فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۲ ص. ۱۱۲-۱۰۳

مقاله پژوهشی

مطالعه تجربی بررسی تاثیرجایگاه پیوند داربست به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بهبودی دیابت در مدل موش بزرگ آزمایشگاهی

الهام حویزی*

دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): e.hoveizi@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۱

https://doi.org/10.30495/jdb.2023.1966697.1331

چکیده

دیابت ملیتوس یک اختلال خودایمن ومزمن است که به سرعت درتمام دنیا به‌دلیل سبک زندگی و چاقی درحال گسترش است. ما دراین مطالعه با طراحی یک بافت مهندسی شده و پیوند آن به جایگاه‌های مختلف در مدل حیوانی، سعی در یافتن گامی موثر در کنترل بیماری دیابت داریم. سلول‌های بنیادی مزانشیمی آندومتر رحم (EnMSCs) بااستفاده از روش آنزیمی استحصال و داربست نانوفیبر PAN به روش الکتروریسی تهیه شد. EnMSCs بر داربست کشت و به رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پیوند شدند. بافت‌های مهندسی شده در یک گروه برصفاق در حفره‌شکمی و درگروه دیگر در زیرپوست پیوند شدند. همچنین در گروه دیگری از رت‌ها EnMSCs از طریق دم تزریق شدند. بعد از پیوند گلوکز خون، انسولین و وزن رت‌ها اندازه‌گیری شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که نحوه و مکان پیوند سلول‌های بنیادی نقش مهمی درکنترل بیماری دیابت ایفا می‌کند. درگروه‌های دریافت‌کننده EnMSCs غلظت گلوکز، سطح انسولین خون و همچنین وزن بدن نسبت به گروه کنترل بهبود یافتند. در رت‌های دریافت کننده پیوند در صفاق نسبت به سایر گروه‌ها، غلظت گلوکز به طور معنی‌داری کاهش‌یافته و سطح انسولین خون و وزن بدن به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. در گروه پیوند زیرپوست و گروه تزریق تفاوت معنی‌داری در معیارهای بررسی شده دیده نشد. باتوجه به نتایج این مطالعه، پیوند EnMSCs با استفاده از داربست PAN در محل صفاق می‌توانند برای درمان دیابت پیشنهاد شوند اگرچه نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه برای ارائه یک درمان کامل وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: دیابت، داربست نانوفیبر، مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی آندومتر رحم.

مقدمه

دیابت یک بیماری متابولیک همراه با افزایش قندخون است که ممکن است به دلیل کاهش ترشح انسولین از غده‌ی پانکراس، یا مقاومت به انسولین و یا هر دو همراه با افزایش تولید گلوکز خون باشد. سلول‌های بتای پانکراس در بدن افراد مبتلا به دیابت به دلیل تخریب، توانایی تولید انسولین را ندارند [۱]. این بیماری یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر و ایجاد هزینه‌های مالی و بیمارستانی در جوامع مختلف است. شیوع دیابت در سراسر جهان به علت رشد جمعیت، افزایش سن، شهرنشینی و افزایش چاقی به دلیل کاهش فعالیت فیزیکی افراد، در حال افزایش است [۲]. هرچند کشف و تولید انسولین بسیاری از مشکلات این بیماران را مرتفع ساخته است ولی همچنان برای پیشگیری از عوارض و کنترل بیماری لازم است که برای یافتن درمان‌های مستقل از انسولین اقدام گردد [۳]. بنابراین ایجاد سلول‌هایی که خود قادر به تولید انسولین در مواجهه با افزایش قند خون باشند، از اهمیت بسزایی در درمان این بیماری دارد [۴]. استفاده از یک منبع سلولی مناسب و یک روش متفاوت می‌تواند منجر به تولید یک راه درمانی نوین برای بیماران دیابتی شود. درواقع هدف از سلول درمانی جایگزین کردن سلول برای ترمیم بیماری‌های متنوع است [۶]. سلول‌های بنیادی توانایی تمایز به سلول‌های بتای پانکراس یا مولد انسولین را دارند. این سلول‌ها معمولا به بیمار آسیب دیده تزریق شده یا مستقیما به محل آسیب پیوند می‌شوند [۵]. سلول‌های پیش‌ساز، و سلول‌های بنیادی مانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان و برخی از سلول‌های بنیادی آندودرمی نیز گزینه‌های مناسبی برای تولید سلول‌های شبه تولید کننده انسولین و درمان بیماری دیابت می‌باشند [۶]. همچنین مطالعات نشان می‌دهد استفاده از داربست نقش مؤثری در تمایز سلول‌های بنیادی به انواع مختلف سلول‌ها داشته و سبب افزایش بقا و تکثیر آن‌ها می‌گردد [۷]. روش الکتروریسی نوعی روش تولید داربست بوده و به دلیل قابلیت انعطاف بالا به طور گسترده در مهندسی بافت به کار می‌رود و با پیشرفت‌های اخیر در آن امکان تولید الیافی پیوسته و جامد با قطرهایی در محدوده چندین نانومتر را به همراه کنترل ساختار بین مولکولی سطحی ایجاد کرده است. با توجه به اینکه ارگان‌های مختلف بدن از ساختارهای نانویی برخوردار هستند داربست‌های تولید شده از نانوالیاف علاوه بر پاسخ گویی به نیازهای مطرح شده حساسیت‌های کمتری را در بدن ایجاد نموده و سازگاری بیشتری را با سلول‌های دفاعی بدن و سایر ارگان‌ها دارد [۸]. از سوی دیگر یکی از مسائل مهم و قابل توجه در مهندسی بافت محل مناسب برای پیوند است که بسته به نوع بیماری و شرایط بیمار می‌تواند متفاوت باشد. یافتن محل بهینه برای پیوند بویژه در بیماری پیچیده دیابت از اهمیت خاصی برخوارد دار است. محل پیوند از یک سو در حفظ و بقای سلول‌های پیوند یافته و زیست سازگاری آنها موثر بوده و از سوی دیگر باید بتواند کارایی پیوند برای درمان بیماری را افزایش دهد.

ما در این مطالعه، سلول‌های استحصال شده از آندومتر را در سیستم کشت سه بعدی روی داربست‌های الکتروریسی شده PAN در مدل حیوانی پیوند و اثرات آن در وزن حیوان، سطح انسولین وسطح گلوگز خون را بررسی کردیم تا شاید با یافتن محل بهینه پیوند در جهت حفظ بهتر سلول‌ها و افزایش کارایی پیوند گامی موثر در جهت رفع نیاز بیماران دیابتی برداشته باشیم.

مواد و روش کار

تهیه داربست با روش الکتروریسی

داربست نانوفیبر PAN با روش الکتروریسی ساخته شد. در ابتدا پلیمر PAN با غلظت ۱۲% در حلال DMF حل شد. سپس محلول در سرنگ پلاستیکی ۵ میلی لیتری قرار داده و در دستگاه الکترواسپینینگ (ساخت ایران) جا سازی گشت. برای اسپین این محلول از سوزن gauge ۲۲ استفاده شد. ولتاژ بین ۲۳ تا ۲۵ کیلوولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر در ساعت، فاصله سر سوزن تا غلطک ۱۰ سانتی‌متر تنظیم گشت. این محلول به مدت۱۰ساعت روی ورقه الومینیومی اسپین گردید و سپس اسکافولد حاصل به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلا خشک گردید.

استحصال و کشت سلول‌های آندومتر رحم

نمونه اندومتر رحم در شرایط استریل از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل شد. سپس سلول‌های خونی از نمونه شسته و نمونه قطعه قطعه شد. قطعات حاصله به مدت دو ساعت تحت تاثیر آنزیم کلاژناز با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر قرار گرفت و سلول‌های حاصل در محیط کشت DMEM/F12(Gibco, USA) حاوی

۱۰% FBS(Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین-پنی‌سیلین (Sigma, USA) ۱ درصد، به مدت‌زمان لازم انکوبه شد تا سلول‌ها رشد کرده و سطح فلاسک را پوشاندند.

کشت سلول و کاشت بر داربست

بعد از تهیه، داربست به قطعاتی با قطر ۱۶ میلی متر تقسیم و برای استریل شدن به مدت۲ ساعت در مقابل تابش امواج UV قرار داده شد سپس نمونه‌ها در پلیت ۲۴ خانه کشت و به مدت ۲۴ ساعت دربافر فسفات PBS محتوی غلظت بالای (۵%) پنی‌سلین - استرپتومایسین انکوبه شدند. سپس تعدادcell/well ۵×۱۰^{۴} سلول در هر خانه بر روی داربست کشت داده شد.

بررسی مورفولوژی داربست و سلول‌ها

مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده بر داربست نانوفیبر PAN با روش Scanning Electron Microscopy یا (SEM) بررسی شدند. نمونه‌های مورد آزمایش ۳بار با بافر PBS شستشو داده شده و با گلوتارآلدهید۲/۵ % به مدت۲ ساعت در دمای اتاق فیکس می‌شوند. سپس سلول‌ها با افزایش غلظت محلول اتانول (۳۰, ۵۰, ۷۰, ۸۰, ۹۰ و۱۰۰%) دهیدراته شده و برای مشاهده SEM با طلا پوشانده می‌شوند.

بررسی بقا سلول‌های کشت داده شده بر داربست PAN با رنگ امیزی اکریدین اورنج /اتیدیوم بروماید

جهت بررسی کیفی زنده ماندن سلول‌ها بر داربست PAN از رنگ امیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید (شرکت Sigma) استفاده شد. برای این منظور در ابتدا استوک ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رنگ آکریدین اورنج و استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ اتیدیوم بروماید تهیه و به نسبت مساوی ترکیب شدند. سپس سلول‌ها با این ترکیب به مدت ۵ دقیقه رنگ و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت عکس برداری شدند.

بررسی بقای سلولی

جهت بررسی میزان بقای سلول‌ها از روش (۳)-۴،۵-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA) استفاده شد. ۱×۱۰^{۴} cell/well بر داربست پلیت ۹۶ خانه ای برای مدت زمان ۱۴ روز کشت شدند. در این روش پودر MTT در PBS با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر حل گردید و در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. برای انجام این تست ابتدا محیط کشت سلول‌ها را خارج کرده سپس۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت جدید محتوی ۱۰ میلی لیترمحلولMTT به هر خانه اضافه شد پس از آن پلیت‌ها به مدت ۳ تا۴ ساعت در دمای ۳۷ ℃ انکوبه شده و در ادامه به هر خانه ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه گردید و میزان جذب توسط دستگاه ELISA reader (STAT FAX 2100, USA)در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد.

ایجاد مدل دیابتی

۲۵ راس رت نژاد Wistar بالغ نر با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم از آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شد. حیوانات در شرایط استاندارد با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شده بودند. در این مطالعه رت‌ها به صورت رندومی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شده اند ۱) گروه کنترل (بدون درمان) ۲) رت‌هایی که با دریافت استرپتوزوتوسین (STZ, Sigma Aldrich) دیابتی شده اند ۳) گروه دیابتی دریافت کننده پیوند سلول و داربست به صورت زیر جلدی ۴) گروهی دیابتی که دریافت کننده سلول و داربست به حفره صفاقی بودند ۵) گروه دیابتی دریافت کننده سلول به صورت تزریق در دم.

پیوند سلول و داربست به مدل‌های حیوانی

برای بررسی اثر سلول‌ها در in vivo و بررسی میزان پاسخ‌دهی به گلوکز، سلول‌های کشت شده بر داربست به حفره صفاقی و در زیر پوست در منطقه شکمی رت‌های مدل دیابتی (۱۰×۱۰^{۵} cell/kg body weight) پیوند زده شدند. ۱۴ روز قبل از پیوند ، ۶۰ mg/kg از استروپتوزوتوسین در بافر سیتریک اسید سرد (pH 4.5) به صورت زیرجلدی جهت دیابتی کردن به موش‌ها تزریق شد .حیوانات با سطح بالای گلوکز (بالای ۴۰۰mg/dl) به عنوان مدل دیابتی تلقی می‌شدند. غلظت گلوکز خون، سطح انسولین و وزن بدن هر هفته به مدت ۴۲ روز پس از پیوند اندازه گیری شد. حیواناتی که میانگین سطح گلوکز آنها تدریجا به حدود

mg/dl۳۰۰ و بیشتر می‌رسد به عنوان موارد موفق در عمل پیوند تلقی می‌شوند.

آنالیزهای آماری

برای آنالیز داده‌های حاصل از نرم‌افزار آماری Tukey's testو One-way Anovaجهت آنالیز آماری استفاده شد. رسم نمودار در Excel 2016 انجام گرفت. P<۰/۰۵ برای نمونه‌ها به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

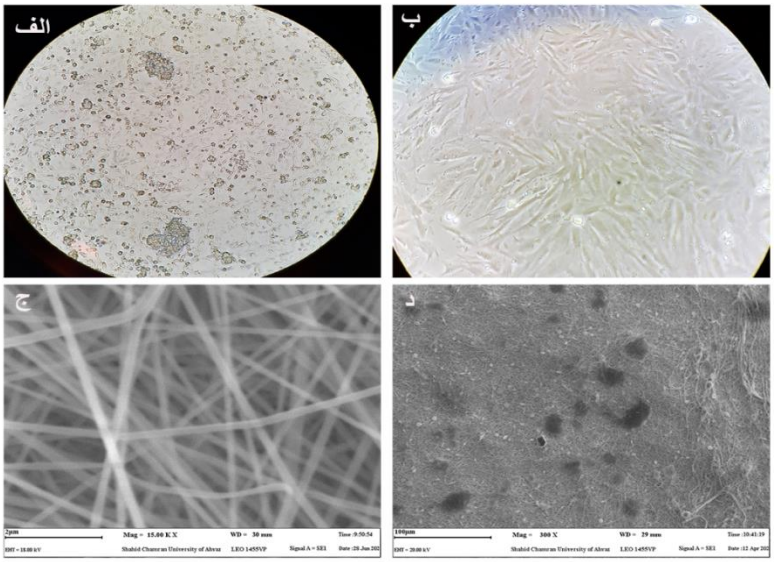
نتایج

ارزیابی مورفولوژی داربست نانوفیبر PAN و سلول‌های بنیادی آندومتر کشت داده شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی

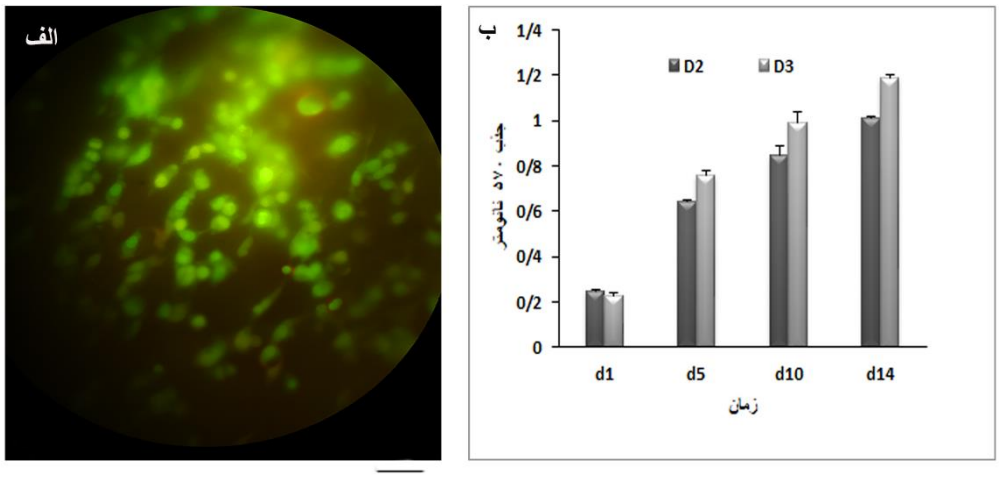
نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سه‌بعدی داربست PAN بدون سلول و سلول‌های بنیادی آندومتر کشت شده بر داربست با استفاده از تکنیک عکس‌برداری الکترونی SEM، حاکی از خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل مناسب (با فاصله‌های ۷۰ میکرومتر) داربست تهیه شد. نانوالیاف کاملا یکنواخت، همگن، بدون بید و با متوسط قطر حدود ۲۵۰ نانومتر مشاهده شدند. مشاهده سلول‌های چسبنده بر روی داربست نشان‌دهنده‌ی تعداد زیادی سلول بنیادی بر داربست نانوفیبر PAN است که پس از ۴۸ ساعت گسترش یافتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سازگاری مناسب، استقرار، تکثیر و مورفولوژی طبیعی سه‌بعدی سلولی ایجاد شده است (شکل ۱).

ارزیابی بقا و استقرار سلول‌های EnMSCs بر داربست PAN

برای ارزیابی بقای سلولی، EnMSCs از روش MTT و همچنین رنگ آمیزی آکریدین اورنج استفاده شد. همانطوری که در شکل ۲-الف دیده می‌شود، قسمت‌های سبزرنگ در رنگ آمیزی آکریدین اورنج نشان از حضور و زنده بودن سلول‌ها با تعداد مناسب بر روی داربست بود. همچنین میزان زنده مانی سلول‌های کشت شده بر روی داربست PAN با زنده مانی سلول‌های کشت دوبعدی با روش MTT به مدت ۱۴ روز مقایسه شده اند. نتایج نشان داد که بقای سلول‌های بر روی داربست (3D) و کشت دوبعدی (2D) در روزهای اول تا سوم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p<0.05$) درحالیکه در روزهای پنج تا چهاردهم میزان زنده مانی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است ($p<0.05$) که حاکی از آن که EnMSCs بر داربست بقا و پایداری بهتری نسبت به کشت دوبعدی دارند (شکل ۲-ب).



شکل ۱- مشاهده مورفولوژی سلول‌های آندومتر رحم و داربست PAN. الف) مشاهده مورفولوژی سلول‌های آندومتر استحصال شده از رحم انسان با میکروسکوپ معکوس بعد از پاساژ اول با بزرگنمایی 10X ب) مشاهده مورفولوژی سلول‌های آندومتر رحم انسان با میکروسکوپ معکوس بعد از پاساژ سوم با بزرگنمایی 20X. ج) مشاهده مورفولوژی داربست نانوفیبر PAN بدون سلول د) مشاهده کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی آندومتر بر داربست نانوفیبر PAN.



شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی زنده مانی سلول‌های EnMSCs و مورفولوژی آنها بر داربست PAN. الف) سلول‌های EnMSCs رنگ آمیزی شده با رنگ اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید بر روی داربست با بزرگنمایی 40X (مقیاس در شکل معادل ۱۰۰ میکرومتر است)، رنگ سبز نشان دهنده سلول‌ها زنده کشت شده بر داربست است. ب) بررسی بقای سلول‌های EnMSCs کشت داده شده بر داربست نانوفیبر PAN با استفاده از تست MTT در ۱۴ روز (3D: سه بعدی و 2D: دو بعدی). هر آزمایش سه بار تکرار شده است و اعداد به صورت میانگین می‌باشند.

بررسی غلظت گلوکز خون پس از دریافت سلول

غلظت سطح گلوکزخون در پنج گروه شامل رت‌های نمونه کنترل، رت‌های دیابتی شده، رت‌های دیابتی دریافت کننده پیوند سلول و داربست به صورت زیر جلدی، رت‌های دیابتی دریافت کننده پیوند سلول و داربست به حفره صفاقی و رت‌های دیابتی دریافت کننده سلول به صورت تزریق در دم بوسیله گلوکومتر در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری در غلظت گلوکز بین گروه‌ها با گروه کنترل وجود دارد. همانگونه که انتظار می‌رفت گلوکز خون رت‌های‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل با اختلاف معنی‌داری افزایش یافته است($P<0/05$). گروه‌های دریافت کننده سلول همگی نسبت به گروه دیابتی کاهش معنی‌داری درمیزان قندخون داشتند ($P <0/05$). در مقایسه بین این گروه‌های پیوند زیرجلدی و پیوند درون صفاقی دیده شد که رت‌های دریافت کننده پیوند پیوند درون صفاقی نسبت به زیرجلدی، در کاهش میزان قند خون موفق‌تر عمل کردند بطوریکه در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ غلظت گلوکز خون به ترتیب ۵۷۱، ۵۶۲/۲، ۵۱۱/۷، ۳۹۹/۵، ۲۱۲/۵، ۱۵۹/۵ و ۱۳۹/۴ mg/dl، اندازه‌گیری شد. اختلاف میزان قندخون در بین این دوگروه به خصوص در روزهای ۲۸، ۳۵ و ۴۲ معنی دار بود و می‌توان علت را بدلیل مناسب بودن محل پیوند و وجود جریان خون بالای در محل پیوند نسبت داد. همچنین در مقایسه میزان قند خون در دو گروه پیوند زیرجلدی و تزریق در دم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

بررسی سطح انسولین خون پس از دریافت سلول

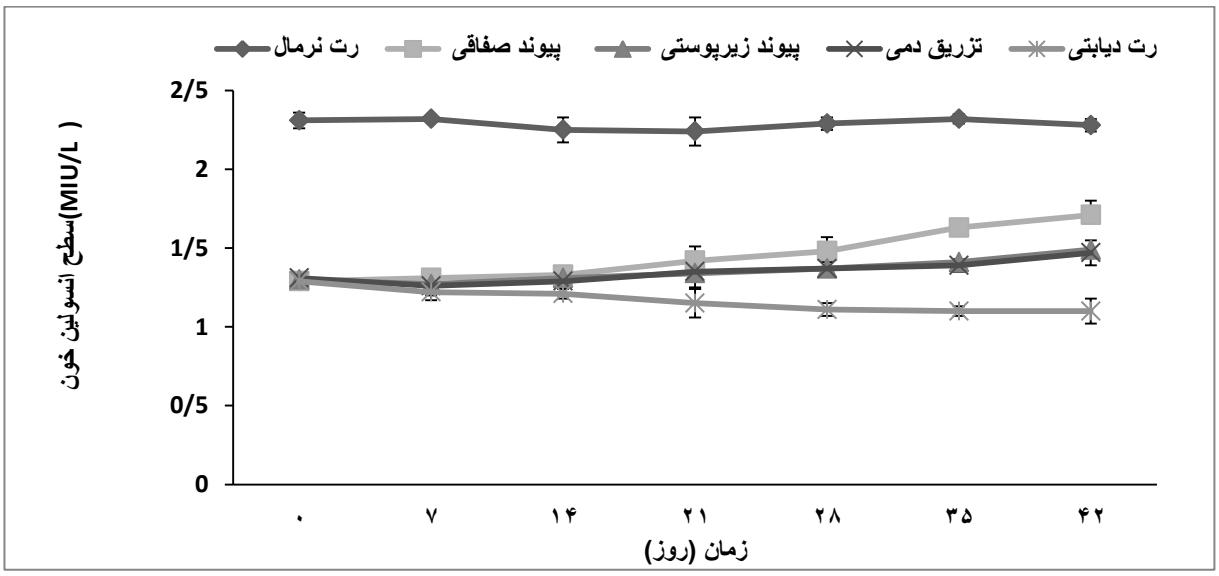
سطح انسولین خون در پنج گروه شامل رت‌های نمونه کنترل، رت‌های دیابتی شده، رت‌های دیابتی دریافت کننده پیوند سلول و داربست به صورت زیر جلدی، رت‌های دیابتی دریافت کننده پیوند سلول و داربست به حفره صفاقی و رت‌های دیابتی دریافت کننده سلول به صورت تزریق در دم بوسیله کیت در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل۴ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری در میزان انسولین خون بین گروه‌ها با گروه کنترل وجود دارد. انسولین خون رت‌های‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل با اختلاف معنی‌داری کاهش نشان داد ($P<0/05$). درگروه‌های دریافت کننده سلول نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌داری درمیزان انسولین در ۱۴ روز اول مشاهده نشد ولی افزایش سطح انسولین در روزهای دیگر معنی دار بود. در مقایسه بین دو گروه پیوند زیرجلدی و پیوند درون صفاقی دیده شد که رت‌های دریافت کننده پیوند درون صفاقی نسبت به زیرجلدی، در افزایش میزان انسولین موفق‌تر عمل کردند و اختلاف میزان انسولین در بین این دوگروه در روزهای ۲۱ تا ۴۲ معنی‌دار بود. همچنین در مقایسه میزان انسولین خون در دو گروه پیوند زیرجلدی و تزریق در دم تفاوت

معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴).

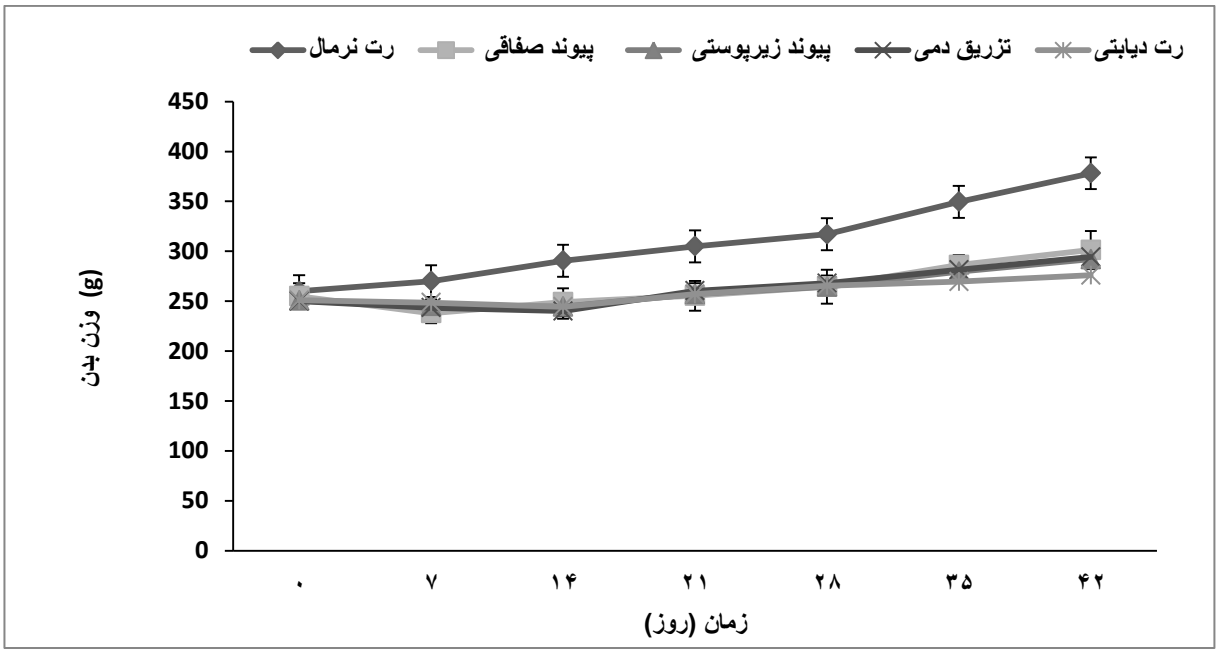
بررسی وزن رت‌ها پس از پیوند سلول

وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف بوسیله ترازو در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ اندازه گیری شد و با گروه کنترل مقایسه شدند. مطابق شکل ۵ وزن رت‌های دیابتی با گذشت زمان نسبت به گروه نرمال کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$) به طوریکه در روزهای ۳۵ و ۴۲ نسبت به روزهای دیگر این کاهش با شدت بیشتری صورت گرفته بود. اما گروه‌های مورد آزمایش (پیوند سلول) نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌داری در وزن را نشان دادند ($P<0/05$). که گروه دریافت کننده پیوند درون صفاقی نسبت به گروه‌های دیگر در افزایش وزن رت‌ها موثرتر عمل کرده بود در حالیکه در دو گروه پیوند زیرجلدی و تزریق در دم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵).

شکل ۳- بررسی غلظت گلوکز خون در رت‌های دریافت‌کننده سلول‌های EnMSCs در گروه‌های مختلف و مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ بعد از پیوند.



شکل ۴- اندازه گیری سطح انسولین خون در رت‌های دریافت‌کننده سلول‌های EnMSCs در گروه‌های مختلف و مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ بعد از پیوند.



شکل۵ – اندازه‌گیری وزن بدن در رت‌های دریافت‌کننده سلول‌های EnMSCs در گروه‌های مختلف و مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ بعد از پیوند.

بحث

در این مطالعه، داربست نانوالیاف PAN را با استفاده از روش الکتروریسی تهیه و اتصال و بقای سلول‌های بنیادی اندومتر بر سطح این داربست را با میکروسکوپ الکترونی و روش MTT بررسی شد و سپس سلول‌ها به همراه داربست را به صورت درون حفره صفاق شکمی و ناحیه زیرجلدی در سطح شکمی در رت‌های دیابتی پیوند زده شدند، همچنین برای مقایسه بیشتر از گروه تزریق سلول به ناحیه دم استفاده شد. در مطالعه حاضر رت‌ها بوسیله تزریق STZ دیابتی شده و برای تایید دیابتی شدن آنها غلظت گلوکز و انسولین خون اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ روز بعد از پیوند سلول و درابست درون صفاقی به رت‌های دیابتی گلوکز خون آنها نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار یافت. همچنین در رت هایی که پیوند سلول و داربست درون صفاقی دریافت کردند وزن و انسولین افزایش یافته ای نسبت به گروه‌های دیگر مشاهده شد. در سال‌های اخیرمهندسی بافت فرصت بی نظیری را برای پیشرفت و بهبودی روش‌های درمانی جهت درمان بیماری‌های مادرزادی و اکتسابی فراهم کرده است. امروزه نقش چشمگیر پلیمرها در زمینه‌های مختلف در زندگی ما انکارناپذیر است. از میان پلیمرهای مختلف، پلی اکریلونیتریل توجه زیادی را به دلیل داشتن ویژگی‌هایی همچون مقاومت کم، پایداری شیمیایی و الکتریسیته‌ی قوی به خود جلب کرده است. پلیمر (داربست) مصنوعی از پلیمریزاسیون آکریلونیتریل بدست می‌آید و در زمینه‌های پزشکی کاربرد دارند [۹]. از سوی دیگر محققان با تحقیق بر سلول‌های بنیادی اندومتریال نشان داده‌اند که این سلولها قادر به تمایز به سلول‌های هر سه لایه مزودرم (استئوسیت، آدیپوسیت) اندودرم (هپاتوسیت وکاردیومیوسیت) و اکتودرم (عصب) هستند بنابراین جایگزین مناسبی برای سلول درمانی می‌باشند [۱۰]. پیوند سلول‌های بنیادی جنینی تمایز یافته به سلول‌های بتای تولید کننده انسولین اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط Soria و همکارانش اتفاق افتاد که از الگوی بیان خود به خودی استفاده شد [۲]. در سال ۲۰۰۱ Lumelsky و همکارانش متوجه تشابه هاتی بین تکوین پانکراس و سیستم عصبی شدند هر چند که این بافت‌ها از لایه‌های زاینده متفاوتی منشا می‌گیرند، بنابراین آنها از روش تولید نورون‌ها برای بدست آوردن سلول‌های درون ریز پانکراسی از سلول‌های بنیادی جنینی استفاده کردند و در روش کار به تمایز انتخابی جمعیت سلولی بیان کننده نستین پرداختند [۱۱, ۱۲]. Amour D. و همکاران در پژوهش خود در ارتباط با تمایز موثر سلول‌های بنیادی انسان توانستند ۸۰% از سلول‌های بنیادی جنینی انسان را به سمت

سلول‌های آندودرم بیان کننده Sox17 تمایز دهند [۱۳] که در تکوین سلول‌های آندوکرینی پانکراس نقش اساسی دارند و پتانسیل فراوانی برای تولید انسولین دارند [۱۴]. بعلاوه مطالعات مشابه با مطالعه حاضر صورت گرفته که نتایج آنها با یافته‌های حاصل مطابقت دارند همچون در مطالعه‌ای که توسط Garcia درسال ۲۰۱۰ انجام شد، مقدار ۱×۱۰^{۶} سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی را به موش‌های دیابتی شده نوع ۲ تزریق کردند. نتایج این مطالعه حاکی از کاهش قندخون در طول دوره درمان بود [۱۵]. درمطالعه حاضر، پیوند سلول‌های EnMSCs بر داربست به طور موثر وبا اختلاف معنی‌داری وزن موش‌های دیابتی را افزایش داد. در افزایش انسولین و کاهش غلظت گلوکز خون نیز پیوند سلول‌های EnMSCs بر داربست به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل موثر بود. Ende و همکارانش در سال ۲۰۰۴تاثیر سلول‌های بنیادی خون بندناف پیوند زده شده به موش‌های دیابتی نوع ۱ را درکاهش قندخون نشان دادند [۱۶]. Hsiao-Yan و همکارانش سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را به سلول های انسولین ساز تمایز دادند سپس بیان ژن‌های انسولین، انتقال دهنده گلوکز-۲ و پروانسولین را در سلول‌های تمایز یافته با استفاده از تکنیک‌های RT-PCR و ایمنوهیستوشیمی تایید کردند [۱۷]. همچنین برخی از نویسندگان همین مقاله نیز، برای درمان دیابت در موش‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم انسان به سلول‌های بتا برروی داربست نانوفیبر کار کرده اند. آنها همچنین با پیوند سلول‌های تمایز یافته برروی داربست به موش‌های دیابتی شده با STZ ، با بهبود میزان قندخون موش‌ها ۴هفته بعد از پیوند روبرو شده اند که نشان از موثر بودن سلول درمانی برای دیابت است [۱۸]. در این میان انتخاب محل پیوند در بیماری پیچیده ای مانند دیابت از اهمیت خاصی برخوردار است و با وجود محدودیت در پیوند مستقیم به پانکراس روش‌های متفاوتی جهت پیوند پیشنهاد می‌شود. Kim و همکاران در سال ۲۰۰۹ جزایر لانگرهانس جدا شده را برای درمان بیماری دیابت در مدل حیوانی به چهار محل پیوند دادند که شامل کلیه، کبد، عضله و امنتوم بود و سپس در روزهای متوالی میزان گلوگز خون گروه‌های مختلف را ارزیابی کرده و نشان داده مه امنتوم مناسب ترین محل برای پیوند جزایر لانگرهانس در مدل دیابتی می‌باشد [۱۹]. همچنین مطالعات دیگری در این زمینه انجام شده و اشاره شده که عضله و یا کبد مکان‌های مناسبی برای پیوند جزایر لانگرهانس هستند [۲۰, ۲۱]. دراین مطالعه حفره صفاقی نسبت به زیرپوست یا تزریق دمی محلی مناسب برای پیوند پیشنهاد می‌گردد که احتمالا بخاطر وجود رگ‌های خونی فراوان و فراهم آمدن اکسیژن لازم دراین منطقه، فضای کافی برای پیوند، کاهش واکنش‌های ایمنی و التهابی و دسترسی مناسب می‌باشد. اگرچه مطالعات بیشتر در این زمینه توصیه می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در اینجا سلول‌های بنیادی آندومتر رحم انسان و داربست نانوفیبر PAN مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه علاوه بر پیوند سلول‌ها و داربست به حفره شکمی رت‌های دیابتی، گروه‌های دیگری در منطقه زیرجلدی و تزریق در دم انتخاب شدند. پیوند سلول‌ها و داربست در حفره صفاقی در افزایش سطح انسولین خون و وزن رت‌های دیابتی با اختلاف معناداری نسبت به دیگر گروه‌ها موثر بود. همچنین وجود داربست به دلیل سازگاری با شرایط محیط میزبان و قابلیت انعطاف پذیری، باعث شد که سلول‌های پیوند خورده به صفاق به طور چشمگیری منجر به کاهش قندخون رت‌ها شوند. که احتمالا به دلیل گردش خون بالا در حفره صفاقی می‌باشد. استفاده بهینه از داربست مناسب شرایط آماده سازی کشت سلولی با کارایی بالا را افزایش می‌دهد چراکه داربست‌ها می‌توانند شرایط مشابه و سازگار با محیط میزبان فراهم کنند و همچنین از پراکندگی سلول‌ها در محل پیوند و یا عدم سازگاری آنها با بافت میزان جلوگیری کنند. نتایج این مطالعه، پیوند سلول‌های EnMSCs همراه با داربست مناسب در حفره صفاقی را برای کنترل دیابت پیشنهاد می‌دهد. البته نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه برای ارائه یک درمان کامل وجود دارد.

References

[1] Hamburger ER, Goethals ER, Choudhary A, Jaser SS. Sleep and depressive symptoms in adolescents with type 1 diabetes not meeting glycemic targets. Diabetes research and clinical practice. 2020;169:108442.

[2] Hoveizi E, Tavakol S, Shirian S, Sanamiri K. Electrospun Nanofibers for Diabetes:

Tissue Engineering and Cell-Based Therapies. Current stem cell research & therapy. 2019;14(2):152-68.
[3] Song YR, Kim J-K, Lee H-S, Kim SG, Choi E-K. Serum levels of protein carbonyl, a marker of oxidative stress, are associated with overhydration, sarcopenia and mortality in hemodialysis patients. BMC nephrology. 2020;21(1):1-11.
[4] Mishra VK, Shih H-H, Parveen F, Lenzen D, Ito E, Chan T-F, et al. Identifying the therapeutic significance of mesenchymal stem cells. Cells. 2020;9(5):1145.
[5] Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, Ai J, Massumi M. Definitive endoderm differentiation of human-induced pluripotent stem cells using signaling molecules and IDE1 in three-dimensional polymer scaffold. Journal of biomedical materials research Part A. 2013. Epub 2013/11/28.
[6] Hoveizi E, Khodadadi S, Tavakol S, Karima O, Nasiri-Khalili MA. Small molecules differentiate definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells on PCL scaffold. Appl Biochem Biotechnol. 2014;173(7):1727-36. Epub 2014/05/28.
[7] Hoveizi E, Ebrahimi-Barough S, Tavakol S, Nabiuni M. In vitro comparative survey of cell adhesion and proliferation of human induced pluripotent stem cells on surfaces of polymeric electrospun nanofibrous and solution-cast film scaffolds. Journal of biomedical materials research Part A. 2015;103(9):2952-8. Epub 2015/02/19.
[8] Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, Rajabi-Zeleti S, Tavakol S. Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering. Cell biology international. 2014;38(1):41-9. Epub 2013/09/14.
[9] Ramezani MR, Ansari-Asl Z, Hoveizi E, Kiasat AR. Polyacrylonitrile/Fe (III) metal-organic framework fibrous nanocomposites designed for tissue engineering applications. Materials Chemistry and Physics. 2019;229:242-50.
[10] Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. Human reproduction update. 2016;22(2):137-63. Epub 5/11/11.
[11] Hoveizi E, Tavakol S. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells derived beta cell precursors on a nanofibrous scaffold: An approach to treat diabetes mellitus. Journal of cellular physiology. 2019;234(7):10196-204. Epub 2018/11/06.
[12] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science. 2001;292(5520):1389-94. Epub 2001/04/28.
[13] D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat Biotechnol. 2005;23(12):1534-41. Epub 2005/11/01.
[14] Ghorbani-Dalini S, Azarpira N, Sangtarash MH, Soleimanpour-Lichaei HR, Yaghobi R, Lorzadeh S, et al. Optimization of activin-A: a breakthrough in differentiation of human induced pluripotent stem cell into definitive endoderm. 3 Biotech. 2020;10(5):215. Epub 2020/05/02.
[15] Garcia MM, Fandel TM, Lin G, Shindel AW, Banie L, Lin C-S, et al. Treatment of erectile dysfunction in the obese type 2 diabetic ZDF rat with adipose tissue-derived stem cells. The journal of sexual medicine. 2010;7(1):89-98.
[16] Ende N, Chen R, Reddi AS. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulitis in type 1 diabetic mice. Biochemical and biophysical research communications. 2004;325(3):665-9. Epub 2004/11/16.
[17] Lin HY, Tsai CC, Chen LL, Chiou SH, Wang YJ, Hung SC. Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating Akt and ERK. Journal of biomedical science. 2010;17:56. Epub 2010/07/14.
[18] Hoveizi E, Tavakol S, Shirian S, Sanamiri K. Electrospun nanofibers for diabetes: tissue engineering and cell-based Therapies. Current stem cell research & therapy. 2019;14(2):152-168
[19] Kim H-I, Yu JE, Park C-G, Kim S-J. Comparison of four pancreatic islet

implantation sites. Journal of Korean medical science. 2010;25(2):203-10.
[20] Espes D, Eriksson O, Lau J, Carlsson P-O. Striated muscle as implantation site for transplanted pancreatic islets. Journal of transplantation. 2011;2011.
[21] Vaithilingam V, Bal S, Tuch BE. Encapsulated islet transplantation: where do we stand? The review of diabetic studies: RDS. 2017;14(1):51.

Experimental Study on Evaluation of Effects of Implantation Site of Mesenchymal Stem Cells/scaffold on Recovery of Diabetic in a Rat Model

Hoveizi E.*

Associate professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

* (Corresponding author): e.hoveizi@scu.ac.ir

https://doi.org/10.30495/jdb.2023.1966697.1331

Received: August 2022 Accepted: February 2023

Abstract

Diabetes Mellitus is an autoimmune and chronic disorder that has spread rapidly all over the world due to lifestyle and obesity. In this study, we are trying to find an effective step in controlling diabetes by designing an engineered tissue and grafting it to different sites in the animal model. Uterine endometrial mesenchymal stem cells (EnMSCs) were prepared using the enzymatic extraction method and PAN nanofiber scaffold by electrospinning method. EnMSCs were cultured on the scaffold and transplanted into diabetic rats treated with streptozotocin. The engineered tissue was transplanted in one group peritoneally in the abdominal cavity and the other group subcutaneously. Also, in another group of rats, EnMSCs were injected through the tail. After transplantation, blood glucose, insulin, and weight of rats were measured. The findings of the present study showed that the method and area of stem cell transplantation play an important role in the control of diabetes. In the groups receiving EnMSCs, glucose concentration, blood insulin level, and body weight were improved compared to the control group. Compared to other groups, glucose concentration decreased significantly and blood insulin level and body weight increased significantly in rats receiving a peritoneal transplant. In the subcutaneous transplant group and the injection group, there was no significant difference in the investigated criteria. According to the results of this study, transplantation of EnMSCs using PAN scaffold in the peritoneal site can be suggested for the treatment of diabetes, although more studies are needed in this field to provide a complete treatment.

Keywords: Diabetes, Nanofiber scaffold, Tissue engineering, Endometrial stem cells.