

ارزیابی اثرات پیش درمانی با دفروکسامین بر روی بیان ژن‌های آنژیوژنیک VEGF، ANG1 و TGFβ1 در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲

راضیه تجلی^۱، اکرم عیدی^۱، حسین احمدی تفتی^۲، عبدالرضا پازوکی^۳، علی محمد شریفی^۴ و^۵*

چکیده

مقدمه

دیابت مشتمل بر گروهی از اختلالات متابولیک است که با افزایش قند خون (هیپرگلیسمی) مشخص می‌شود و در چند دهه‌ی گذشته افزایش شیوع قابل توجهی داشته است (۱). یکی از عوارض شایع دیابت قندی، اختلال در ترمیم زخم است که با هزینه‌های بالینی و اجتماعی اقتصادی زیادی همراه است و تقریباً ۲۵٪ از تمام بیماران دیابتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. روش استاندارد مراقبت از زخم برای این بیماران شامل کنترل عفونت همراه با دبریدمان، حذف بقایای زاید، و نگهداری از بستر زخم مرطوب است (۲). اما علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه، در موارد بسیاری زخم‌های ایجاد شده در این بیماران به زخم مزمن تبدیل می‌شوند که در نهایت می‌تواند منجر به قطع عضو و یا مرگ این بیماران شود. بنابراین، درمان‌های موثرتری برای بهبود زخم‌های التیام نیافته در بیماران مبتلا به دیابت مورد نیاز است.

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSCs) یک درمان امیدوارکننده برای ترمیم زخم‌های دیابتی به شمار می‌آید. اما، اثربخشی درمان اتولوگ مبتنی بر ADSCs مشتق از بیماران مبتلا به دیابت نیاز به بهبود دارد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر پیش درمانی با دفروکسامین بر روی بیان ژن‌های آنژیوژنیک در ADSCs دیابتی درمان شده با دفروکسامین بود. بدین منظور، بافت چربی شکمی از سه بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و سه فرد سالم در بیمارستان آتیه‌ی تهران گرفته شد و ADSCs با روش آنژیومی استخراج و تا پاساژ سه کشت داده شدند. ADSCs دیابتی با غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار دفروکسامین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس میزان بقای سلول‌ها با استفاده از تست WST1 و میزان بیان ژن‌های VEGF، ANG1 و TGFβ1 در ADSCs نرمال، دیابتی و دیابتی درمان شده با دفروکسامین با تکنیک Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان بیان هر سه ژن در نمونه‌های دیابتی نسبت به گروه نرمال به صورت معنی‌دار کاهش یافته بود ($p < 0/05$). اما میزان بیان هر سه ژن بعد از درمان سلول‌ها با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار دفروکسامین به مدت ۲۴ ساعت به صورت محسوسی نسبت به گروه دیابتی درمان نشده افزایش یافته بود ($P < 0/05$). به طور کلی، نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که دفروکسامین به طور قابل توجهی باعث افزایش معنی‌دار بیان VEGF، ANG1 و TGFβ1 در ADSCs دیابتی و افزایش ظرفیت آنژیوژن آن‌ها می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، دفروکسامین،

آنژیوژن، بیان ژن

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۵

امروزه درمان با سلول‌های بنیادی اتولوگ (Autologous stem cell therapy; ASCT) به عنوان یک روش درمانی نویدبخش برای بهبود زخم و برای کسانی که از زخم‌های مزمن اندام تحتانی رنج می‌برند مورد توجه قرار گرفته است (۳). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (Adipose

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات فناوری‌های پیشرفته در پزشکی قلب و عروق، بیمارستان مرکز قلب تهران، دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات جراحی کم تهاجمی، دانشکده علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۴- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، دانشکده علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۵- مرکز تحقیقات دارویی رازی و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۶- گروه مهندسی بافت، (NOCERAL)، گروه جراحی ارتوپدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه مالایا، کوالالامپور، مالزی.

sharifalim@gmail.com

توسط آنزیم‌های پرولیل هیدروکسیلاز هیدروکسیله می‌شود و متعاقباً برای تخریب پروتئازومی مورد هدف قرار می‌گیرد. با این حال، در یک ریزمحیط هیپوکسیک، مانند بافت‌های ایسکمیک، پایداری و فعالیت HIF-1 α افزایش می‌یابد که منجر به انتقال آن به هسته و دایمر شدن با HIF-1 β می‌شود. سپس این هتروداایمر به عناصر پاسخ دهنده به هیپوکسی (Hypoxia-Response Element; HREs) در نواحی پروموتور ژن‌های هدف متصل می‌شود و در نتیجه رونویسی آن‌ها را آغاز می‌کند. با این حال، تاثیر اختصاصی پیش شرط سازی با DFO بر بیان ژنی این عوامل در ADSC‌های دیابتی به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است.

در میان ژن‌های هدف پایین دستی کلیدی که توسط HIF-1 تنظیم می‌شوند، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor; VEGF)، آنژیوپوتین ۱ (Angiopoietin 1; ANG1)، و فاکتور رشد تغییر دهنده (Transforming growth factor beta 1; TGF β 1) به طور گسترده برای نقش‌شان در رگ‌زایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۰، ۱۱). VEGF یک عامل رگ زایی قوی است که تکثیر سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت و نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهد. ANG1 در مهار آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال، همچنین تشکیل و پایداری شبکه‌ی عروقی نقش دارد، در حالی که TGF β 1 به جذب پری سیت‌ها و تثبیت عروق کمک می‌کند (۱۲). اختلال در تنظیم این عوامل رگ زایی در بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات ایسکمیک و اختلال در ترمیم زخم نقش دارد. افزایش پتانسیل رگ‌زایی ADSC‌های دیابتی از طریق پیش شرط سازی با DFO می‌تواند رویکرد جدیدی برای بهبود زخم و ترمیم بافت در بیماران دیابتی ارائه دهد. علاوه بر این، بینش بدست‌آمده از این مطالعه می‌تواند به درک وسیع‌تری از مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی رگ‌زایی و

به عنوان در دسترس‌ترین (Derived Stem Cells; ADSCs) منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌تواند از بافت‌های اتولوگ جدا شود، که به طور بالقوه برای درمان زخم دیابت مفید است (۴). ADSC‌ها با تحریک آنژیوژنز و افزایش بازسازی بافت از طریق مکانیسم‌های پاراکرین و اتوکرین در بهبود زخم نقش دارند (۵). اما دیابت منجر به آسیب در خواص و عملکرد سلول‌های بنیادی در بیماران مبتلا می‌شود که استفاده از سلول‌های بنیادی اتولوگ را با چالش مواجه می‌کند (۶). نشان داده شده که خاصیت آنژیوژنز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بیماران مبتلا به دیابت یا سایر سندرم‌های متابولیک به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۷). در نتیجه آماده‌سازی و بهبود عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش از استفاده از آن‌ها در سلول درمانی اتولوگ ضروریست.

در سال‌های اخیر، چندین روش پیش تیمار از جمله پیش تیمار با سایتوکین‌های التهابی، هیپوکسی، داروها و عوامل شیمیایی برای تقویت اثربخشی درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیشنهاد شده است (۸). دفروکسامین (Deferoxamine; DFO) یک شلاته‌کننده آهن بوده که در درمان بیماری‌های مسمومیت با آهن، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ذره‌ی مقلد هیپوکسی، دارویی مفید با سمیت سلولی کم برای پیش تیمار دارویی ADSC‌ها به منظور افزایش ظرفیت رگ زایی آن‌ها به شمار می‌آید (۹). DFO با مهار فعالیت پرولیل هیدروکسیلازها (Prolyl hydroxylase; PHDs)، هیدروکسیلاسیون فاکتور القا شونده توسط هیپوکسی (Hypoxia-Inducible Factor 1; HIF 1) را مهار و آن را تثبیت می‌کند (۸). HIF-1 α یک فاکتور رونویسی است که به عنوان یک تنظیم کننده‌ی اصلی پاسخ‌های سلولی به هیپوکسی، از جمله رگ زایی عمل می‌کند. این فاکتور از دو زیر واحد α و β تشکیل شده است که HIF-1 α حساس به اکسیژن است. تحت شرایط عادی، HIF-1 α

پاسخ‌های سلولی به هیپوکسی در زمینه‌های دیابتی کمک کند. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی برون تنی اثر پیش شرط سازی با دفروکسامین (DFO)، یک عامل تقلید کننده هیپوکسی، بر روی تولید و ترشح فاکتورهای آنژیوژنیک نظیر VEGF، ANGPI و TGFβ1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بیماران مبتلا به دیابت بود.

مواد و روش کار

کلیدیه مراحل این تحقیق پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق (۱۹۲۰۸) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران به انجام رسید.

- استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مشتق از بافت چربی انسان

در این مطالعه‌ی تجربی و آزمایشگاهی، بافت چربی شکمی از ۳ فرد سالم که تحت عمل لیپوساکشن قرار گرفته بودند و همچنین از ۳ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ با کسب رضایت نام‌های کتبی از آن‌ها در بیمارستان آتیه تهران جدا شد و در محلول فسفات بافر سالین (Phosphate buffer) (saline; PBS) (Gibco, Life Technologies, USA)، حاوی یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco, Life Technologies, USA) نگهداری و به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس در شرایط استریل زیر هود، بافت چربی با بافر PBS حاوی آنتی بیوتیک چندین بار شستشو داده شد و پس از جدا کردن بافت‌های زائد، با استفاده از تیغ جراحی تا حد امکان ریز گردید. معادل حجم نمونه‌ی بافت چربی، آنزیم کلاژناز تیپ ۱، با غلظت ۰,۰۷۵٪ (Gibco) به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آنزیم کلاژناز توسط محیط کشت αMEM (Sigma-Aldrich, USA) حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine

- پیش تیمار ADSCها با دفروکسامین و سنجش

زنده‌مانی سلولی با روش رنگ سنجی WST1

جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دفروکسامین بر رشد و تکثیر ADSCهای دیابتی، از روش رنگ سنجی WST1 (Water soluble tetrazolium salt) (Sigma Aldrich, USA) استفاده شد. به طور خلاصه، حدود ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه (NEST biotech, USA) کشت شده و اجازه داده می‌شود سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. پلیت را با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار دفروکسامین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه می‌کنیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت روئی را دور ریخته و به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از محلول WST1 به همراه ۹۰ میکرولیتر محیط کشت به هر چاهک اضافه گردید و سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شد. در نهایت میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه Elisa reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. داده‌های زنده‌ماندن سلول از حداقل سه آزمایش در

دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد (ساخت cDNA) ادامه یافت و در خاتمه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه قرار گرفت تا آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) غیرفعال شود (۱۷).

• طراحی و آماده سازی آغازگرها:

به منظور بررسی بیان ژن های مورد نظر، آغازگرهای اختصاصی برای توالی cDNA هر ژن طبق توالی های موجود در بانک ژنی NCBI و با استفاده از نرم افزارهای Primer 3 plus و oligo Analyzer طراحی شد. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. اختصاصیت تمامی آغازگرها با نرم افزار آنلاین Primer-BLAST (وب سایت NCBI) بررسی و تأیید شد (۱۸).

جدول ۱ - خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Forward primer	Reverse primer	Amplicon	Accession No.
VFE G	TGCAGATTAT GCGGATCAA ACC	TGCATTCACA TTTGTGTGCT GTAG	۸۱ kb	NM_ 0010 2536 6.3
ANG PTI	TCAATCTTTG CACTAAAGA AGGTGT	GTCCAACCTC CCCATTGAC	190 kb	XM_ 0543 6030 2.1
TGFβ 1	GAGCCCAAG GGCTACCAT	GGGTTATGCT GGTTGTACAG G	107 kb	XM_ 0543 2189 7.1
B- Actin	TGTCACCTT CCAGCAGAT GT	AGCTCAGTAA CAGTCCGCCT AGA	101 kb	NM_ 0011 01.5

پلیت های ۹۶ خانه جداگانه بدست آمد و جهت کار آماری ارائه شد (۱۴).

- استخراج RNA، ساخت cDNA و ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن با روش کمی Real-Time PCR
• استخراج RNA

برای استخراج RNA از کیت RiboEX (genall south RNA extraction kit korea) استفاده شد و مراحل بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد (۱۵). برای تعیین مقدار و خلوص RNA استخراج شده، با روش تعیین دانسیته ی نوری (OD: Optical Density) از دستگاه نانودراپ (Thermo scientific-Nanodrop 2000) استفاده شد. مقدار RNA استخراج شده به واسطه ی جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. هم چنین خلوص RNA استخراج شده از طریق نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد (۱۶).

• ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده

ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo scientific, USA)، به شرح زیر انجام شد. یک میکروگرم RNA استخراجی که حجم آن با آب عاری از RNase به ۱۰ میکرولیتر رسیده بود با یک میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. این انکوباسیون به منظور باز شدن ساختارهای ثانویه ی RNA از هم انجام شد. یک میکرولیتر RNases inhibitor (10 u/μl)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش (5X)، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM)، یک میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (200 U/μl) به ترتیب روی یخ به ویالها افزوده و برای چند ثانیه اسپین شدند. واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه (اتصال پرایمر) و سپس ۶۰

- تجزیه و تحلیل آماری

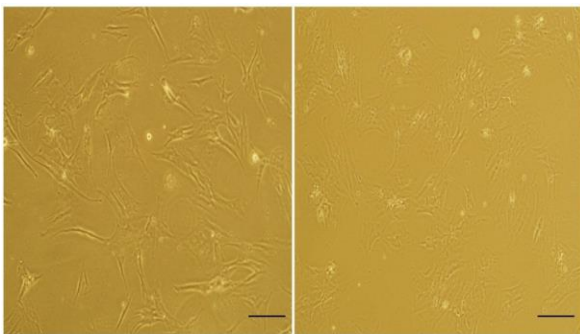
تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار Graph pad V.8.0.1 Prism انجام شد. نتایج داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شده است. جهت تحلیل واریانس از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) استفاده شد و برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. جهت ارزیابی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. سطح معناداری در آزمون‌ها ۰,۰۵ در نظر گرفته شد (۲۱).

نتایج

استخراج و گسترش سلول‌های بنیادی مشتق از بافت

چربی

در این مطالعه، سلول‌های ADSC از بافت چربی شکمی ۳ بیمار مبتلا به دیابت و ۳ فرد سالم استخراج و در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند. سلول‌های مشتق شده از بافت چربی به کف فلاسک چسبیدند و در شرایط مناسب کشت داده شدند (نگاره ۱). سلول‌ها بعد از گذشت ۷-۱۰ روز به تراکم ۸۰-۱۰۰ درصد رسیدند، که پاساژ داده شدند. در نهایت از سلول‌های MSC پاساژ ۳ برای مطالعات بعدی استفاده شد.



نگاره ۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی دو بیمار مبتلا به دیابت در پاساژ ۳. (Scale bar: 100 μ m)

ابتدا با استفاده از گرادیان دمایی، دمای اتصال بهینه برای هر ژن مشخص شد و سپس ارزیابی صحت عملکرد آغازگرهای ژن‌های مورد نظر، با استفاده از سنجش اختصاصی عمل کردن آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و بررسی محصولات این واکنش به وسیله الکتروفورز ژل آگارز، صورت گرفت.

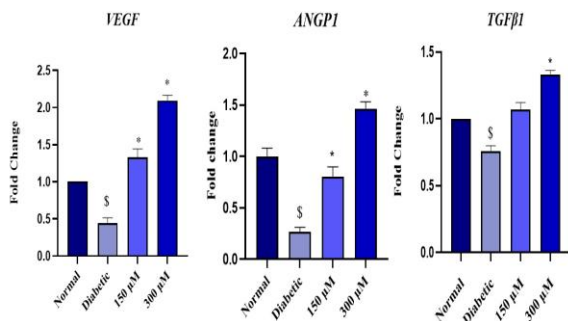
• واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real Time PCR)

همراه با بررسی منحنی ذوب:

مخلوط واکنشی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Master Mix SYBR Green I (Yektatajhez, Iran)، ۰,۵ میکرولیتر (۵ پیکومول) از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر (معادل ۵ نانوگرم) cDNA ساخته شده و ۸ میکرولیتر آب تهیه شد (۱۹). واکنش در دستگاه ریل تایم Roche (Roche, Germany) تحت شرایط دمایی و زمانی زیر انجام یافت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه به عنوان مرحله واسرشتگی اولیه در نظر گرفته شد. سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و مراحل اتصال/توسعه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه.

با اتمام تکثیر و بر اساس نمودار رسم شده، چرخه‌ی آستانه (Cycle of threshold CT) تعیین شد. در ادامه پس از محاسبه تفاضل میانگین CT ژن مرجع از میانگین CT ژن مورد نظر برای هر دو نمونه کنترل و آزمایش، شاخص Δ CT در دو نمونه کنترل و آزمایش به دست آمد. همچنین، از تفاضل دو Δ CT شاخصی تحت عنوان $\Delta\Delta$ CT محاسبه شد. در ادامه نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه آزمایش و کنترل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد. مقادیر رونوشت ژن‌های هدف در مقایسه با بیان ژن B-Actin به عنوان ژن مرجع تعیین شد (۲۰).

داروی دفروکسامین با غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی دار در سطح mRNA فاکتورهای پروآنژیوژنیک *VEGF*، *ANGPI* و *TGFβ1* می‌شود.



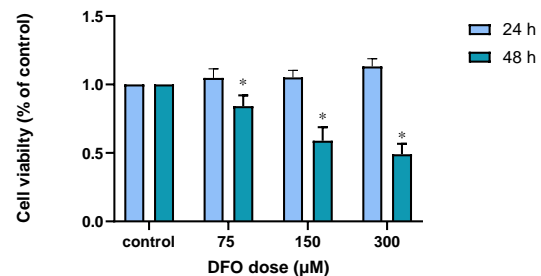
نگاره ۳- آنالیز بیان ژنهای *VEGF*، *ANGPI* و *TGFβ1* در سلول‌های سالم، دیابتی و دیابتی تیمار شده با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرولیتر دفروکسامین. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده‌اند. تفاوت معنی‌دار بین بیان ژن‌ها در سلول‌های تیمار شده با دفروکسامین در مقایسه با سلول‌های دیابتی با (*) نشان داده شده است ($P < 0.05$). تفاوت معنی‌دار بین بیان ژن‌ها در سلول‌های دیابتی مقایسه با سلول‌های سالم با (\$) نشان داده شده است ($P < 0.05$).

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به دلیل توانایی در افزایش رگ‌زایی و تسریع بهبود بافت، به طور گسترده‌ای برای درمان مبتنی بر سلول در زمینه‌ی بازسازی بافت و ترمیم زخم مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۲). با این حال، بیماری‌های متابولیکی همانند دیابت می‌توانند به طور معکوس بر پتانسیل درمانی ADSC‌های اتولوگ مورد استفاده در سلول درمانی تأثیر بگذارند (۲۳). از این رو، استراتژی‌های پیش‌درمانی برای احیای عملکرد طبیعی ADSC‌های اتولوگ قبل از پیوند مورد نیاز است (۲۴). پیش‌شرط‌سازی با هیپوکسی به عنوان یک رویکرد مهندسی برای افزایش ظرفیت نئوواسکولاریزاسیون و بهبود پتانسیل درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۲۵-۲۷). مشخص

دفروکسامین در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت هیچ اثر سیتوتوکسیکی بر روی ADSC‌ها نشان نداد

در این مطالعه، از آزمون WST1 جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف دفروکسامین بر بقاء سلول‌های ADSC در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که درمان ADSC‌ها با دفروکسامین در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت، هیچ اثر سیتوتوکسیکی ندارد (نگاره ۲). از سوی دیگر دفروکسامین به طور قابل توجهی باعث اثرات سیتوتوکسیک پس از ۴۸ ساعت شد. بنابراین در ادامه، از غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار برای ارزیابی اثر دفروکسامین بر بیان ژن‌های مورد بررسی در سلول‌های ADSC استفاده شد.



نگاره ۲- بررسی میزان بقاء سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بیماران مبتلا به دیابت در حضور غلظت‌های مختلف دفروکسامین با سطح معناداری $P < 0.05$.

دفروکسامین سطوح بیان mRNA ژنهای *VEGF*، *ANGI* و *TGFβ1* را افزایش داد

نتایج واکنش‌های PCR در دستگاه Real Time به صورت Ct دریافت شد. برای هر تیمار در زمان‌های مختلف برای هر سه ژن مورد بررسی، داده‌های خام Ct به بیان نسبی ژن تبدیل شدند که نتایج حاصل به صورت داده‌های کمی در قالب نمودار به شرح زیر است (نگاره ۳). همان‌طور که انتظار می‌رفت، مشاهده کردیم که پیش‌شرط‌سازی با

یافته، ویژگی‌های بارز ریزمحیط دیابتی هستند، که همگی خواص و عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تغییر می‌دهند (۳۱). بنابراین اختلال عملکرد ADSC ناشی از دیابت پیامدهای قابل توجهی برای درمان اتولوگ با ADSC دارد و سلول درمانی اتولوگ برای بیماران دیابتی نیاز به بهبود دارد.

درمان سلول‌های دیابتی با داروی دفروکسامین بیان ژن‌های *VEGF*، *ANGPT1* و *TGFβ1* را به طور قابل توجهی افزایش داد. هم راستا با این نتیجه، مطالعات دیگر هم نشان دادند که دفروکسامین می‌تواند بیان *VEGF* را در انواع مختلف سلول، مانند سلول‌های بتای پانکراس، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های استرومایی مغز استخوان القا کند (۳۲). بعلاوه همسو با یافته‌های ما، در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ اثر پیش شرط سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با غلظت‌های ۱۵۰ و ۴۰۰ میکرومولار دفروکسامین به مدت ۴۸ ساعت، سیگنال‌دهی پاراکرین مولکول‌های رگ‌زایی و ضد التهابی را ارتقا داد. ADSC‌های تحت درمان، افزایش وابسته به دوز در *HIF-1α* را نشان دادند که منجر به افزایش فاکتورهای رگ‌زایی *VEGF* و *ANGPT1* پایین‌دستی شد (۳۲). اما نتیجه‌ی مطالعه‌ی ما ناهمسو با نتایج Liu و همکاران بود که نشان دادند که درمان ADSC‌ها با غلظت‌های ۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار دفروکسامین تاثیر معناداری روی بیان *TGFβ1* ندارد هرچند بیان *VEGF* را افزایش می‌دهد (۹).

دفروکسامین یک شلاتور آهن است که با اتصال به آهن، باعث کاهش استرس اکسیداتیو شده و محیط بهتری را برای رگ‌زایی ایجاد می‌کند (۳۳). این ماده‌ی فارما کولوژیک از عملکرد میتوکندری پشتیبانی می‌کند که برای فرآیندهای رگ‌زایی بسیار مهم است. (۳۴) بعلاوه، با فعال کردن مسیرهای سلولی نظیر Akt باعث بقای سلولی، تکثیر و رگ‌زایی می‌شود (۳۵). از منظر فیزیولوژیک، دفروکسامین

شده است که عوامل دارویی تقلید کننده‌ی هیپوکسی برای بازایی مکانیسم‌های رگ‌زایی آسیب دیده، راحت‌تر و مقرون به صرفه‌تر هستند (۲۸). دفروکسامین یک عامل شلاته کننده‌ی آهن و آلومینیوم است که می‌تواند فاکتور *HIF1α* را در شرایط نورموکسی تثبیت کند، بنابراین یک ذره‌ی مقلد هیپوکسی به شمار می‌آید (۲۸). در مطالعه‌ی حاضر، ما از رویکرد پیش شرط سازی دارویی با دفروکسامین برای بازگرداندن بیان ژن‌های دخیل در رگ‌زایی از جمله *VEGF*، *ANGPT1* و *TGFβ1* در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بیماران دیابتی استفاده شد.

در سنجش میزان زنده مانی سلولی با تست *WST1*، دفروکسامین در غلظت‌های ۷۵ تا ۳۰۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت هیچ اثر سیتوتوکسیکی بر روی ADSC‌های دیابتی نشان نداد. مطابق با نتایج فعلی، در مطالعه‌ی دیگری که بر روی ADSC‌های نرمال انجام شد، نشان داده شد که غلظت‌های ۵۰ تا ۵۰۰ میکرومولار دفروکسامین در ۲۴ ساعت اثر سیتوتوکسیک ندارند، از این رو درمان با دفروکسامین می‌تواند یک روش دارویی قابل اعتماد برای افزایش پتانسیل آنژیوژنیک در ADSC‌ها باشد (۹).

ابتدا پروفایل بیان ژن‌های دخیل در رگ‌زایی در ADSC‌های دیابتی در مقایسه با گروه سالم مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه‌ی ما نشان داد که بیان ژن‌های *VEGF*، *ANGPT1* و *TGFβ1* در سلول‌های بنیادی مشتق از بیماران دیابتی به طور قابل توجهی پایین‌تر از سلول‌های مشتق از افراد سالم است. این نتیجه با مطالعات قبلی مطابقت دارد که نشان دادند قرار گرفتن طولانی مدت در معرض ریزمحیط دیابتی می‌تواند باعث کاهش ظرفیت آنژیوژن سلول‌های بنیادی شود (۲۹). Gu و همکاران گزارش کردند که ADSC‌های مشتق شده از بیماران دیابتی، بیان *VEGF* پائین‌تر و همچنین ظرفیت تکثیر پائین‌تری دارند (۳۰). هاپیرگلیسمی، استرس اکسیداتیو، و واکنش‌های ایمنی تغییر

اگرچه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، رگ زائی را افزایش داده و بهبود زخم دیابتی را بهبود می‌بخشند، اما دیابت به شدت روی خواص و عملکرد این سلول‌ها تاثیر می‌گذارد و استفاده از آن‌ها را برای سلول درمانی اتولوگ با مشکل مواجه می‌کند. برای غلبه بر این مشکل، رویکردهای متعددی برای بازگرداندن مکانیسم‌های آسیب دیده در سلول‌هایی که در ریزمحیط دیابتی بوده اند ایجاد شده است. استفاده از شلاتور آهن دفروکسامین یک درمان راحت و دردسترس برای ترمیم مسیر رگ زائی در سلول‌های بنیادی است که به مدت طولانی در معرض هایپرگلیسمی قرار داشته اند. از این رو، ما پتانسیل رگ زائی ADSC‌های دیابتی تحت درمان با DFO را بررسی کردیم. در مجموع، نتایج ما نشان می‌دهد که DFO به طور قابل توجهی باعث افزایش معنی‌دار *ANGPI*، *VEGF* و *TGFβ1* در ADSC‌های دیابتی شده و در نتیجه کارایی آن‌ها را برای سلول درمانی افزایش می‌دهد.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی تاثیر پیش شرط سازی با دفروکسامین در احیای مسیرهای آنژیوژنز تخریب شده در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو"، مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران می‌باشد. از خانم ندا تکیه معرف که ما را در به پایان رساندن این پروژه یاری کردند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

فعالیت آنزیم‌های پرولیل هیدروکسیلاز را مهار می‌کند. بنابراین، پیش شرط سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دفروکسامین منجر به تثبیت *HIF-1α* می‌شود که به نوبه‌ی خود، رونویسی ژن‌های دخیل در رگ زایی، تثبیت عروقی و بازسازی بافت مانند *ANGPI*، *VEGF* و *TGFβ1* را فعال می‌کند. همچنین دفروکسامین با کاهش سطح آهن، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را کاهش می‌دهد و به عملکرد سلولی و رگ‌زایی کمک می‌کند (۳۶). این داده‌ها نشان داد که مدولاسیون شرایط کشت ADSC‌های دیابتی توسط انکوباسیون با دفروکسامین می‌تواند برای تولید سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهبود یافته، و همچنین برای افزایش ترشحات سایتوکین‌ها و فاکتورهای رشد آن‌ها استفاده شود، و آن‌ها را برای کاربردهای درمانی مختلف مناسب سازد (۳۶).

در مقایسه با سایر محرک‌های پیش شرط سازی مانند کلرید کبالت، دفروکسامین این مزیت را دارد که بیش از سه دهه است که برای درمان بیماری‌های اضافه بار آهن در انسان استفاده می‌شود (۳۷). همچنین، یک ویژگی مهم برای کاربرد بالینی این نوع درمان بیولوژیکی این است که می‌توان آن را به طور کامل از سکر توم سلول‌های تیمار شده حذف کرد. *Oses* و همکاران نشان دادند که غلظت DFO به دلیل اندازه‌ی کوچک آن، پس از دو مرحله شستشوی سکر توم و تغلیظ مجدد، به سطوح غیرقابل تشخیص کاهش می‌یابد (۳۲). اما یکی از اشکالات استفاده از دفروکسامین این است که چندین آنزیم دیگر نیز از Fe^{2+} و -2 اکسولوتارات (2-OG) به عنوان کوفاکتور یا سوبسترا استفاده می‌کنند. بنابراین استفاده از DFO می‌تواند تداخل نامطلوبی در مسیرهای دیگر ایجاد کند (۳۸). در این راستا، معرفی داروهای جدیدی که بتوانند به طور اختصاصی PHDs را مهار کنند یا از طریق مکانیسم‌های دیگر *HIF-1α* را تثبیت کنند، نیاز به توجه بیشتری دارد.

فهرست منابع

- al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-21. Available from: doi: 10.1186/s13287-019-1224-y.
- 9 .Liu GS, Peshavariya HM, Higuchi M, Chan EC, Disting GJ, Jiang F. Pharmacological priming of adipose-derived stem cells for paracrine VEGF production with deferoxamine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2016;10(3):E167-E76. Available from: doi: 10.1002/term.1796.
 - 10 .Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *BioMed research international*. 2015;2015. Available from: doi: 10.1155/2015/549412.
 - 11 .Sun J, Shen H, Shao L, Teng X, Chen Y, Liu X, et al. HIF-1 α overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11:1-13. Available from: doi: 10.1186/s13287-020-01881-7.
 - 12 .Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1117-33. Available from: doi: 10.1177/1947601911423654.
 - 13 .Mehrabani M, Najafi M, Kamarul T, Mansouri K, Iranpour M, Nematollahi M, et al. Deferoxamine preconditioning to restore impaired HIF-1 α -mediated angiogenic mechanisms in adipose-derived stem cells from STZ-induced type 1 diabetic rats. *Cell proliferation*. 2015;48(5):532-49. Available from: doi: 10.1111/cpr.12209.
 - 14 .Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Cell viability assays: methods and protocols*. 2017:1-17. Available from: doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1.
 - 15 .Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-derived stem cells:
 1. Gao S, Zhang Y, Liang K, Bi R, Du Y. Mesenchymal Stem Cells (MSCs): A Novel Therapy for Type 2 Diabetes. *Stem Cells International*. 2022;2022. Available from: doi: 10.1155/2022/8637493.
 - 2 .Spampinato SF, Caruso GI, De Pasquale R, Sortino MA, Merlo S. The treatment of impaired wound healing in diabetes: looking among old drugs. *Pharmaceuticals*. 2020;13(4):60. Available from: doi: /10.3390/ph13040060.
 - 3 .El Hage R, Knippschild U, Arnold T, Hinterseher I. Stem Cell-Based Therapy: A Promising Treatment for Diabetic Foot Ulcer. *Biomedicines*. 2022;10(7):1507. Available from: doi: 10.3390/biomedicines10071507.
 - 4 .Blumberg SN, Berger A, Hwang L, Pastar I, Warren SM, Chen W. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes research and clinical practice*. 2012;96(1):1-9. Available from: doi:10.1016/j.diabres.2011.10.032.
 - 5 .Liu R, Dong R, Chang M, Liang X, Wang HC. Adipose-derived stem cells for the treatment of diabetic wound: from basic study to clinical application. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13. Available from: doi: 10.3389/fendo.2022.882469.
 - 6 .Cianfarani F, Toietta G, Di Rocco G, Cesareo E, Zambruno G, Odorisio T. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2013;21(4):545-53. Available from: doi: 10.1111/wrr.12051.
 - 7 .Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M, Duscher D, Kosaraju R, Chung MT, et al. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(3):1-12. Available from: doi: 10.1186/scrt468.
 - 8 .Noronha NdC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et

- current applications and future directions in the regeneration of multiple tissues. *Stem Cells International*. 2020;2020. Available from: doi: Available from: doi: 10.1155/2020/8810813.
- 16 .Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2010(45):e2565. Available from: doi: 10.3791/2565.
 - 17 .Tu H, Avenarius MR, Kubatko L, Hunt M, et al. Distinct Patterns of Emergence of SARS-CoV-2 Spike Variants including N501Y in Clinical Samples in Columbus Ohio. *BioRxiv*. 2021; Available from: doi: 10.1101/2021.01.12.426407
 - 18 .Thornton B, Basu C. Rapid and simple method of qPCR primer design. *PCR primer design*. 2015:173-9 .
 - 19 .Rassouli A, Shihmani B, Mehrzad J, Shokrpour S. The immunomodulatory effect of minocycline on gene expression of inflammation related cytokines in lipopolysaccharide-treated human peripheral blood mononuclear cells. *Animal Biotechnology*. 2022;1-7. Available from: doi: 10.1080/10495398.2022.2077743
 - 20 .Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *Journal of translational medicine*. 2011;9:1-13. Available from: doi: 10.1186/1479-5876-9-10.
 - 21 .Prism G. one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows. 2016 .
 - 22 .Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-derived stem cells: current applications and future directions in the regeneration of multiple tissues. *Stem Cells International*. 2020;2020. Available from: doi: 10.1155/2020/8810813.
 - 23 .Shin L, Peterson DA. Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(2):125-35. Available from: doi: 10.5966/sctm.2012-0031 .
 - 24 .Li M, Jiang Y, Hou Q, Zhao Y, Zhong L, Fu X. Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):1-21. Available from: doi: 10.1186/s13287-022-02822-2.
 - 25 .Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2022. Available from: doi: 10.1089/ten.teb.2021.0145.
 - 26 .Yusoff FM, Nakashima A, Kawano K-i, Kajikawa M, Kishimoto S, Maruhashi T, et al. Implantation of Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Advances Therapeutic Angiogenesis. *Stem Cells International*. 2022;2022. Available from: doi: 10.1155/2022/6795274.
 - 27 .Isik B, Thaler R, Goksu BB, Conley SM, Al-Khafaji H, Mohan A, et al. Hypoxic preconditioning induces epigenetic changes and modifies swine mesenchymal stem cell angiogenesis and senescence in experimental atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem cell research & therapy*. 2021;12(1):1-13. Available from: doi: 10.1186/s13287-021-02310-z.
 - 28 .Nowak-Stepniowska A, Osuchowska PN, Fiedorowicz H, Trafny EA. Insight in Hypoxia-Mimetic Agents as Potential Tools for Mesenchymal Stem Cell Priming in Regenerative Medicine. *Stem Cells International*. 2022;2022. Available from: doi: 10.1155/2022/8775591.
 - 29 .Xu J, Zuo C. The Fate Status of Stem Cells in Diabetes and its Role in the Occurrence of Diabetic Complications. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:745035. Available from: doi: 10.3389/fmolb.2021.745035.
 - 30 .Gu JH, Lee JS, Kim DW, Yoon ES, Dhong ES. Neovascular potential of adipose-derived stromal cells (ASCs) from

- diabetic patients. *Wound Repair and Regeneration*. 2012;20(2):243-52. Available from: doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00765.x.
- 31 .Yin M, Zhang Y, Yu H, Li X. Role of hyperglycemia in the senescence of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:665412. Available from: doi: 10.3389/fcell.2021.665412.
- 32 .Oses C, Olivares B, Ezquer M, Acosta C, Bosch P, Donoso M, et al. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2017;12(5):e0178011. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0178011.
- 33 .Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death & Differentiation*. 2016;23(3):369-79. Available from: doi: 10.1038/cdd.2015.158. Epub 2016 Jan 22.
- 34 .Mursaleen L, Chan SHY, Noble B, Somavarapu S, Zariwala MG. Curcumin and N-Acetylcysteine Nanocarriers Alone or Combined with Deferoxamine Target the Mitochondria and Protect against Neurotoxicity and Oxidative Stress in a Co-Culture Model of Parkinson's Disease. *Antioxidants*. 2023;12(1):130. Available from: doi: 10.3390/antiox12010130.
- 35 .Ikeda Y, Tajima S, Yoshida S, Yamano N, Kihira Y, Ishizawa K, et al. Deferoxamine promotes angiogenesis via the activation of vascular endothelial cell function. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):339-47. Available from: doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.009.
- 36 .Holden P, Nair LS. Deferoxamine: an angiogenic and antioxidant molecule for tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2019;25(6):461-70. Available from: doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0111.
- 37 .Howland MA. Risks of parenteral deferoxamine for acute iron poisoning. *Journal of Toxicology* :1996;34(5):491-7. Available from: doi: 10.3109/15563659609028006.
- 38 .Davis CK, Jain SA, Bae O-N, Majid A, Rajanikant G. Hypoxia mimetic agents for ischemic stroke. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;6:175. Available from: doi: 10.3389/fcell.2018.00175.

