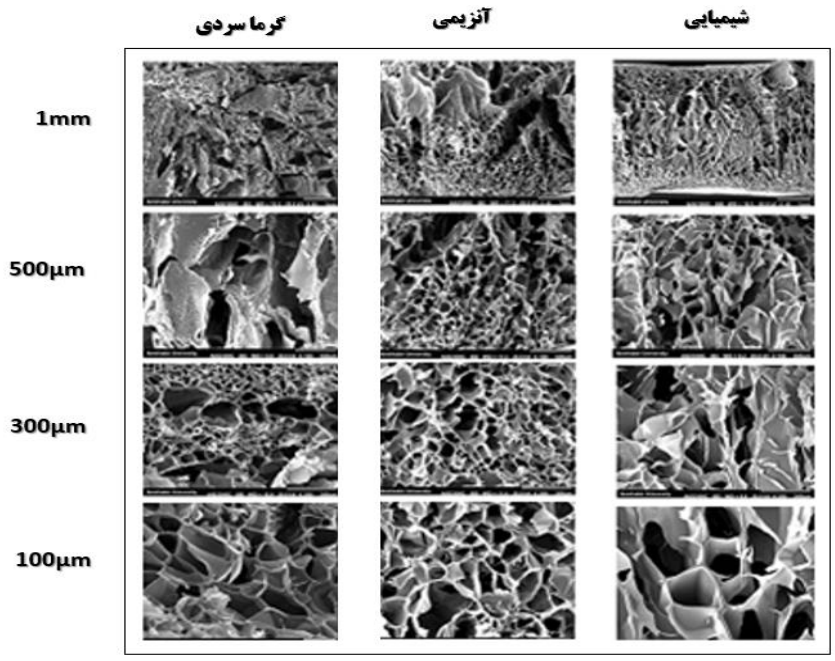
از سویی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی به سلول‌های چربی و استخوان نشان داد این سلول‌ها ویژگی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارا بودند(شکل۵). در نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته به استخوان، وجود توده‌های قرمز رنگ و اثبات کننده مورفولوژی سلول استخوانی بود، از طرفی در نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های چربی، وجود واکوئل‌های چربی به رنگ زرد و اثبات کننده مورفولوژی سلول چربی بود.

بررسی کیفی ترمیم زخم در گروه تحت تیمار با هیدروژل و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی نشان داد که ترمیم زخم و جوش خوردن مکانیکی زخم در گروه تیمار با سرعت بیشتری نسبت به گروه شاهد انجام می گیرد(شکل ٦).

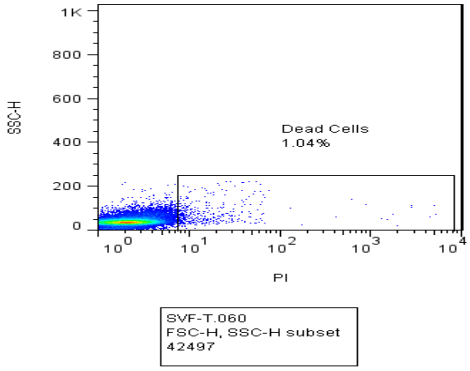
نتایج حاصل از بررسی مساحت سطح زخم با نرم افزار Image J نشانگر آن بودند که در گروه شاهد مساحت زخم در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱ نسبت به روز ۰ دارای کاهش معنی‌داری بود($p<0/01$). از سویی گرچه مساحت سطح زخم در روز ١٤ نسبت به روز ۷ تفاوت معنی‌داری نداشت، اما در روز ۲۱ نسبت به روز ١٤ کاهش معنی‌داری در سطح زخم مشاهده گردید($p<0/05$). مساحت سطح زخم در گروه تیمار با "هیدروژل + سلول‌های بنیادی مزانشیمی" نیز کاهش معنی‌داری در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱ در مقایسه با روز ۰ از خود نشان داد(به ترتیب؛ $p<0/01$، $p<0/001$ و $p<0/001$). از طرفی بر خلاف گروه شاهد مساحت سطح زخم در روز ١٤ نسبت به روز ۷ نیز دچار کاهش معنی‌داری گردید($p<0/05$). هم‌چنین این

کـاهش معنـی‌دار در روز ۲۱ نسـبت بـه روز ۱٤ نیـز مشاهده شد(p<۰/۰۵)، اما یافته های مهم در خصـوص ترمیم زخم در گروه‌ها مربوط به تفـاوت سـطح زخـم میان گروه‌هـای شـاهد و تیمـار در روزهـای مختلـف می‌باشد. در این راستا نتایج تجزیه و تحلیل تصـویرها نشان دادند که مساحت زخم در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ در گـروه تیمـار نسـبت بـه گـروه شـاهد بـه طـور معنی‌داری کمتر بوده، این امر نشانگر سـرعت بیشـتر ترمیم زخـم در گـروه تیمـار نسـبت بـه گـروه شـاهد بود(جداول ۱ و ۲).

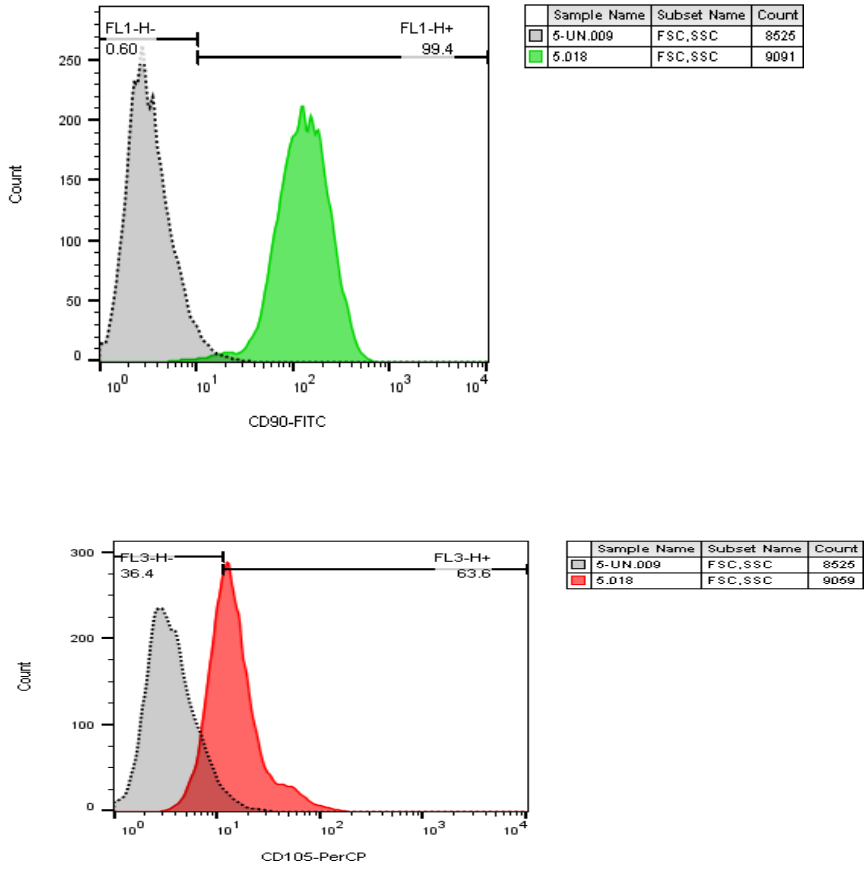
شکل ۱: بررسی مورفولوژیک قوام هیدورژل ساخته شده



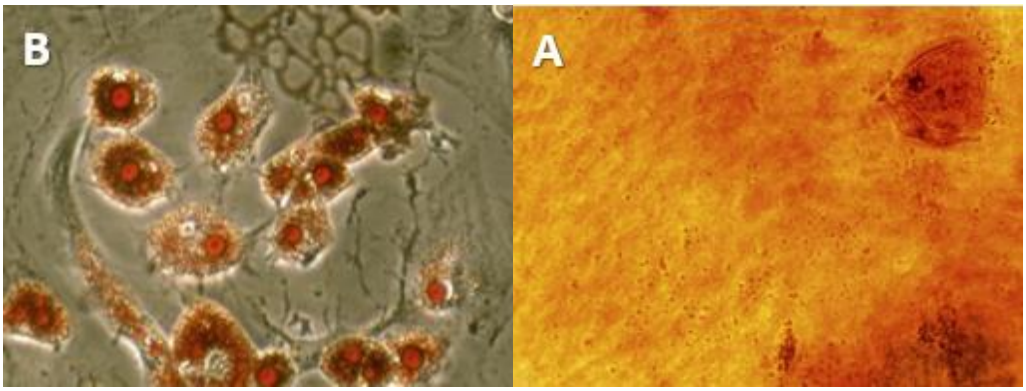
شکل ۲: تصاویر SEM هیدروژل تهیه شده با سه روش گرماسردی، آنزیمی و شیمیایی



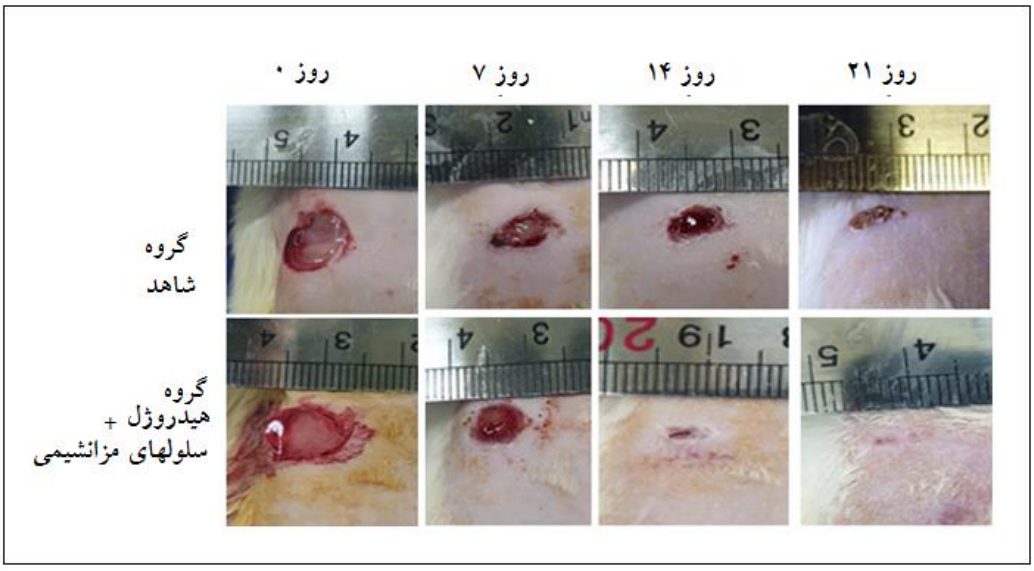
شکل۳ : نتایج فلوسایتومتری در خصوص درصد زنده مانی و آپوپتوز در سلول‌های جدا شده از بافت چربی انسان



شکل ٤: نتایج فلوسایتومتری در خصوص بیان مارکرهای CD90 و CD105 در سلول‌های جدا شده از بافت چربی انسان



شکل ٥: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف به سلول‌های استخوان(A) و چربی(B)



شکل ٦: تغییرات سطح زخم در روزهای ۰ (روز ایجاد زخم)، ۷، ١٤ و ٢١ در موش‌های صحرایی نر دیابتی

جدول ١: بررسی مساحت زخم در گروه‌های شاهد و تیمار شده با "هیدروژل + سلول‌های بنیادی مزانشیمی" بین روزهای ۰ (اولین روز تیمار)، ۷، ١٤ و ٢١ در موش‌های صحرایی نر دیابتی

روز	انحراف‌معیار± میانگین	P1 (شاهد)	P2 (شاهد)	P3 (شاهد)	انحراف‌معیار± میانگین	P1 تیمار	P2 تیمار	P3 تیمار
روز ۰	۰/۰۵۹۹±۰/۰۲۹	–	–	–	۰/۰۵۹۹±۰/۰۰۳	–	–	–
روز ۷	۰/۲۹٤±۰/۰۰۷	p<۰/۰۱	–	–	۰/۲۲۳±۰/۰۱٦	p<۰/۰۱	–	–
روز ١٤	۰/۲۳۲±۰/۰۲٤	p<۰/۰۱	N.S	–	۰/۰۵۳±۰/۰۰٤	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۵	–
روز ٢١	۰/۰۵۹±۰/۰۰۵	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱	p<۰/۰۵	۰/۰۱۷±۰/۰۰۲	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۱	p<۰/۰۵

N.S بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار می‌باشد. مقادیر p1 در مقایسه با روز ۰، مقادیر p2 در مقایسه با روز ۷ و مقادیر p3 در مقایسه با روز ١٤ بیان شده است.

جدول ۲: بررسی مساحت زخم بین گروه‌های گروه‌های شاهد و تیمار شده با "هیدروژل + سلول‌های بنیادی مزانشیمی" در روزهای روزهای ۰ (اولین روز تیمار)، ۷، ۱۴ و ۲۱ در موش‌های صحرایی نر دیابتی

گروه	انحراف‌معیار± میانگین	p (روز ۰)	انحراف‌معیار± میانگین	p (روز ۷)	انحراف‌معیار±میانگین	p (روز ۱۴)	انحراف‌معیار±میانگین	p (روز ۲۱)
کنترل	۰/۵۹۹±۰/۰۲۹	–	۰/۲۹۴±۰/۰۰۷	–	۰/۲۳۲±۰/۰۲۴	–	۰/۰۵۹±۰/۰۰۵	–
هیدروژل+MSCs	۰/۵۹۹±۰/۰۰۳	(P=۰/۲۴۸) N.S	۰/۲۲۳±۰/۰۱۶	(P=۰/۰۱۵) P<۰/۰۵	۰/۰۵۳±۰/۰۰۴	(P=۰/۰۱۶) P<۰/۰۵	۰/۰۱۷±۰/۰۰۲	(P=۰/۰۰۱) P<۰/۰۱

N.S بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار می‌باشد. مقادیر P در مقایسه با گروه کنترل بیان شده است.

بحث

از دیرباز روش‌های متعددی جهت التیام زخم‌های دیابتی به کار رفته است، اما اخیراً استفاده از سلول‌های بنیادی در التیام زخمهای دیابتی مورد توجه محققین قرار گرفته است. اگر چه نتایج پژوهش‌ها در این حوزه با چالش‌های جدی روبرو می‌باشد، براین مبنا تحقیق حاضر به بررسی اثر هیدروژل ژلاتینی حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم دیابتی در مدل حیوانی پرداخته است. نتایج نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق ازبافت چربی که بر روی هیدروژل ژلاتینی سوار شده و به ناحیه زخم انتقال داده می‌شوند، می‌توانند به طور معنی‌داری سبب تسریع در التیام زخم دیابتی شوند. از سویی با توجه به سیتوکسیسیته پایین هیدروژل ژلاتین، این داربست می‌تواند داربست قابل قبولی جهت ایجاد بستری مناسب به منظور انتقال سلول‌های بنیادی به بافت‌های هدف، مد نظر قرار گیرد. با توجه به شیوع بسیار گسترده‌ای دیابت در جهان(۲۱) و ایران(۲۲) و به تبع آن شیوع زخم‌های دیابتی در میان مبتلایان و دیر بهبودی زخم در افراد مبتلا، یاقته پژوهش حاضر می‌تواند در حوزه بررسی روش‌های درمانی زخم‌های دیابتی با استفاده از سلول درمانی حایز اهمیت باشد.

در واقع از دیرباز روش‌های متعددی جهت التیام زخم‌های دیابتی به کار رفته است، اما در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی، به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در التیام زخم‌های دیابتی مورد توجه محققین قرار گرفته است(۸-۵). اگرچه استفاده از سلول‌های بنیادی در ترمیم زخم‌ها به دلیل پتانسیل سلول‌های بنیادی در القای تکثیر غیرقابل تنظیم مخالفانی جدی نیز دارد(۲۳)، اما با توجه به نتایج قابل توجه بهبودی بخش سلول‌های بنیادی در حوزه ترمیم زخم‌ها، به نظر می‌آید اخیرا" به کارگیری سلول‌های بنیادی در ترمیم زخم‌ها، طرفداران زیادی را جذب خود کرده است. موافق با یافته‌های تحقیق حاضر، پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند هیدروژل‌ها می‌توانند به عنوان یک داربست مناسب جهت انتقال سلول‌ها به بافت‌های هدف مورد استفاده قرار گیرند. در واقع هیدروژل ژلاتینی یکی از پرکاربردترین هیدروژل جهت انتقال سلول‌های بنیادی به بافت‌های هدف می‌باشد(۱۰). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این نوع از هیدروژل به سلول‌ها آسیب وارد نمی‌آورند و می‌توانند سلول‌ها را به سلامتی به بافت هدف انتقال دهند(۱۱). از طرفی نتایج پژوهش‌ها نشان داده‌اند که

سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت‌های مختلف از جمله بافت‌های پوست، بند ناف و مغز استخوان می‌توانند در بهبود زخم‌های حاصل از سوختگی، صدمات مکانیکی و بیماری‌ها به ویژه دیابت چه در مدل‌های حیوانی و چه در نمونه‌های انسانی نقش بسیار برجسته‌ای داشته باشند. در پژوهش انجام یافته در خصوص بررسی اثرات سلول‌های مزانشیمی بر بهبود زخم پای دیابتی، نتایج نشان دادند که این سلول‌ها نقش برجسته‌ای در تسریع التیام زخم دارا هستند(۲٤). هم‌چنین نتایج مطالعه دیگری نشان می‌دهد که اگزوزم‌های مشتق از سلول‌های استرومای مزانشیمی می‌توانند به عنوان ابزاری در درمان زخم های مزمن مورد استفاده قرار گیرند(۲۵). از طرفی، یافته‌های حاصل از تحقیق انجام یافته در خصوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و مغز استخوان نشان دادند که این سلول‌ها با روش همسانی سبب تسریع در التیام زخم دیابتی می‌شوند(۲٦). پژوهش‌های انجام یافته در خصوص اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی بر زخم‌های دیابتی نیز نشان دادند که این سلول‌ها می توانند با القای تکثیر سلول‌های بافتی و تحریک ترشح عوامل رشد و تکثیر در بافت هدف سبب تسریع التیام زخم دیابتی شوند(۲۷). هم‌چنین یافته‌های حاصل از پژوهش‌های انجام یافته بر پیوند سلول‌های بنیادی در بافت پوست آسیب دیده، نشانگر آن است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند اثر بهبودی بخشی بر طیف قابل توجهی از آسیب‌های پوستی اعمال نمایند(۲۹ و ۲۸). طی پژوهش‌های متعددی که در خصوص اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر فرآیند التیام زخم پوستی انجام گرفته است، نتایج به وضوح نشان داده‌اند که این سلول‌ها نقش مهمی در التیام زخم‌ها چه در نمونه‌های حیوانی دیابتی و چه در نمونه‌های غیر دیابتی داشته باشند(۳۲ـ۳۰). در مقابل، برخی یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که استفاده از سلول‌های بنیادین به طور کلی نه تنها دارای اثر قابل توجهی بر ترمیم زخم نیستند، بلکه می‌توانند خصلت تومورزایی نیز داشته باشند(۳۳).

از نظر مکانیسم عمل اثر سلول‌های بنیادی بر ترمیم زخم می‌توان گفت با توجه به توانایی سلول‌های بنیادی در القای سلول‌های سالم جهت تکثیر و نیز القای رگزایی در بافت‌های هدف و از طرفی القای کلاژن سازی و نیز سایر پروتیین‌های درگیر در ترمیم زخم(۵ـ۳ و۲۳)، این سلول‌ها با تأثیری همه جانبه در مسیر ترمیم زخم قادرند سبب تسریع التیام زخم شوند.

تحقیق حاضر از نظر بررسی تغییرات سلولی و مولکولی به ویژه پژوهش‌های میکروسکوپ الکترونی و بررسی بیان پروتیین‌ها و ژن‌های مؤثر بر ترمیم در ناحیه زخم، دارای محدویت می‌باشد. در ادامه این تحقیق، بررسی اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر بیان ژن‌ها و پروتیین‌های مؤثر در ترمیم بافت پوست در ناحیه زخم و نیز بررسی عوارض جانبی احتمالی در مدل حیوانی حایز اهمیت خواهد بود.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که هیدروژل ژلاتینی می‌تواند با انتقال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به محل زخم، باعث ترمیم سریع‌تر زخم دیابتی شده و بر این اساس بررسی استفاده از این پانسمان در ترمیم زخم‌های دیابتی و احتمالاً سایر زخم‌ها در بیماران، می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر برگرفته از طرح پژوهشی مصوب مرکز پوست و سلول های بنیادی دانشگاه تهران با اخذ کد اخلاق از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 و نیز از طرف سازمان پزشکی قانونی کشور با شناسه IR.LMO.REC.1397.021 می‌باشد. بدین وسیله از حمایت های مالی و معنوی پوست و سلول های بنیادی دانشگاه تهران تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1.Lateef H, Abatan OI, Aslam MN, Stevens MJ, Varani J. Topical pretreatment of diabetic rats with all-trans retinoic acid improves healing of subsequently induced abrasion wounds. Diabetes 2005; 54(3): 855-61.
2.Moura LI, Dias AM, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—a review. Acta Biomaterialia 2013; 9(7): 7093-114.
3.Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2014; 32(6): 1408-19.
4.Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, Delbono O. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. Stem Cells and Development 2013; 22(16): 2298-314.
5.Lim KH, Itinteang T, Davis PF, Tan ST. Stem cells in keloid lesions: a review. Plast Reconstr Surg Glob Open 2019; 7(5): e2228.
6.Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. Tissue Eng 2007; 13(6): 1299–312.
7.Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, et al. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. Transplant Proc 2005; 37(1): 292-4.
8.Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjou Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. Diabetes Research and Clinical Practice 2011; 93(2): 228-34.
9.Kim WS, Park BS, Sung JH. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. Expert Opin Biol Ther 2009; 9(7): 879–87.
10.Thakur S, Govender PP, Mamo MA, Tamulevicius S, Thakur VK. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond. Vacuum 2017; 146: 396-408.
11.Ishida K, Kuroda R, Miwa M, Tabata Y, Hokugo A, Kawamoto T, et al. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. Tissue Engineering 2007; 13(5): 1103-12.
12.Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, Sugimoto K, Mushimoto K, Morita S, et al. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. Tissue Engineering 2005; 11(7-8): 1224-33.
13.Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. Scientific Reports 2018; 25; 8(1): 1-3.
14.Sisakht MM, Nilforoushzadeh MA, Verdi J, Banafshe HR, Naraghi ZS, Mortazavi-Tabatabaei SA. Fibrin-collagen hydrogel as a scaffold for dermoepidermal skin substitute, preparation and characterization. Journal of Contemporary Medical Sciences 2019; 5(1): 8-13.
15.Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. Cell Transplantation 2011; 20(2): 205-16.
16.Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord. Scientific Reports 2018; 8(1): 1-9.
17.Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. Scientific Reports 2018; 8(1): 1-3.
18.Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. Scientific Reports 2018; 8(1): 1-3.
19.Kouhbananinejad SM, Derakhshani A, Vahidi R, Dabiri S, Fatemi A, Armin F, Farsinejad A. A fibrinous and allogeneic fibroblast-enriched membrane as a biocompatible material can improve diabetic wound healing. Biomaterials Science 2019; 7(5): 1949-61.
20.Kouhbananinejad SM, Derakhshani A, Vahidi R, Dabiri S, Fatemi A, Armin F, et al. A fibrinous and allogeneic fibroblast-enriched membrane as a biocompatible material can improve diabetic wound healing. Biomaterials Science 2019; 7(5): 1949-61.

21.Amiel SA, Aschner P, Childs B, Cryer PE, de Galan BE, Frier BM, et al. Hypoglycaemia, cardiovascular disease, and mortality in diabetes: epidemiology, pathogenesis, and management. The Lancet Diabetes & Endocrinology 2019; 7(5): 385-96.
22.Esteghamati A, Larijani B, Aghajani MH, Ghaemi F, Kermanchi J, Shahrami A, et al. Diabetes in Iran: prospective analysis from first nationwide diabetes report of National Program for Prevention and Control of Diabetes (NPPCD-2016). Scientific Reports 2017; 7(1): 1-0.
23.Peterson SE, Garitaonandia I, Loring JF. The tumorigenic potential of pluripotent stem cells: What can we do to minimize it?. Bioessays 2016; 38: S86-95.
24.Cao Y, Gang X, Sun C, Wang G. Mesenchymal stem cells improve healing of diabetic foot ulcer. J Diabetes Res 2017; 2017: 9328347.
25.Roşca AM, Ţuţuianu R, Titorencu ID. Mesenchymal stromal cells derived exosomes as tools for chronic wound healing therapy. Rom J Morphol Embryol 2018; 59(3): 655-62.
26.Guo J, Hu H, Gorecka J, Bai H, He H, Assi R, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing in a similar fashion as bone marrow-derived cells. Am J Physiol Cell Physiol 2018; 315(6): C885-96.
27.Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjou Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. Diabetes Res Clin Pract 2011; 93(2): 228-34.
28.Liu R, Chang W, Li J, Cheng Y, Dang E, Yang X, et al. Mesenchymal stem cells in psoriatic lesions affect the skin microenvironment through circular RNA. Exp Dermatol 2019; 28(3): 292-99.
29.Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner GC. Stem cell therapies for wound healing. Expert Opin Biol Ther 2019; 19(6): 575-85.
30.Badillo Andrea T, Redden Robert A , Zhang L, Doolin Edward J, Liechty Kenneth W. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. Cell Tissue Res 2007; 329: 301-11.
31.Saheli M, Hosseini A, Piryaei A, Fadaei Fathabadi F, Bandehpour M, Salehi M, et al. 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.
32.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.
33.Ku CH, Johnson PH, Batten P, Sarathchandra P, Chambers RC, Taylor PM, et al. Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. Cardiovascular Research 2006; 71(3): 548-56.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Gelatinous Hydrogel Containing Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells on Wound Healing in Diabetic Male Rats

Zare S[1,2], Nilforuzadeh MA[1], Ahmadi R[2,3]*, Abkar E[4]

[1]Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran,[2]Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran,[3]Avicenna International College, Budapest, Hungary,[4]Department of Biology, School of Advanced Technologies, Medical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 30 Oct 2020 Accepted: 30 Aug 2021

Abstract:

Background & aim: Despite many studies carried out on the application of stem cells in the healing of diabetic wounds, the results are still challenging. The aim of the present study was to determine the effects of gelatin hydrogel containing adipose-derived mesenchymal stem cells on diabetic wound healing in animal model.

Methods: In the present experimental-laboratory study conducted in 2019, mesenchymal stem cells were isolated from human adipose tissue and at that point characterized. The gelatin hydrogel was made using the microbial transglutaminase enzyme. Diabetes was induced in Wistar male rats by injecting streptozotocin. Subsequently, 0.8 cm thick wounds appeared on the backs of the mice. Animals were divided into control groups (treated with normal saline) and treated group with hydrogels containing adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Wound healing was assessed on days 7, 14 and 21 days after treatment through wound imaging. Data were analyzed using t-test and one-way analysis of variance.

Results: The wound area decreased significantly in rats treated with “hydrogel + mesenchymal stem cells” on post-treatment days 7, 14 and 21 compared to first day of treatment ($P<0.01$, 0.001 and $P<0.001$, respectively). Unlike control group, the wound area significantly decreased on day 14 compared with day 7 in treated group.

Conclusion: Mesenchymal stem cells transported by gelatin hydrogel to the wound site, cause faster healing of diabetic wounds, therefore, can be used as a dressing for diabetic wounds.

Keywords: Gelatin Hydrogel, Mesenchymal Stem Cells, Diabetic Wound, Rat.

***Corresponding author: Ahmadi R,** Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran. AIC, Budapest, Hungary
Email: drrahahmadi@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Zare S, Nilforuzadeh MA, Ahmadi R, Abkar E. The Effect of Gelatinous Hydrogel Containing Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells on Wound Healing in Diabetic Male Rats. Armaghane-danesh 2021; 26(4): 464-478.