بررسی اثر درمانی پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی آمنیونی در درمان دیابت نوع یک

سوسن رستم پور[۱]، یدالله عدالت پناه[۲*]، فریبا عنایتی پرور[۲]، رضا حقیقی[۳]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۳- دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

*مسئول مکاتبات: edalat2017@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

چکیده

دیابت قندی می‌تواند ناشی از فقدان انسولین یا مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین همراه با کاهش ترشح انسولین باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر درمانی پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی آمنیونی دردرمان دیابت نوع یک صورت گرفت این مطالعه از نوع تجربی بوده وحیوانات به چهار گروه تقسیم شدند: گروه شاهد یا سالم، گروه کنترل دیابتی، گروهی که سلول‌ها را به همراه محیط کشت دریافت کردند و گروهی که فقط سوپ سلولی دریافت کردند. سطوح قند و انسولین خون و وزن حیوانات در طول مطالعه با آزمون های آماری ANOVA و t-test بررسی شدند. با پیوند مرحله اول سلول های بنیادی کاهش معنی داری در قند خون حیوانات هر دو گروه دریافت کننده سلول به همراه محیط کشت (p =۰/۰۰٤) و گروهی که سوپ سلولی دریافت کرده بودند (p =۰/۰۱٤) نسبت به گروه کنترل وجود داشت. این نتایج پس از مرحله دوم مشاهده نشد. سطوح انسولین اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری نداشت. مطالعه حاضر نشان داد که پیوند مکرر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند قند خون را کاهش داده و سطح انسولین خون را بالا ببرد و تزریق سوپ سلولی به تنهایی نمی‌تواند به اندازه پیوند سلول موثر باشد.

کلمات کلیدی: پیوند سلول‌های بنیادی، آمنیون، مدل دیابتی تیپ یک، درمان دیابت.

مقدمه

دیابت قندی شایع‌ترین اختلال متابولیک همراه با افزایش قند خون در انسان می‌باشد. دیابت می‌تواند ناشی از فقدان انسولین (دیابت نوع یک) یا مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین همراه با کاهش ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده (دیابت نوع دو) باشد (۱۱، ۲۲).

رشد این بیماری از سال ۱۹۸۵ گسترش چشمگیری داشته و تا سال ۲۰۱۱ تعداد افراد مبتلا، به ۳٤۷ میلیون نفر رسیده است. طی ۲۰ سال گذشته تعداد مبتلایان در دنیا هفت برابر شده است و در صورت تداوم روند فعلی با افزایش سالانه هفت میلیون نفر به جمعیت این بیماران، تا سال ۲۰۲۵ این تعداد به ۵۵۰ میلیون نفر خواهد رسید (۳، ۱٦).

دیابت نوع یک، بیماری خودایمنی است که سلول‌های انسولین ساز پانکراس را مورد هدف قرار می‌دهد و در نتیجه فعال شدن سلول‌های لنفوسیت T اختصاصی علیه سلول‌های بتا ایجاد می‌شود (۱٤). این فرایند عمدتاً توسط سلول‌های +CD4 که بر روی سلول‌های

T-helper نوع یک اثر می‌گذارند و همچنین سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل اینترفرون گاما (IFNγ)، اینترلوکین ۲ (IL-2) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNFα) ایجاد می‌شود (۲).

این مسأله به خوبی شناخته شده است که انسولین تراپی با انسولین اگزوژن به صورت دقیق و شدید هم نمی‌تواند سطوح متغیر گلوکز خون را به حالت طبیعی بازگرداند (۱۷).

در بیماران دیابت تیپ یک درمان با انسولین اگزوژن درمان استاندارد و مؤثری است اما با کنترل دقیق سطوح قند خون و در بیماران با ظرفیت بالا، بیماری‌های ثانویه مثل نارسایی کلیه، رتینوپاتی و پای دیابتی بعد از سال‌ها درمان به صورت شایع دیده می‌شوند (۵).

پیوند سلول‌های جزایر لانگرهانس یک درمان بالقوه برای دیابت تیپ یک به حساب می‌آید. اما این رویکرد درمانی به دلیل کمبود اهداکنندگان بافتی مناسب برای پیوند محدود شده است. یک درمان جایگزین برای پیوند این است که یک منبع تجدید پذیر از سلول‌های انسولین ساز را کاشت کنیم (۱۵).

در آزمایشات اولیه و مراحل ابتدایی کارآزمایی‌های بالینی، پیوند جزایر پانکراس نیازمند به استفاده مکرر از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است. استفاده این داروها باعث مستعد شدن بیمار در ابتلا به انواع بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های عفونی می‌گردد (٤، ۱۰).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه غربالگری ژنتیکی و ایمونولوژیکی جهت شناسایی بیماران پره دیابتیک به وجود آمده است که فرصت پیشگیری یا به تعویق انداختن و متوقف کردن پیشرفت بیماری را قبل از تشخیص ایجاد کرده است (۱۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی علاوه بر توانایی وسیع برای تکثیر و تمایزشان به انواع مختلف بافت‌های مزودرمی، این توانایی را نیز دارند که برخی زیر مجموعه‌های سلول‌های ایمنی مثل سلول‌های T بدون مواجهه و خاطره، سلول‌های B، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های Natural Killer سرکوب نمایند. همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند تولید سایتوکاین‌های التهابی را کاهش دهند (٦).

مطالعات اخیری که در محیط آزمایشگاه و مدل‌های حیوانی انجام شده نشان داده که سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش متضمنی در تنظیم ایمنی در بیماری‌های خودایمنی مثل آرتریت روماتویید، لوپوس اریتماتوی سیستمیک و آنسفالیت داشته است (۸).

اخیراً بسیاری از محققان به سلول‌های بنیادی بالغ علاقمند شده‌اند چرا که این سلول‌ها توانایی تبدیل به بسیاری از بافت‌ها را دارند و هیچ نگرانی اخلاقی درباره استفاده از آنها وجود ندارد (۲۰).

مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که سلول‌های انسولین ساز را می‌توان از سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان، بند ناف جنین، خون تازه یا منجمد بند ناف و بافت چربی ایجاد کرد (۲۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان نه تنها تکثیر سلول‌های T را مهار میکند بلکه پاسخ اختصاصی آنتی‌ژن در سلول‌های T21 بدون مواجهه و خاطره‌دار جهت شناسایی پپتید در مدل موش را مهار می‌کنند (٢٤). ایزولاسیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان در بسیاری از مطالعات انجام شده است (۹).

بیان ژن PDX1 به صورت پایدار فاکتوری کلیدی در جهت بیان ژن سلول‌های بتا و تکامل پانکراسی می‌باشد. این فاکتور ژنی در سلول‌های جنینی انسانی کشت شده می‌تواند فنوتیپی مشابه سلول بتای تمایز یافته را فعال کند (۱۲).

اگرچه هیچ عارضه‌ای در درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی گزارش نشده است اما اثرات طولانی‌مدت

آنها روی ایمنی‌زایی و تومورزایی نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (۱۸).

این مطالعه با هدف بررسی اثر درمانی پیوند سلول-های بنیادی مزانشیمی آمنیونی در درمان دیابت نوع یک صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی و از نوع آزمایشگاهی بوده و از لحاظ هدف از نوع کاربردی می باشد. جامعه آماری پژوهش حاضر را رت‌های آزمایشگاهی تشکیل می-دهند که تعداد ۳٦ موش بعنوان نمونه انتخاب و در ٤ گروه ۹ تایی دسته‌بندی گردیدند. گروه اول کنترل، گروه دوم با تزریق داروی استرپتوزوسین به صورت درون صفاقی دیابتی شدند، گروه سوم دیابتی شده و سلول‌های بنیادی آمنیون به آنها تزریق شد و گروه چهارم دیابتی شده و از طریق تزریق سوپ سلولی دریافت کردند.

رت‌های ۸-٤ هفته ماده (پرورش داده شده در ۵۰-٤۰ درصد رطوبت و دارای سیکل ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) از آزمایشگاه حیوانات دانشکده پزشکی خریداری شد. در پایان دومین هفته بارداری، رت‌های ماده بیهوش شده و با سرنگ انسولین اقدام به خارج نمودن مایع آمنیون گردید (n = ۵).

حدود µl ۲۰۰ مایع آمنیون با استفاده از یک سرنگ با سرسوزن گیج ۲۰ جمع‌آوری شد. سپس نمونه مایع آمنیون در پلیت‌های ٦ خانه پلاستیکی در محیط DMEM (Gibco-BRL Grand Island, NY, USA) حاوی ۱۵ درصد FBS (Sigma, St Louis, MO, USA)، ۲ میکرومولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ U/ml استرپتومایسین و ۱/۲۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر آمفوتریپسین B(Sigma) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتمسفر مرطوب حاوی ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۲ هفته کشت داده شد. اولین تعویض محیط در روز دوم و متعاقباً هر ۳ روز یکبار انجام شد.

حدود ۲ هفته پس از شروع کشت، سلول‌ها تریپسینه شده و به پلیت‌های ٦ خانه جدید با نسبت ۱ به ۲ منتقل شدند (۷).

برای ارزیابی قدرت تکثیر سلول‌های جداشده، از روش سنجش واحد کلونی فیبروبلاستی استفاده گردید. بدین ترتیب که ۱۰۰ سلول از پاساژ اول شمارش گردیده و در یک دیش ٦۰ میلی‌لیتری به مدت یک هفته کشت داده شدند. در انتهای دوره کشت، سلول‌ها با استفاده از کریستال ویولت ۳درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ شده و کلون‌های حاصل شمارش شد (۱۲).

به به منظور اثبات و ارزیابی ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی در این مطالعه از تست تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور حدود ۵۰۰۰۰ سلول در ظروف ٦ خانه‌ای درمحیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پس ازمرحله confluency محیط سلولها با محیط تمایز به استخوان و چربی جایگزین گردید. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتراسکوربیک اسید ۳ فسفات (Sigma; USA)، ۱۰ نانومولاردگزامتازون (Sigma; USA) و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات (Sigma,USA) و محیط چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳- فسفات (Sigma; USA)، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma; USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) است. در پایان دوره تمایز سلول‌ها مورد ارزیابی قرارگرفتند. برای

استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد برای چربی از رنگ‌آمیزی اویلرد استفاده شد (۹).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تعداد مشخص سلول به ازای هر موش در ۵۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت از طریق ورید دمی به حیوانی که بی‌هوش شده است تزریق گردید. در مرحله اول تعداد ۸۳۰۰۰ سلول به ازای هر موش در ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون سرم از طریق ورید دمی پیوند شد در این مرحله از مطالعه تعدادی از موش‌ها به دلیل مرگ و میر از مطالعه خارج شدند و در مرحله دوم تعداد ۲۵۰۰۰۰ سلول به ازای هر موش همراه محیط کشت بدون سرم از طریق ورید دمی پیوند شد. همینطور در موش‌های گروه سوم حجم مشابهی از سوپ سلولی به روش مشابهی به هر موش بدون سلول تزریق شد (۱۹).

سطح گلوکز خون حیوانات پیش و پس از پیوند به صورت هفتگی و بین ساعات ۸-۹ صبح به وسیله دستگاه گلوکومتر Exicheck اندازه‌گیری گردید. سطح انسولین تولیدی نیز به وسیله سنجش سطح انسولین خون به روش الایزا با کیت Mercodia ساخت کشور سوئد مورد پایش قرار گرفت. در این مطالعه تمامی تست‌ها به صورت سه تایی انجام شد. نتایج بدست آمده، با نرم‌افزار SPSS 23 آنالیز شده و با استفاده از آمار توصیفی و آنالیز آماری t-test و آنالیز واریانس، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج CFU: در این مطالعه ۱۰۰ سلول در درون پتری دیش‌های ۷۰ سانتی‌متری به مدت یک هفته کشت داده شد. در طول یک هفته مورد نظر روند تکثیر سلول‌ها مورد مشاهده قرار گرفت. در پایان یک هفته کشت سلول‌ها مورد نظر در زیر میکروسکوپ اقدام به شمارش تعداد کلون‌ها (مجموع سلول‌های حاصل از یک سلول منفرد) شد. بر اساس نتایج حاصله مشاهده گردید که به ازای هر ۱۰۰ سلول کشت‌یافته به‌طور متوسط ۷۰ کلون تشکیل می‌شود (شکل۱).

پتانسیل تمایزی: پس از گذشت ۳ هفته از قرار گرفتن سلول‌ها در محیط‌های تمایزی، نتایج رنگ‌آمیزی اختصاصی گزارش شد. در بررسی تمایز سلول‌ها به چربی پس از گذشت چند روز قطرات چربی قابل رؤیت بود و با گذشت زمان در برخی از سلول‌ها کم‌کم تمام سیتوپلاسم انباشته از قطرات چربی شد. رنگ‌آمیزی اویل رد تائید کننده ماهیت قطرات چربی بود. در نتیجه این رنگ آمیزی سیتوپلاسم سلول‌ها به رنگ قرمز دیده شد. در اثر رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ساختارهای ندول مانندی نمایان شد که نشان‌دهنده تشکیل ماتریکس مینرالیزه در محیط تمایزی استخوان بود (شکل۲).

شکل ۳ میانگین انسولین را یک هفته پس از مرحله اول پیوند در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت (p = ۰/۱۰۲).

شکل ٤ میانگین انسولین را یک هفته پس از مرحله دوم پیوند در گروه های مورد مطالعه نشان می دهد، نتایج نشان داد تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه وجود نداشت (p =۰/۲۷٤).

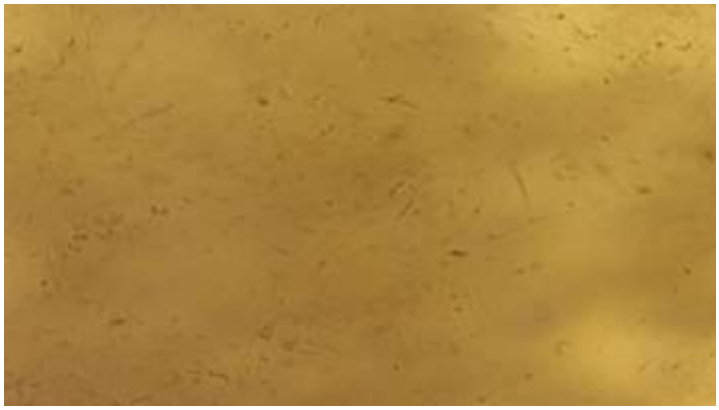
شکل ۵ میانگین قند خون را در گروه‌های مختلف قبل و یک هفته پس از مرحله اول پیوند سلول نشان می‌دهد، در گروه دریافت‌کننده سلول میانگین قند خون قبل از پیوند ۸۷٤ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و بعد از پیوند ۳۱۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است که این تفاوت معنادار می‌باشد. این معنی‌داری در گروهی که فقط سوپ سلولی دریافت کرده‌اند نیز دیده می‌شود به این صورت که میانگین قند خون قبل از پیوند ۷۱۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و پس از آن ٤۱۷ میلی‌گرم بر دسی-

لیتر بوده است. با مقایسه تغییرات میانگین بین گروه‌ها تغییرات کاهشی میانگین قند خون ۵۵۵ واحدی در گروه دریافت‌کننده سلول و تغییرات کاهشی میانگین ۲۹٤ واحدی در گروه دریافت‌کننده سوپ سلولی در مقابل تغییرات افزایشی گروه دیابتی وجود دارد که نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین تمامی گروه های مورد مطالعه می‌باشد (p <۰/۰۱).

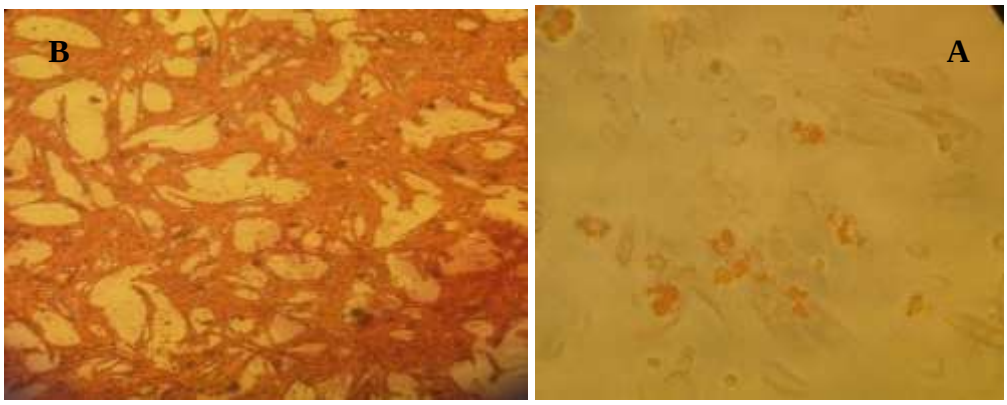
شکل ٦ میانگین قند خون را در گروه‌های مختلف مورد مطالعه قبل و دو هفته پس از مرحله اول پیوند سلول نشان می‌هد، در گروه دریافت‌کننده سلول میانگین قند خون قبل از پیوند ۸۷٤ میلی‌گرم بر دسی-لیتر و بعد از پیوند ۳۵۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است که این تفاوت معنادار می‌باشد. این معنی‌داری در گروهی که فقط سوپ سلولی دریافت کرده‌اند نیز دیده می‌شود به این صورت که قبل از پیوند ۷۱۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و پس از آن ٤۳۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است. با مقایسه تغییرات میانگین بین گروه‌ها تغییرات کاهشی میانگین قند خون ۵۲۰/۷ واحدی در گروه دریافت‌کننده سلول و تغییرات کاهشی میانگین ۲۷۹ واحدی در گروه دریافت کننده سوپ سلولی در مقابل تغییرات افزایشی در گروه دیابتی وجود دارد که از لحاظ آماری تفاوت بین همه گروه‌ها معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۱).

شکل ۷ میانگین قند خون را در گروه های مختلف مورد مطالعه قبل و سه هفته پس از مرحله اول پیوند سلول نشان می‌دهد، در گروه دریافت‌کننده سلول میانگین قند خون قبل از پیوند ۸۷٤ میلی‌گرم بر دسی-لیتر و بعد از پیوند ۳۱۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است که این تفاوت معنادار می‌باشد. این معنی داری در گروهی که فقط سوپ سلولی دریافت کرده اند نیز دیده می‌شود به این صورت که قبل از پیوند ۷۱۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و پس از آن ٤۱۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است. با مقایسه تغییرات میانگین بین گروه‌ها تغییرات کاهشی میانگین قند خون ۵۵۸/۷ واحدی در گروه دریافت‌کننده سلول و تغییرات کاهشی میانگین ۲۹۹/۵ واحدی در گروه دریافت‌کننده سوپ سلولی در مقابل تغییرات افزایشی در گروه دیابتی وجود دارد که از لحاظ تفاوت معنی‌داری بین تمامی گروه های مورد مطالعه وجود دارد (۰/۰۱ > p).

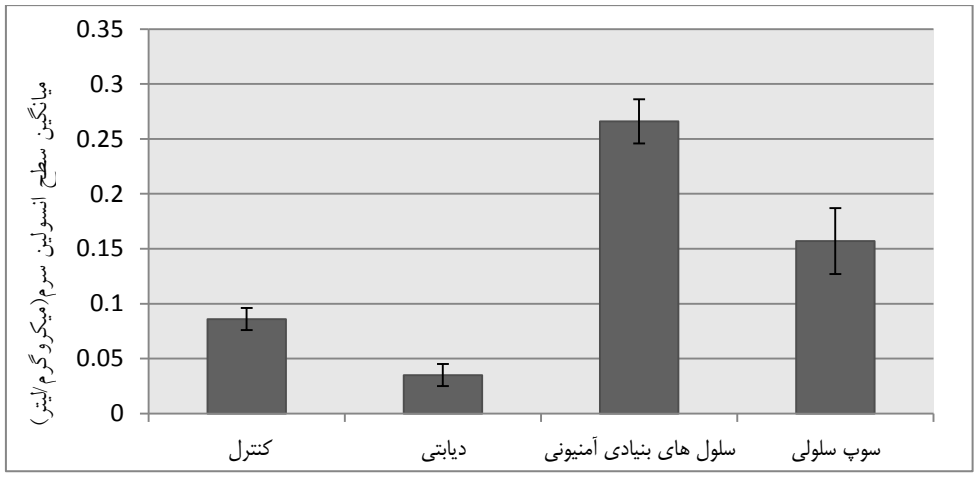
شکل ۸ میانگین قند خون را در گروه‌های مختلف مورد مطالعه قبل و یک هفته پس از مرحله دوم پیوند سلول نشان می‌دهد، میانگین قند خون گروهی که دریافت‌کننده سلول بوده قبل از پیوند ۳۵۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و بعد از پیوند ۳۱٦ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است که این تفاوت معنادار می باشد. این معنی داری در گروهی که فقط سوپ سلولی دریافت کرده اند دیده نمی‌شود به این صورت که قبل از پیوند، میانگین ٤۳۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و پس از آن ٤۱۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است (p< ۰/۰۱). با مقایسه تغییرات میانگین بین گروه‌ها تغییرات کاهشی میانگین قند خون ۳۷/۷ واحدی در گروه دریافت‌کننده سلول و تغییرات کاهشی میانگین ۲۰/۵ واحدی در گروه دریافت‌کننده سوپ سلولی در مقابل تغییرات کاهشی در گروه دیابتی وجود دارد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد (p = ۰/۹۵٤).



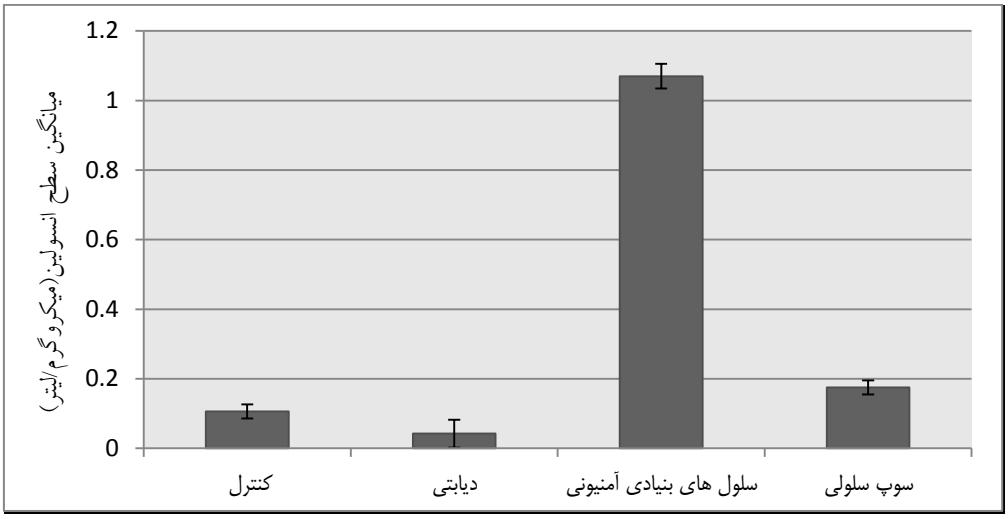
شکل ۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در محیط کشت DMEM. سلول‌های شبه فیبروبلاست دوکی‌شکل جدا شده با روش چسبندگی به پلیت پلاستیکی کشت سلول در پاساژ اول مشاهده می‌شود. سلول‌های دوکی شکل در شکل که بصورت یک کلون سلولی مشاهده می‌شود.



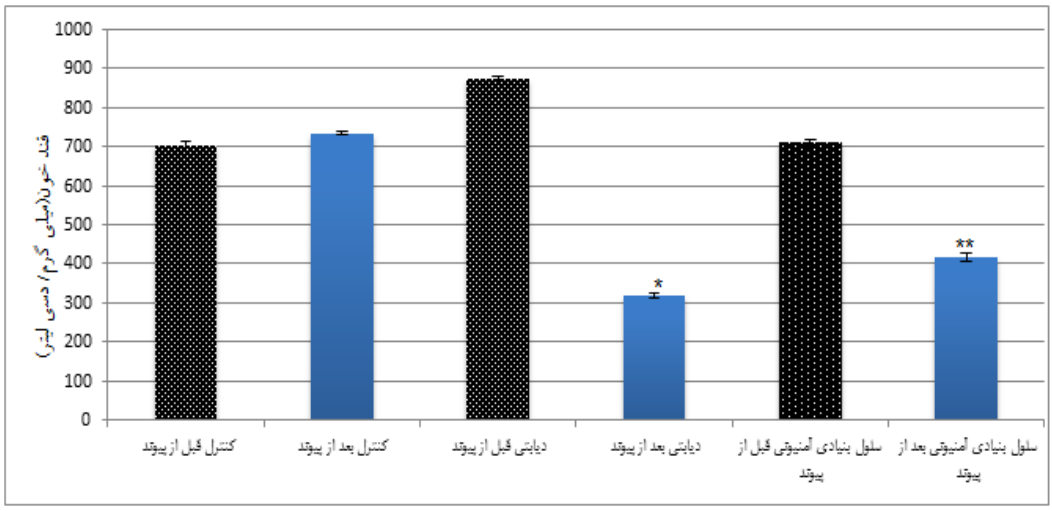
شکل ۲- نتایج رنگ‌آمیزی اختصاصی. A: در نتیجه رنگ‌آمیزی اویل رد سیتوپلاسم سلول‌ها به رنگ قرمز دیده شد. B: در رنگ آمیزی آلیزارین رد ساختارهای ندول مانندی نمایان شد که نشان دهنده تشکیل ماتریکس مینرالیزه در محیط تمایزی استخوان.



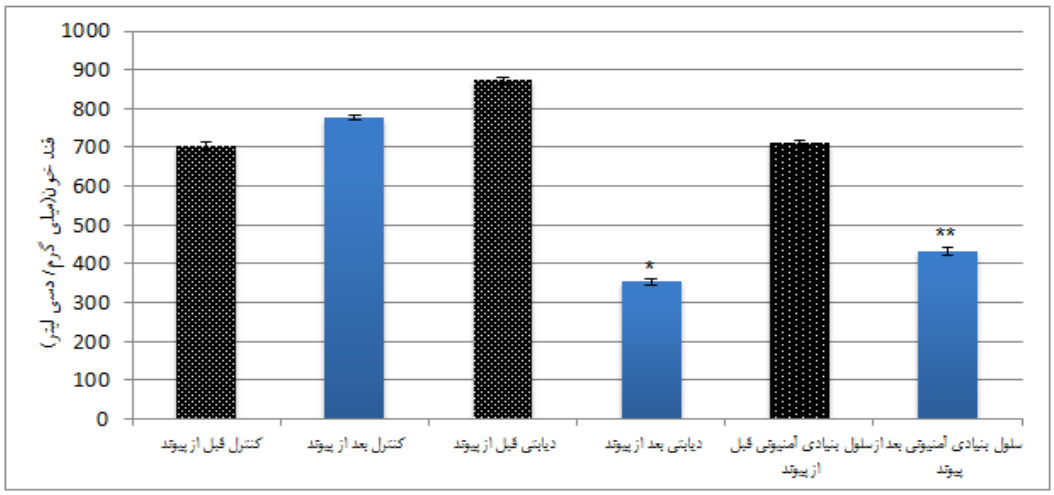
شکل۳- میانگین سطح انسولین سرم بعد از یک هفته از مرحله اول استفاده از سلول‌های بنیادی در سه گروه مطالعه



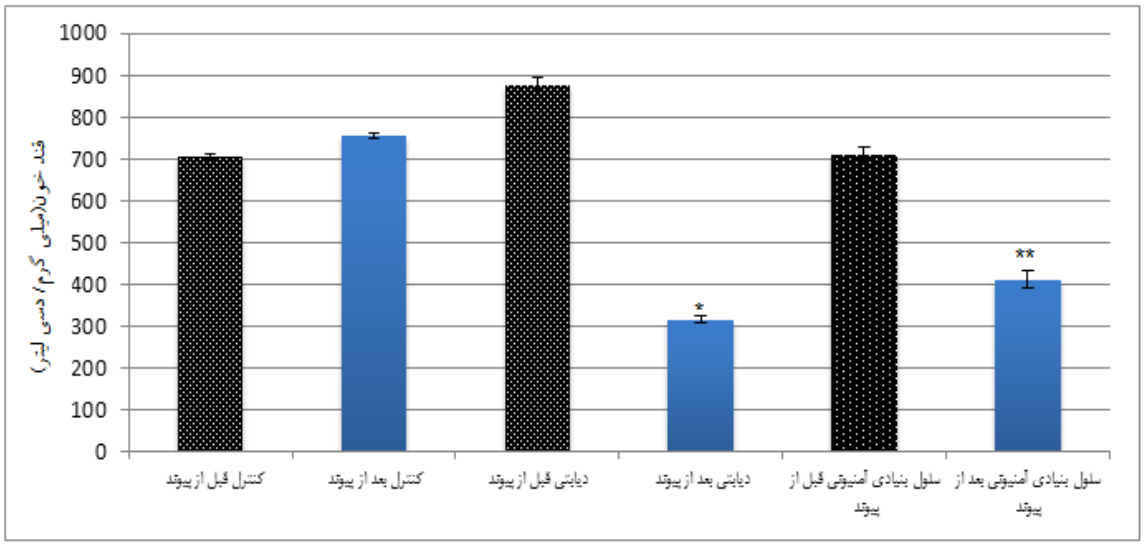
شکل ٤- میانگین سطح انسولین سرم بعد از یک هفته از مرحله دوم استفاده از سلول‌های بنیادی



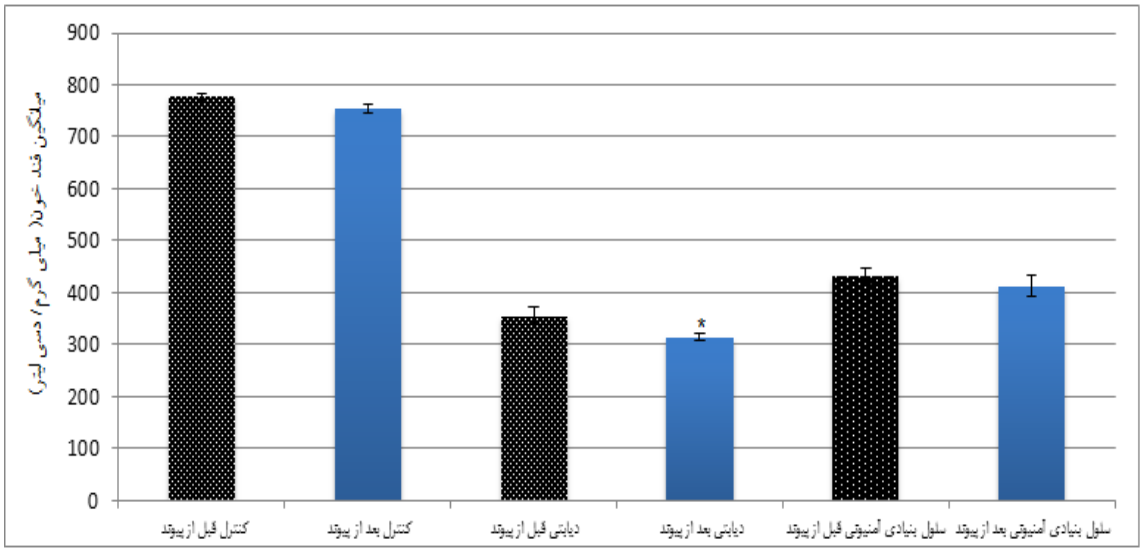
شکل ٥- میانگین قند خون قبل و یک هفته بعد از مرحله اول پیوند سلول در چهار گروه مطالعه میانگین قند خون در آزمون t-test کاهش معناداری در گروه دریافت‌کننده سلول و سوپ سلول داشته است (p = ۰/۰۵ * و p = ۰/۰۱ **).



شکل٦- میانگین قند خون قبل و دو هفته بعد از مرحله اول پیوند سلول در چهار گروه مطالعه میانگین قند خون در آزمون t-test کاهش معناداری در گروه دریافت کننده سلول و سوپ سلولی داشته است (p = ۰/۰۵ * و p = ۰/۰۱ **).



شکل ۷- میانگین قند خون قبل و سه هفته بعد از مرحله اول پیوند سلول در گروه‌های مطالعه. میانگین قند خون در آزمون t-test کاهش معناداری در گروه دریافت کننده سلول و سوپ سلولی داشته است (*p = ۰/۰۵ و **p = ۰/۰۱).



شکل۸- میانگین قندخون قبل ویک هفته بعد ازمرحله دوم پیوند سلول در سه گروه مطالعه میانگین قندخون درآزمون t-test کاهش معنا داری در گروه دریافت کننده سلول داشته است (*p = ۰/۰۵)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داده است که سطح قند خون موش‌های مورد مطالعه در گروه دریافت کننده سلول و محیط کشت بدون سرم با هم و گروه دریافت کننده سوپ سلولی پس از پیوند مرحله اول کاهش معناداری (p <۰/۰۰۱) نسبت به گروه دیابتی نشان داده است، اما پس از دریافت مرحله دوم کاهش قند خون بین هیچ کدام از گروه‌ها معنی‌دار نبوده است (p = ۰/۹۵۸). هچنین در بررسی هر کدام از گروه‌ها در گروه دریافت‌کننده سلول و محیط کشت بدون سرم با هم، قبل و بعد از پیوند مرحله اول در دو نوبت متوالی کاهش معنی‌داری وجود داشته است (p = ۰/۰۰۵). در گروه دریافت کننده سوپ سلولی

قند خون نیز سطح قند خون کاهش معنی‌داری داشته است (p = ۰/۰۱). پس از مرحله دوم پیوند اختلاف معنی‌داری در سطح قند خون گروه دریافت‌کننده سلول و محیط کشت بدون سرم مشاهده شد (p =۰/۰۱۳). این در حالی بود که در گروه دریافت کننده سوپ سلولی پس از مرحله دوم پیوند اختلاف معنی داری ایجاد نشد (p = ۰/۰۵۸). در مطالعه حاضر ابتدا تعداد سلول کمتری جهت اثرات تعدیل کنندگی ایمنی پیوند شد و در مرحله بعدی به منظور ایجاد تمایز سلولی در محیط زنده حیوانی تعداد بیشتری سلول پیوند شد (۱).

مطالعه‌ای که توسط Aali و همکاران که در سال ۲۰۱٤ انجام شده است مشابه نتایج مطالعه حاضر است با این تفاوت که در مطالعه Aali و همکاران قند خون پس از هر مرحله از پیوند کاهش معنی دار در گروه دریافت‌کننده سلول بنیادی و سوپ سلولی داشته است. این مسأله می‌تواند احتمال این را مطرح سازد که سلول‌های بنیادی پیوند شده به سلول های پانکراسی تمایز یافته‌اند و سبب کاهش قند خون مدل دیابتی شده است (۱).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Urban و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شده بر خلاف نتایج مطالعه قبل و مطالعه حاضر بوده است و تفاوت معناداری بین گروه دریافت‌کننده سلول و گروه کنترل در کاهش میزان قند خون وجود نداشته است که این تفاوت در نتایج می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع سلول پیوند شده و همینطور تعداد سلول‌های پیوند شده به ازای هر مورد و همینطور تفاوت در نوع حیوان مورد آزمایش بوده است. به این صورت که حیوان مورد استفاده در این مطالعه موش سوری بوده و یک میلیون سلول حاصل از مغز استخوان در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳).

در مورد سطح انسولین در مدل موش‌های دیابتی پس از دریافت مرحله اول سلول های بنیادی به همراه سوپ سلولی در مقایسه با گروه دیابتی کنترل تفاوت معناداری به دست نیامد (p = ۰/۱۰۲). اما به لحاظ عددی میانگین سطوح انسولین بالاتر گزارش شد همینطور در گروه دریافت‌کننده سوپ سلولی نیز نتایج مشابهی نسبت به گروه دیابتی به دست آمد و اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p = ۰/۱۰۲).

این نتایج در خصوص مرحله دوم پیوند سلول نیز تکرار شد و یک هفته پس از پیوند مرحله دوم سطوح انسولین خون مورد سنجش قرار گرفت و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد (p = ۰/۲۷٤).

در راستای این نتایج در مطالعه‌ای که توسط Aali و همکاران در سال ۲۰۱٤ انجام گرفت سطوح انسولین پس از دریافت سلول‌های بنیادی بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری داشته است که این مسأله می‌تواند ناشی از این باشد که حجم نمونه مطالعه حاضر به دلیل تلفات ایجاد شده پایین‌تر از مطالعه Aali بود (۱).

در مطالعه ای که توسط Ezquer و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی دو گروه موش سوری به تعداد کلی ٦ موش انجام شد که یک گروه ۳تایی از موش ها تعداد ۵۰۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی برگرفته شده از مغز استخوان دریافت کردند و گروه دیگر سلولی دریافت نکرد که نتایج مطالعه کنترل هیپرگلیسمی و رشد بافت سلول‌های بتای پانکراس و تولید انسولین را در گروه دریافت کننده سلول نشان داد (۷).

در مطالعه‌ای که Li و همکاران بر روی موش‌های دیابتی که تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزاشیمی قرار گرفته بودند نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از طریق وریدی تزریق شده بودند توانایی جلوگیری از تخریب سلول‌های بتای باقیمانده

و تمایز به سلول‌های انسولین ساز و کاهش سطح گلوکز خون را دارن (١٤).

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان دیابت نوع یک با استفاده از سلول‌های بنیادی بر گرفته شده از مایع آمنیوتیک توانایی کاهش معنی‌دار قند خون و کنترل هایپرگلیسمی را از طریق مکانیسم-های احتمالی همچون تعدیل سیستم ایمنی و تمایز به سلول‌های انسولین ساز را دارد که این مطالعه راه را برای مطالعات بیشتر در آینده هموار می‌سازد. آنچه می‌توان از مطالعه حاضر استنباط نمود استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری دیابت می‌باشد. سلول‌های بنیادی به دلیل خاصیت جایگزینی با سلول های معیوب و آسیب دیده در درمان بیماری‌ها از جمله بیماری دیابت که مرتبط با پانکراس می باشد، اثرگذار است. در بیماری دیابت با توجه به آسیب‌های وارد بر پانکراس می‌توان با جایگزینی سلول‌های بنیادی میزان قند خون را کنترل و بیماری دیابت را درمان نمود. با توجه به داده‌های این پژوهش و وجود ارتباط معنی‌دار، در میزان سطح قند خون حیوانات مورد مطالعه در گروه دریافت‌کننده سلول بنیادی پیشنهاد می‌گردد مطالعات مشابه بر روی حیوانات با حجم نمونه بیشتر جهت اطمینان حاصل کردن از نتایج صورت گیرد. این بررسی‌ها می‌تواند به درمان موثر بیماری دیابت و شناخت هر چه بیشتر راه‌های کنترل کمک کند. لازم به ذکر است که پس از اطمینان از نتایج حاصله بر روی حیوانات این گونه تحقیقات بر روی انسان‌ها انجام داد.

منابع

1. Aali E., 2014. A comparative study of mesenchymal stem cell transplantation with its paracrine effect on control of hyperglycemia in type 1 diabetic rats. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13(1): 76-85.

2. Bassi E.J., 2012. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. *Journal of Diabetes*, 61(10): 2534- 2545.

2. Biessels G.J., Kerssen A., De Haan E.H., Kappelle, L.J., 2007. Cognitive dysfunction and diabetes: implications for primary care. *Primary Care Diabetes*, 1(4): 187-189.

3. Bouwens L, Houbracken I, Mfopou J.K., 2013. The use of stem cells for pancreatic regeneration in diabetes mellitus. *Nature Revews Endocrinology*, 9(10):598-606.

4. Bruns H., 2013. Alternatives to islet transplantation: future cell sources of beta-like cells. *Clinical Transplantation*, 25(6): 30-33.

5. Ding Y., 2010. Mesenchymal stem-cell immunosuppressive capabilities: therapeutic implications in islet transplantation. *Clinical Transplantation*, 89(3): 270-273.

6. Ezquer F.E., Ezquer M.E., Parrau D.B., Carpio D., Yanez A.J., Conget P.A., 2008. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *American society for blood and marrow transplantation*, 14: 631-640.

7. Favaro E., 2014. Human mesenchymal stem cell - derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 57(8): 1664-1673.

8. Fiorina P., 2009. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *Journal of Immunology*, 183(2): 993-1004.

type 1 diabetes: embryonic and adult stem cells. *Medical Hypotheses,* 67(4): 909-913.

17. Mundre V., 2013. Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1): 77-89.

18. Nadri S., Soleimani M., 2007. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Journal of Cytotherapy*, 9(8):729-737.

19. Neshati Z., 2010. Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats, *Journal of Physiology Biochemestry*, 66(2): 181-187.

20. Ngoc P.K., 2011. Improving the efficacy of type 1 diabetes therapy by transplantation of immunoisolated insulin-producing cells. *Human Cell,* 24(2): 86-95.

21. Sreemantula S., Kilari E.K., Vardhan V.A., Jaladi R., 2005. Influence of antioxidant (L-ascorbic acid) on tulbotamide induced hypoglycaemia/ antihyperglycaemia in normal and diabetic rats. *BMC Endocrine Disorders*, 5(1): 2-5.

22. Urban V.S., Kiss J., Kovacs J., Gocza E., Vas V., Monostori E., Uher F., 2008. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*, 26: 244-253.

23. Zanone M.M., 2010. Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. The *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 95(8): 3788-3797.

9. Hatziavramidis D.T., Karatzas T.M., Chrousos G.P., 2013. Pancreatic islet cell transplantation: an update. *Annals Biomedical Engineering*, 41(3): 469-476.

10. Jacobson M.D., Raff M.C., 1995. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Journal of Nature*, 374(6525): 814-816.

11. Karnieli O., 2007. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*, 25(11): 2837-2844.

12. Kota D.J., 2013. *TSG-6* produced by hMSCs delays the onset of autoimmune diabetes by suppressing Th1 development and enhancing tolerogenicity. *Journal of Diabetes*, 62(6): 2048-2058.

13. Li Y.Y., 2012. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes. *Biomed Materials Engineering*, 22(1-3): 97-103.

14. Lin H.Y., 2010. Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating Akt and ERK. *Journal of Biomedical Science*, 17(4): 56-65.

15. Marzo I., Brenner C., Kroemer G., 1998. The central role o- mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondia, and purified protein complexes. *Journal of Biomedical pharmacother*, 52(6): 248-251.

16. Miszta-Lane H., 2006. Stem cell sources for clinical islet transplantation in