Research Paper

The effect of spraying the suspension containing adipose derived mesenchymal stem cells on diabetic wound healing and collagen synthesis in skin tissue in an animal model

Sona Zare[1], Rahim Ahmadi[2]*, Pouria Ghiaee[3]

1. Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
3. Department of Medical Immunology, Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Keramn, Iran

*** Corresponding author e-mail: drrahahmadi@yahoo.com**

Citation: Zare S, Ahmadi R, Ghiaee P. The effect of spraying the suspension containing adipose-derived mesenchymal stem cells on diabetic wound healing and collagen synthesis in skin tissue in an animal model. Daneshvar Medicine 2022; 29(6):34-44.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.15073.1119

Abstract

Background and Objective: Although many studies have been performed concerning the effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on wound healing, the repairing effects of these cells are still controversial. In this context, the present study investigated the effect of spraying the adipose-derived mesenchymal stem cells suspension on diabetic wound healing and skin tissue collagen synthesis in an animal model.

Materials and Methods: In this experimental study, abdominal adipose tissue was obtained from patients referred for abdominoplasty. Mesenchymal cells were isolated from adipose tissue and identified by micoscoic examination and flow cytometry. Streptozotocin was used to induce diabetes in 10 male Wistar rats. Wounds with a diameter of 0.8 cm were created by a biopsy punch in the back of diabetic rats. Animals were divided into two groups: control (untreated) and treated with mesenchymal cell. After treatment, wound healing was assessed by photographic methods on days 7, 14 and 21 and the collagen synthesis was evaluated using Mason's trichrome method.

Results: Observational data showed that the wound healing rate was higher in the treatment group than control group. 21 days after treatment, the density of collagen fibers, the formation of tissue vessels and the collagen fibers arrangement had higher quality in the treatment group than the control group.

Conclusion: Spraying the adipose-derived mesenchymal stem cells in diabetic wound area can increase the collagen synthesis in the wound area and accelerate the healing of the diabetic wound. According to which, the use of these cells can be considered in cell therapy of wounds.

Keywords: Diabetic wound, Spray, Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Collagen

Received: 24 Aug 2021
Last revised: 07 Dec 2021
Accepted: 18 Dec 2021

مقاله پژوهشی

بررسی اثر اسپری سوسپانسیون حاوی سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی بر التیام زخم دیابتی و سنتز کلاژن در بافت پوست در مدل حیوانی

نویسندگان: سونا زارع[1]، رحیم احمدی[2*] ، پوریا غیائی[3]

۱. مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
۳. گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی **Email: drrahahmadi@yahoo.com**

دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۲
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷

چکیده

مقدمه و هدف: گرچه مطالعات زیادی در خصوص اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در التیام زخم انجام گرفته، اما هنوز هم اثرات ترمیمی این سلول‌ها قابل بحث هستند. بر این مبنا، مطالعه حاضر به بررسی اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر التیام زخم‌های دیابتی و سنتز کلاژن در بافت پوست در مدل حیوانی پرداخته است.

مواد و روش ها: طی این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی بافت چربی شکمی از مراجعه‌کنندگان جهت ابدومینوپلاستی تهیه گردید. سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده و مورد ارزیابی میکروسکوپی و فلوسایتومتری قرار گرفتند. استرپتوزوتوسین جهت القای دیابت در ۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار مورد استفاده قرار گرفت. زخمهایی به قطر ۰/۸ سانتیمتر توسط پانچ بیوپسی در ناحیه پشت موشهای دیابتی ایجاد شد. حیوانات به دو گروه شاهد (تیمار نشده) و تیمار با سلول‌های مزانشیمی تقسیم‌بندی گردیدند. پس از تیمار، التیام زخم به روش فتوگرافی در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱ بررسی شد و سنتز کلاژن با رنگ‌آمیزی ماسون تری‌کروم ارزیابی گردید.

نتایج: داده های مشاهده‌ای نشان دادند که سرعت التیام زخم در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. ۲۱ روز بعد از تیمار، تراکم رشته‌های کلاژن، شکل‌گیری عروق بافتی و نظم رشته‌های کلاژن در گروه تیمار از کیفیت بیشتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بود.

نتیجه گیری: اسپری کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در ناحیه زخم دیابتی می‌تواند سبب افزایش سنتز کلاژن در ناحیه زخم و تسریع ترمیم زخم دیابتی گردد. بر این مبنا استفاده از این سلول‌ها می‌تواند در سلول درمانی زخم‌ها مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: زخم دیابتی، اسپری، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، کلاژن

مقدمه

در سطح جهان حدود ٤٦٣ میلیون نفر مبتلا به دیابت هستند و تعداد بیماران دیابتی تا سال ۲۰٤٥ به ۷۰۰ میلیون نفر می رسد. زخم دیابتی یکی از عوارض قابل توجه دیابت است (۱). معمولاً علت اصلی ایجاد زخم فقدان حس درد در زمینه نوروپاتی است. از طرفی دیگر خود نوروپاتی پوست پا را خشک و شکننده می‌کند و استعداد ترک برداشتن پوست را افزایش می‌دهد و به علت اختلال سیستم ایمنی، ساز و کار مقابله با میکروب‌ها در افراد دیابتی دچار اختلال می شود (۲،۳). همچنین به علت درگیری عروقی، خون رسانی به بافت‌های آسیب دیده مختل شده و همین امر ترمیم بافت را با اختلال مواجه می‌کند. اخیراً دیده شده سلول های بنیادی مزانشیمی می‌توانند در درمان این زخم ها مؤثر واقع شوند (٤). سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول هایی چند توان هستند که دارای یک جسم سلولی کوچک با زوائد های بلند و نازک می باشند (٥). بافت چربی منبع مهمی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. MSC های مشتق از بافت چربی می‌توانند به سلول های دیگر تمایز پیدا کنند و همچنین بر ترمیم زخم (٦،۷) و سنتز کلاژن اثر بگذارند (۸،۹). سلول های بنیادی مزانشیمی می‌توانند باعث افزایش سرعت بهبود زخم پوستی (۱۰) و به ویژه زخم‌های دیابتی شوند (۱۱). نتایج پژوهش ها حاکی از آنند که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی قابلیت قابل توجهی در التیام زخم ها دارند (۱۲،۱۳). از طرفی، مشاهده شده که سلول های بنیادی می‌توانند تاثیراتی بر تحریک سنتز پروتئین های ارتجاعی داشته باشند (١٤). در این راستا، مطالعات نشان داده اند که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی می‌توانند باعث افزایش سنتز کلاژن در بافتهای مختلف شوند (١٥). در مقابل اثرات مثبت سلولهای بنیادی بر ترمیم بافتهای مختلف، در برخی تحقیقات محدودیت هایی از قبیل کاهش قدرت تکثیر سلول های بنیادی بالغ در شرایط آزمایشگاهی پس از چندین مرحله پاساژ، پیر شدن این سلول ها پس از پاساژهای مکرر و تغییراتی ناخواسته از قبیل تمایز به رده‌های سلولی نامطلوب گزارش شده است (١٦). گرچه 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 نموده اند؛ اما به نظر می‌رسد این سلولها خاصیت ایمنی زایی دارند و در عمل برای پایدار بودن پیوند این سلول ها باید از سرکوب سیستم ایمنی فرد گیرنده استفاده نمود که این امر می تواند عوارضی ایجاد نماید. همچنین در مواردی استفاده از سلولهای بنیادی سبب تومورزایی می گردد (۱۷،۱۸). بر این مبنا، روش به کارگیری و پیوند سلولها در بافت آسیب دیده جهت جلوگیری از ایجاد عوارض جانبی بسیار پر اهمیت می‌باشد. مطالعات قبلی عمدتا" بر استفاده از سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به صورت تزریق و یا پیوند موضعی متمرکز بوده‌اند. به کار گیری این روشها گرچه اثرات مثبت ترمیمی این سلولها را در موارد قابل توجهی نشان داده است، اما استفاده از روش اسپری کردن سلولها در مطالعات قبلی کمتر مورد توجه قرار گرفته حال آنکه به کار گیری این روش ضمن تسهیل و تسریع استفاده از سلولهای بنیادی در محل زخم، می تواند از نظر کاهش عوارض جانبی نیز مورد توجه قرار گیرد. در مجموع، با توجه به شیوع گسترده دیابت و زخم های مزمن حاصل از ابتلا به دیابت در جهان و نیز با توجه به عوارض گسترده بالینی و تحمیل هزینه های درمانی حاصل از زخم های ایجاد شده در دیابت (۱۲) و همچنین با توجه به تحقیقات محدود در خصوص موضوع این پژوهش و نیز نتایج ضد و نقیض قابل توجه در این حوزه (١٦،١٧)، پژوهش حاضر به بررسی اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر التیام زخم‌های دیابتی و سنتز کلاژن در بافت پوست در مدل حیوانی پرداخته است.

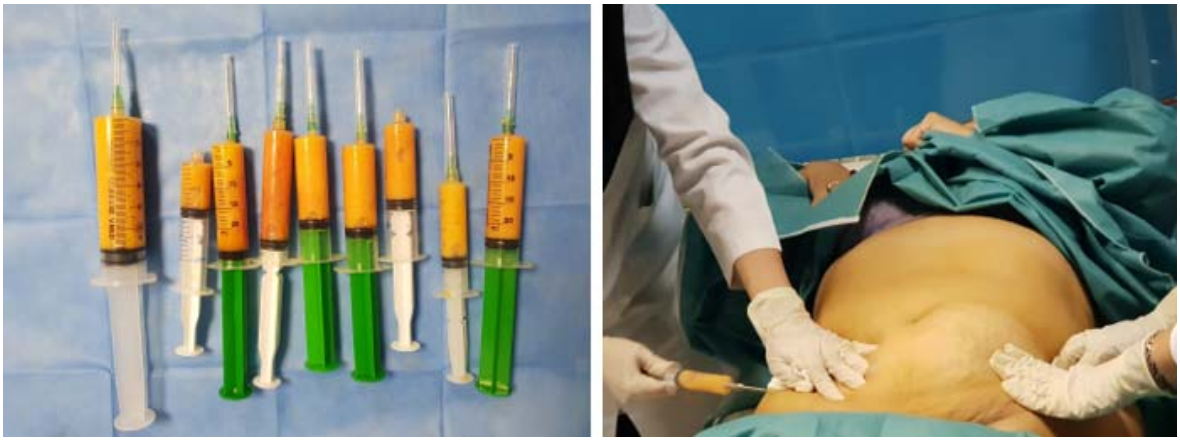
مواد و روش‌ها

در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهش های زیست‌پزشکی از طرف معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 دریافت شد. رضایت نامه کتبی از بیمار دهنده بافت قبل از نمونه گیری دریافت گردید. در طول پژوهش، تمامی قوانین بین‌المللی

حقوق حیوانات، بر اساس استانداردهای بین‌المللی رعایت گردید.

جمع آوری نمونه

برای جمع آوری بافت چربی، نمونه ها از ۱۰ مراجعه کننده به مرکز پوست و سلولهای بنیادی دانشگاه تهران جهت ابدومینوپلاستی اخذ گردید. برای این منظور و مطابق با روشهای مصوب در طرح پژوهشی، ابتدا با استفاده از پرسشنامه استاندارد تهیه شده، معیارهای ورود و خروج مورد بررسی قرار گرفتند. معیارهای اصلی خروج به طور کلی و خلاصه شامل بیماریهای زمینه‌ای از قبیل ابتلا به دیابت، آلودگی های ویروسی و یا باکتریایی و عدم رضایت فردی بود. معیار اصلی ورود ابدومینوپلاستی و رضایت فردی بودند. نمونه های بافت چربی پس از لیپوساکشن با استفاده از ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل شدند (شکل ۱).



شکل ۱. لیپوساکشن از ناحیه شکمی و نمونه های چربی گرفته شده

جداسازی سلول های بنیادی از بافت چربی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، جهت جداسازی سلولهای بنیادی با توجه به مطالعات پیشین در ابتدا بافت چربی شستشو داده شد و توسط تیغ جراحی خرد شد. برای جداسازی چربی از مایع، نمونه سانتریفیوژ شد. و بعد از این که بافت چربی از مایع زیرین جدا شد در فالکون استریل جداگانه ریخته شد. ۳ میلی لیتر از مایع به جا مانده جهت تست میکروبی برداشته شد. به فالکون حاوی بافت چربی، ۲۰ میلی لیتر PBS افزوده شد و یک دقیقه با دور ۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. چربی رویی به دو فالکون جداگانه منتقل شد و کلاژناز ۰/۲٪ به هردو افزوده شد. فالکون ها به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شدند و در این زمان هر ۵ دقیقه یکبار فالکون ها تکان داده شدند. مجددا محتویات هریک از فالکون ها در دو فالکون دیگر تقسیم شد و معادل حجم محتویات هر فالکون مخلوط α MEM+10%FBS اضافه گردید. در نهایت هر فالکون بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن مایعات رویی به قسمت رسوب مانده در لوله ها ۲۵ میلی لیتر نرمال سالین اضافه شد و پس از عبور از فیلتر ویژه، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. از مایع رویی برای انجام بررسی های میکروبی، مایکوپلاسما و اندوتوکسین برداشته شد. برای شمارش سلولی از نوکلِئوکانتر استفاده شد و نهایتا از تمام سلول ها سوسپانس تهیه شد و برای کشت از فلاسک ویژه کشت استفاده گردید. حجم معینی از سوسپانسیون سلولی و محیط کشت درون هر فلاسک ریخته شد و تعویض محیط ٤ روز بعد انجام گرفت.

پاساژ سلولی

پس از رسیدن به تعداد مناسب سلول ، محیط کشت فلاسک سلول های بنیادی مزانشیمی تخلیه شد، سلول های بنیادی مزانشیمی با استفاده از PBS شستشو داده شد. سپس با استفاده از آنزیم تریپسین سلول ها کنده شده و با

افزودن محیط کشت اثر تریپسین خنثی گردید. سلول های کنده شده به فالکون منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۵۰۰ rpm مورد سانتریفیوژ قرار گرفتند. محیط رویی تخلیه شد وسپس سلول ها به ظرف جدید منتقل شدند. سلول‌ها از نظر تستهای میکروبی، مایکوپلاسما و اندوتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی زنده مانی سلول ها

برای این منظور ۱ سی سی از سلول ها از طریق فلوسایتومتری بررسی شدند. برای انجام فلوسایتومتری سلول های سوسپانس شده در لوله‌های فلوسیتومتری تقسیم شدند، در تاریکی به سلول‌ها، آنتی بادی مارکرهای مورد نظر افزوده شد و به مدت نیم ساعت لوله‌های فلوسیتومتری در یخچال قرار گرفت. سپس با استفاده از PBS سلول ها شستشو شده و آنتی بادی های متصل نشده حذف گردیدند. اطلاعات خوانش شد و داده ها بر اساس بیان و عدم بیان مارکرها آنالیز شد.

ایجاد دیابت در موش ها

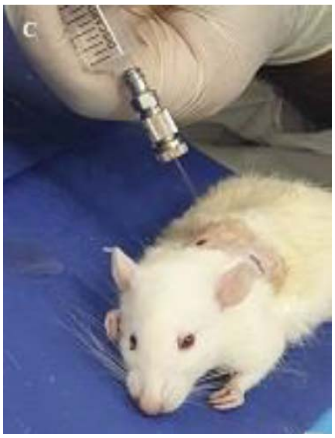
۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم و محدوده سنی سه ماه که از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در قفس‌های فلزی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند و به دو گروه کنترل (مورد تزریق نرمال سالین) و گروه تیمار (مورد تزریق با سلول های مزانشیمی) تقسیم بندی شدند.برای این هدف یک دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم استرپتوزوتوسین به صورت داخل صفاقی، در موش ها القاء گردید. ٤ روز پس از تزریق سطح گلوکز در نمونه خون گرفته شده از دم با استفاده از گلوکومتر اندازه گیری شد. موش هایی که میزان گلوکز خون آن‌ها بیش از ٢٤٦ میلی گرم/دسی لیتر بود، به عنوان موش های دیابتی در نظر گرفته شدند.

ایجاد زخم پوستی در موش ها

پس از اطمینان از مبتلا شدن موش ها به دیابت برای ایجاد زخم در پوست قسمت پشتی بدن، ناحیه مذکور ضدعفونی و اصلاح شد. پس از بیهوش کردن موش ها با کتامین و زایلازین، با استفاده از پانچ بیوپسی ۰/۸ میلی متری زخمی به ضخامت اپیدرم و درم ایجاد شد .سپس ناحیه زخم با نرمال سالین تمیز و پانسمان شد.

گروه بندی موش ها

موش ها ی دیابتی پس از ایجاد زخم به ۲ گروه ۵ تایی تقسیم شدند . گروه کنترل که در آنها ۱ سی سی نرمال سالین برروی زخم اسپری شد و گروه تیمار که در آنها ۱۰۵ سلول در ۱ سی سی نرمال سالین سوسپانس و بر ناحیه زخم اسپری شد (شکل ۲). زخم ها با پانسمان میپتل و چسب شفاف پوشانیده شدند. سطح زخم در حیوانات روز ۰، ۷، ١٤ و ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲. اسپری سلولها روی ناحیه زخم

تصویربرداری ناحیه ی زخم

تا روز ۲۱ هر هفته یک بار با برداشتن پانسمان، تحت بیهوشی نواحی زخم عکسبرداری شد و عکس های مربوط به روزهای ۰،۷،۱٤و۲۱ برای بررسی چگونگی ترمیم زخم ها و با استفاده از تصاویر Image J به صورت کیفی آنالیز شد (شکل ۳).

شکل ۳. پانسمان زخم

رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم

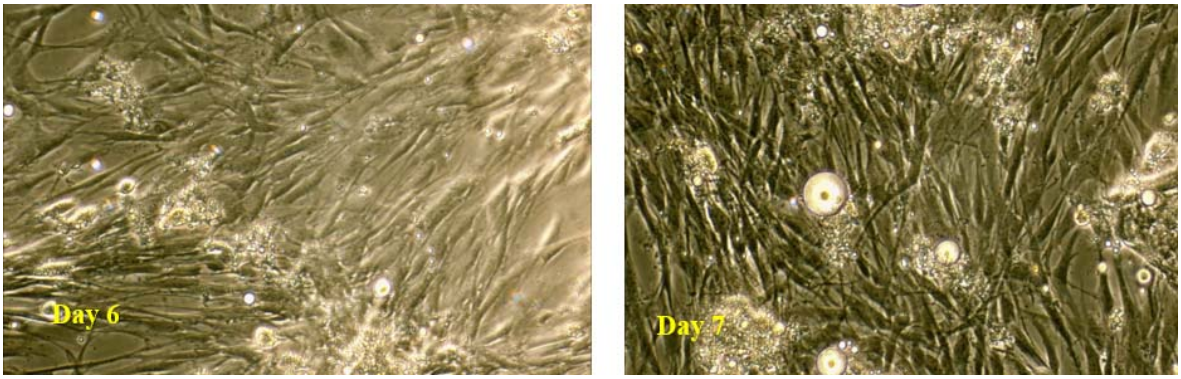
جهت بررسی کیفی و هیستولوژیک میزان کلاژن موجود در بافت پوست، نمونه‌های بافت پوست در گروههای کنترل و تیمار در روز ۲۱ از محل ترمیم زخم برداشته شد و مورد رنگ آمیزی ماسون تری کروم (Mason's trichrome) انجام گرفت. در این راستا، پس از پارافینه کردن بافت و تهیه برشهای بافتی، مقاطع بافتی توسط گزیلول و درجات مختلفی از الکل از درجات بالا به پایین دهیدراته شدند. سپس لامها در محلول بوئن به مدت ۱ساعت در دمای ٥٦ درجه سانتیگراد قرار داده شد. آنگاه آبکشی با آب دیونیزه جهت شستشو و اطمینان از اینکه تمام اسید پیکریک خارج شده انجام گرفت. سپس رنگ آمیزی در هماتوکسیلین – ویگرت به مدت ۵ دقیقه و آبکشی در آب دیونیزه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. همچنین رنگ آمیزی در محلول اسید فوشین به مدت ۵ دقیقه و دوباره آبکشی در آب دیونیزه انجام شد. لامها در محلول فسفوتنگستیک اسید و فسفومولیبدیک اسید به مدت ۵ دقیقه و سپس در محلول آنیلین بلو به مدت ۵ دقیقه و اسید استیک ۱درصد به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد. سپس دهیدراته کردن لامها توسط درجات مختلفی از الکل (درجات پایین به بالا) و همچنین شفاف کردن و الکل‌گیری توسط گزیلول انجام و لامها مونت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به ماهیت تحقیق و بررسی مشاهده ای و بافت شناسی، داده ها با استفاده از آمار توصیفی طبقه بندی شده و با توجه به ارزیابی های کیفی داده ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

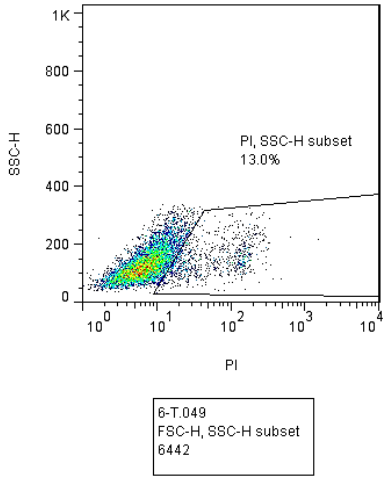
نتایج

نتایج دریافتی از آزمایشگاه نشان داد که سلولها مورد استفاده جهت اسپری بر روی زخم، آلودگی ویروسی و مایکوپلاسمایی نداشتند. مشاهدات میکروسکوپی نشان دادند که این سلولها دارای مورفولوژی سلولهای مزانشیمی بودند (شکل ٤).



شکل ٤. تصویر میکروسکوپی سلول های مزانشیمی در روزهای ٦ و ٧ پس از جداسازی با لنز ٤٠

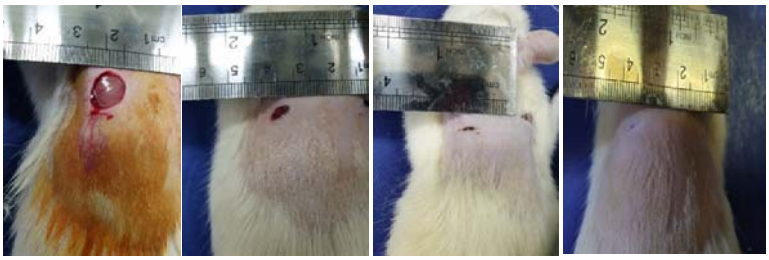
همچنین نتایج نشان دادند که درصد بالایی از سلول‌های مزانشیمی در پاساژ ۳ زنده هستند (۸۷ درصد) و تعداد کمی از آنها دچار آپاپتوز گردیده اند (شکل ۵).



شکل۵. زنده مانی سلولهای اندازه گیری شده توسط فلوسایتومتری

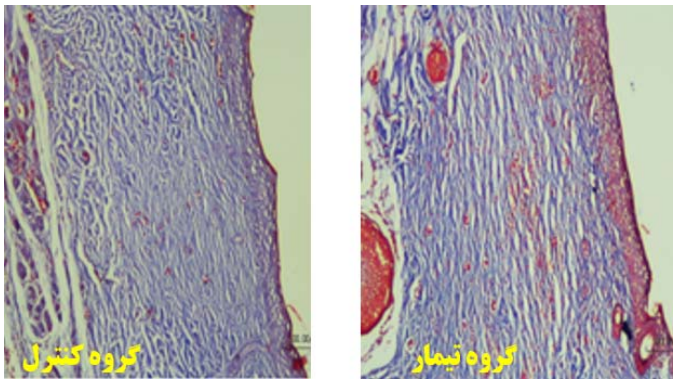
مشاهدات مورفولوژیک زخم نشان دادند که میزان بسته شدن زخم در گروه تزریق فیبروبلاست نسبت به گروه کنترل با سرعت بالاتری انجام شد. در روز هفتم در گروه تزریق، زخم درحال بسته شدن و اسکار در حال ناپدید شدن بود در حالی که در گروه کنترل میزان بسته شدن زخم کمتر بود. روز ۲۱ و در گروه تیمار زخم کاملا بسته شده و رشد مو در ناحیه زخم کاملا مشهود بود، حال آنکه ترمیم زخم در گروه کنترل به میزان کمتری بود (شکل ٦ و ۷).

شکل ٦. بررسی مشاهده ای بسته شدن زخم در گروه کنترل در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱



شکل ۷. بررسی مشاهده ای بسته شدن زخم در گروه تیمار در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱

نتایج بررسی کیفی میکروسکوپی گزارش شده توسط متخصص بافت شناسی نشان دادند که ۷ روز بعد از ایجاد زخم، در هر دو گروه کنترل و گروه تیمار شده با سلولهای بنیادی مزانشیمی، فیبرهای کلاژن بسیار محدود بود و از نظر میزان کلاژن تفاوت مشهودی بین گروه تیمار با کنترل مشاهده نشد. ۱٤ روز بعد از تیمار، بلوغ عروق و نظم بافتی نسبت به گروه کنترل از کیفیت مناسب تری برخوردار بود. ۲۱ روز بعد از تیمار، تراکم رشته های کلاژن، شکل گیری عروق بافتی و نظم رشته های کلاژن در گروه تیمار از کیفیت بیشتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بود (شکل ۸).



شکل ۸ نتایج رنگ آمیزی ماسون تری کروم بافت پوست در گروه کنترل و تیمار ۲۱ روز پس از تیمار (X٤٠). نتایج نشان دادند که شکل گیری عروق بافتی و نظم رشته های کلاژن در گروه تیمار از کیفیت بیشتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بود.

بحث

نتایج این تحقیق نشان دادند که استفاده از روش اسپری کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در محل زخم دیابتی می تواند با افزایش سنتز کلاژن بافت پوست سبب تسریع التیام زخم دیابتی در مدل حیوانی شده، همچنین عوارض قابل مشاهده ای بر جای نگذارد. موافق با این یافته، مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای اهمیت قابل توجهی در حوزه ترمیم زخم‌های دیابتی می‌باشند (۱۱).

همچنین، نتایج نشان داده اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منبع انسانی همراه با ماتریکس درم می‌توانند سبب تسریع التیام زخم دیابتی در مدل حیوانی گردند (۱۹). همچنین سوسپانسیون حاصل از کشت سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی می توانند سبب مهاجرت فیبروبلاستها به ناحیه زخم و در نتیجه تسریع التیام زخم گردند (۲۰). همچنین نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته در خصوص تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان بر التیام زخم‌های دیابتی بیانگر آن است که استفاده از این سلولها موجب افزایش استحکام پوست و ترمیم زخم دیابتی می‌شود (۱۷). در واقع کلاژن درم مسئول استحکام و استقامت پوست است که معمولاً از کلاژن نوع ۱ (۸۵ تا ۹۵ درصد)، و کلاژن نوع ۳ (۱۰ تا ۱۵ درصد) تشکیل شده است (۲۱). نتایج مطالعات نشان داده اند که سنتز کلاژن نوع ۱ تحت تاثیر سلول های بنیادی مشتق از چربی افزایش می یابد. این رویداد نشان می دهد که سلولهای بنیادی مشتق از چربی، سنتز کلاژن موضعی را با استفاده از اثر پاراکرین که باعث فعال شدن و تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست ها می‌شود، افزایش می‌دهد (۱۵). از طرفی، سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی پیوند شده در ناحیه زخم پوستی می توانند به کراتینوسیتها تمایز یافته و از این طریق در تسریع التیام زخم موثر باشند (۲۲). علاوه بر این، سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی می توانند سبب افزایش قدرت رگزایی هم در شرایط in vivo (در مدل موش های دیابتی) و هم در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) شده، همچنین سبب افزایش

تکثیر و تمایز سلولهای اندوتلیال شوند (۵) و از این طریق بر بهبود زخم تاثیر گذار باشند.

در مقابل برخی یافته ها نشان داده اند که پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی موجب کاهش قدرت تکثیر سلول های بنیادی بالغ شده و می تواند در مسیر تمایزی آنها اختلال ایجاد نماید (۱۶). همچنین سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافتهای انسانی می توانند پس از پیوند در بافت هدف خصلت ایمنی زایی داشته و بنابراین سبب التهاب در بافت هدف و یا حتی ایجاد تومورهای ناخواسته شوند (۱۷). گرچه بررسی بافت شناسی تحقیق حاضر نشان داد که اسپری کرده سلولهای مزانشیمی مشتق از بافت چربی در ناحیه زخم دیابتی و در مدل حیوانی عوارض التهابی بر جای نمی گذارد.

درباره مکانیسم اثر اسپری سلول‌های بنیادی بر التیام زخم دیابتی باید گفت که این سلول‌ها می توانند سبب رگزایی شده (۲۲،۱۳) و بدین وسیله باعث افزایش اکسیژن رسانی گردیده و درنتیجه ضمن القای تکثیر سلول های اپیتلیال سبب مهاجرت آنها به بافت‌های آسیب‌دیده و بازسازی این بافت‌های می‌شوند (۱۲). در واقع این سلول‌ها، فاکتورهای رشد مختلفی را تولید و ترشح می‌کنند که در ترمیم و بازسازی بافتی نقش دارند (۲۳). همچنین سلولهای بنیادی مزانشیمی می‌توانند از آپوپتوز جلوگیری کنند (۲۴) و بدین ترتیب نقش موثری در ترمیم بافت ایفا نمایند. از سویی مطالعات قبلی بیانگر قدرت بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در القای سنتز کلاژن می‌باشند (۲۵) به گونه ای که به طور اثربخشی سبب افزایش بیان ژن‌های تولید کننده کلاژن می شوند و بدین ترتیب در التیام زخم تاثیر گذار می باشند (۲۶). از طرفی یکی از مهمترین چالشهای استفاده از درمان های مبتنی بر سلول های بنیادی، نحوه تحویل سلول به بافت های آسیب دیده است (۲۷). ساده ترین تکنیک ها شامل کاربردهای موضعی سلول، تزریق مستقیم به درم یا عضله و همچنین تحویل سیستمیک به گردش خون است (۲۸). در این مطالعه نتایج نشان دادند که استفاده از روش اسپری می تواند روش مناسبی در پیوند سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به ناحیه زخم دیابتی باشد. همچنین استفاده از سلول های بنیادی اتولوگ یا آلوژنیک نیز نتایج متفاوتی در بهبود زخم را نشان می‌دهند (۲۹) که این امر می تواند موضوع تحقیقی آتی در راستای تحقیق حاضر باشد.

تحقیق حاضر در محدوده بررسی التیام زخم دیابتی و سنتز کلاژن در پی اسپری سلول‌های بنیادی در موش‌های صحرایی نر انجام گرفته و تفسیر نتایج در این حیطه قابل تبیین می‌باشد. با توجه به محدودیت پشتیبانی مالی و تسهیلات در دسترس محققین این پژوهش، امکان بررسی موضوع در سطح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه بیان ژن‌ها و پروتیین‌های موثر در ترمیم زخم دیابتی و نیز مطالعات میکروسکوپ الکترونی فراهم نگردید، امید است در آینده امکان بررسی این موضوع در سطوح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه از نظر تاثیر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بیان ژن‌ها و پروتیین‌های مرتبط با کلاژن و ترمیم زخم دیابتی فراهم آید.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که اسپری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در ناحیه زخم دیابتی می‌تواند به طور موثری سبب افزایش میزان کلاژن در بافت پوست ناحیه زخم و تسریع التیام زخم دیابتی گردد. بر این مبنا استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی می‌تواند در سلول درمانی به ویژه در حیطه التیام زخم‌های مزمن پوستی حاصل از دیابت مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته و بدین‌وسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت‌های مالی این مرکز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد .

منابع

1. Sharma R, Sharma SK, Mudgal SK, Jelly P, Thakur K. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy for diabetic foot ulcer, a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. Scientific Reports 2021;11(1):1-2. doi:10.1038/s41598-021-81886-1.
2. Khalilifar MA, Eslaminejad MB, Ghasemzadeh M, Hosseini S, Baharvand H. In vitro and in vivo comparison of different types of rabbit mesenchymal stem cells for cartilage repair. Cell Journal 2019;21(2):150. doi: 10.22074/cellj.2019.6149.
3. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. Annals of Medicine 2017;49(2):106-16. doi: 10.1080/07853890.2016.1231932.
4. Yazdanpanah L, Nasiri M, Adarvishi S. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. World Journal of Diabetes 2015;6(1):37. doi: 10.4239/wjd.v6.i1.37 .
5. Kucharzewski M, Rojczyk E, Wilemska-Kucharzewska K, Wilk R, Hudecki J, Los MJ. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. European Journal of Pharmacology 2019;843:307-15. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.12.012.
6. Chen CY, Wu RW, Hsu MC, Hsieh CJ, Chou MC. Adjunctive hyperbaric oxygen therapy for healing of chronic diabetic foot ulcers. Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing 2017;44(6):536-45. doi: 10.1097/WON.0000000000000374.
7. Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. Biomaterials 2012;33(29):7008-18. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.058.
8. Lin W, Li HY, Yang Q, Chen G, Lin S, Liao C, Zhou T. Administration of mesenchymal stem cells in diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. Stem Cell Research & Therapy 2021;12(1):1-21. doi:/10.1186/s13287-020-02108-5.
9. Torre PD, Flores AI. Current status and future prospects of perinatal stem cells. Genes 2021;12(1):6. doi: 10.3390/genes12010006.
10. 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. doi:10.1634/stemcells.2007-0226.
11. Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner GC. Stem cell therapies for wound healing. Expert Opinion on Biological Therapy 2019;19(6):575-85. doi:10.1080/14712598.2019.1596257.
12. Álvaro-Afonso FJ, Sanz-Corbalán I, Lázaro-Martínez JL, Kakagia D, Papanas N. Adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical studies. Angiology 2020;71(9):853-63. doi./10.1177/0003319720939467.
13. Souza CM, Mesquita LA, Souza D, Irioda AC, Francisco JC, Souza CF, et al. Regeneration of skin tissue promoted by mesenchymal stem cells seeded in nanostructured membrane. In Transplantation Proceedings 2014; 46(6): 1882-1886). Elsevier. doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.05.066.
14. Juncosa-Melvin N, Matlin KS, Holdcraft RW, Nirmalanandhan VS, Butler DL. Mechanical stimulation increases collagen type I and collagen type III gene expression of stem cell–collagen sponge constructs for patellar tendon repair. Tissue Engineering 2007;13(6):1219-26. doi:10.1089/ten.2006.0339.
15. Meruane MA, Rojas M, Marcelain K. The use of adipose tissue–derived stem cells within a dermal substitute improves skin regeneration by increasing neoangiogenesis and collagen synthesis. Plast. Journal of Surgical Reconstruction 2012;130(1):53-63. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182547e04.
16. Ghaneialvar H, Arjmand S, Sahebghadam Lotfi A, Soleimani M, Mashhadi Abbas F. Influence of adipose derived mesenchymal stem cells on the effective inflammatory

factors of diabetic wound healing in animal models. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2017;27(148):12-21.

17. Mehrbani Azar Y, Green R, Niesler CU, van de Vyver M. Antioxidant preconditioning improves the paracrine responsiveness of mouse bone marrow mesenchymal stem cells to diabetic wound fluid. Stem Cells and Development 2018;27(23):1646-57.
18. Mizuno H, Tobita M, Orbay H, Uysal AC, Lu F. Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells and Cancer Stem Cells 2014: 12:165-74. doi: 10.1007/978-94-017-8032-2_15.
19. Yang HY, Fierro F, So M, Yoon DJ, Nguyen AV, Gallegos A, et al. Combination product of dermal matrix, human mesenchymal stem cells, and timolol promotes diabetic wound healing in mice. Stem Cells Translational Medicine 2020;9(11):1353-64. doi: 10.1002/sctm.19-0380.
20. Wan J, Xia L, Liang W, Liu Y, Cai Q. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. Journal of Diabetes Research 2013;2013. doi: 10.1155/2013/647107.
21. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. Journal of the Royal Society Interface 2010;7(43):229-58. doi:10.1098/rsif.2009.0403 .
22. Ong HT, Dilley RJ. Novel non-angiogenic role for mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor on keratinocytes during wound healing. Cytokine & Growth Factor Reviews 2018; 44:69-79. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.11.002.
23. Xie Z, Hao H, Tong C, Cheng Y, Liu J, Pang Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells elicit macrophages into an anti-inflammatory phenotype to alleviate insulin resistance in type 2 diabetic rats. Stem Cells 2016;34(3):627-39. doi: 10.1002/stem.2238 .
24. Chen Z, Wang Y, Shi C. Therapeutic implications of newly identified stem cell populations from the skin dermis. Cell Transplantation 2015;24(8):1405-22. doi: 10.3727/096368914X682431.
25. Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner GC. Stem cell therapies for wound healing. Expert Opinion on Biological Therapy 2019 ;19(6):575-85. doi: 10.1080/14712598.2019.1596257.
26. Brindo da Cruz IC, Velosa AP, Carrasco S, dos Santos Filho A, Tomaz de Miranda J, Pompeu E, et al. Post-Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) Stimulated by Collagen Type V (Col V) Mitigate the Progression of Osteoarthritic Rabbit Articular Cartilage. Front. Frontiers in Cell and Developmental Biology 2021; 9:539. doi: 10.3389/fcell.2021.606890.
27. Shokrgozar MA, Fattahi M, Bonakdar S, Kashani IR, Majidi M, Haghighipour N, et al. Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. Iran. Biomedical Journal 2012;16(2):68. doi: 10.6091/ibj.1053.2012.
28. Gadelkarim M, Abushouk AI, Ghanem E, Hamaad AM, Saad AM, Abdel-Daim MM. Adipose-derived stem cells: effectiveness and advances in delivery in diabetic wound healing. Biomed. Pharmacother 2018;107:625-33. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.013.
29. Yu S, Cheng Y, Zhang L, Yin Y, Xue J, Li B, et al. Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats. Stem Cell Research & Therapy 2019; 10(1):1-8. doi: 10.1186/s13287-019-1474-8.