

مقایسه‌ی تأثیر سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با لیپولی ساکارید (LPS) در التیام زخم ناشی از سوختگی پوستی درجه سه در موش

لیلا سلیمانی^{*}، صمد زارع^۱، رحیم حبنقی^۲، نوروز دلیرز^۳، کیاوش هوشمندی^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۹/۱۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سوختگی اثر جبران‌ناپذیری در افراد آسیب‌دیده ایجاد می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان از طریق تولید فاکتورهای رشد و تمایز به سلول‌های رده مزودرمال می‌توانند در درمان آسیب‌های بافتی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین تحریک سلول‌های مزانشیمی با لیپولی ساکارید قابلیت درمانی سلول‌ها را در ترمیم آسیب‌های بافتی افزایش داده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر تزریق زیرجلدی سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با لیپولی ساکارید در التیام جراحات سوختگی پوستی درجه سه در موش سوری و مقایسه‌ی آن با سلول‌های مزانشیمی تحریک‌نشده می‌باشد.

مواد و روش کار: تعداد ۲۷ سر موش سوری نر تحت القاء سوختگی درجه ۳ قرار گرفتند. متعاقب تقسیم‌بندی موش‌ها در سه گروه کنترل، مزانشیم وال پی اس، یک ساعت پس از اعمال سوختگی موش‌ها به ترتیب تحت تزریق زیرجلدی در ناحیه سوختگی با بافر فسفات سالین، سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با لیپولی ساکارید (۱ میلیون سلول در حداکثر حجم ۴۰۰ μ l بافر فسفات سالین) قرار گرفتند. جهت بررسی سرعت روند ترمیم آسیب در طی پروسه‌ی درمانی ۲۱ روزه، مقاطع بافتی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از القاء سوختگی تهیه گردید و رنگ‌آمیزی‌های بافتی هماتوکسیلین اتوزین و ماسون تری کروم انجام پذیرفت.

یافته‌ها: اندازه‌گیری ضخامت بافت جوانه‌ای، رگ‌زایی، تکثیر فیبروبلاستی و رسوب کلاژن نتایج مثبت معنی‌داری در دو گروه مزانشیم و آل پی اس نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.05$). همچنین گروه آل پی اس به لحاظ رسوب کلاژن و سرعت روند بهبود نسبت به گروه مزانشیم برتری داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: تحریک سلول‌های مزانشیمی با لیپولی ساکارید پتانسیل ترمیمی سلول‌ها را در برخی فاکتورهای درمان آسیب سوختگی افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: سوختگی، التیام، سلول مزانشیمی تحریک‌شده، لیپولی ساکارید

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره یازدهم، ص ۱۰۲۴-۱۰۱۲، بهمن ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد شهرکرد، دانشکده علوم تلفن ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۴۶

Email: lsoleimany@yahoo.com

مقدمه

علاوه بر روش‌های معمول مانند پاک‌سازی بستر آسیب به روش‌های گوناگون، بانداژ مناسب و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به روش‌هایی از جمله اتوگرافت (پیوند خودی پوست از ناحیه سالم به ناحیه‌ی آسیب‌دیده) و استفاده از پوست اتولوگ (کاشت قطعه‌ای از اپیدرم در شرایط آزمایشگاهی و ایجاد سطح وسیع و قابل پیوند به نقطه‌ی آسیب‌دیده) اشاره نمود (۸-۶). لازم به ذکر است کمبود ناحیه‌ی اهداکننده و ایجاد بافت اسکار محدودیت‌های استفاده از این

سوختگی یکی از شایع‌ترین آسیب‌هایی است که زندگی فردی و اجتماعی افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳-۱). یکی از عوارض مشاهده شده در سوختگی‌های عمیق، طولانی شدن پروسه‌ی درمان آسیب به واسطه‌ی تولید ناقص سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های التهابی و فیبروبلاست‌ها و نیز کاهش روند آنژیوژنز در محل آسیب می‌باشد (۴، ۵). در حال حاضر، جهت تسریع روند بهبود سوختگی‌های شدید

^۱ کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ استاد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۴ دانشیار ایمنی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۵ دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، اهواز، ایران

روش‌ها می‌باشد. بنابراین همچنان به یک شیوه‌ی درمانی جدید و کاربردی در تسریع روند بهبود آسیب‌های شدید سوختگی نیازمندیم. به‌تازگی روش‌های نوین مبنی بر سلول‌های بنیادی در ترمیم آسیب‌های شدید بافتی گزارش شده است (۹-۱۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چندتوانه‌ی به نسبت هتروژنی می‌باشند که قابلیت پیوند اتولوگ و آلوگرافت را بدون هیچ پاسخ ایمنی در بافت میزبان دارا می‌باشند (۱۳، ۱۴). این سلول‌ها علاوه بر قابلیت تمایز به سلول‌های مزانشیمال (غضروف، استخوان، فیبروبلاستو میوبلاست) و غیر مزانشیمال (سلول‌های عصبی و کبدی)، به‌واسطه‌ی ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها در محل آسیب، روند بهبود آسیب را تسریع می‌نمایند (۱۵-۲۴). استفاده از این سلول‌ها با متدهای مختلف از جمله تزریق موضعی در نقطه آسیب‌دیده، تزریق سیستمیک و استفاده از سلول‌های بنیادی به همراه اسکافولد (داربست‌های سه‌بعدی که به‌منظور جایگاهی برای رشد سلول‌های جایگزین به‌جای سلول‌هایی که عملکرد آن‌ها دچار اختلال شده است بکار می‌رود) در مطالعات متعدد ترمیم آسیب‌های بافتی گزارش شده است (۲۵-۲۸). همچنین سلول‌های مزانشیمی قابلیت درمانی خود را در درمان جراحات سوختگی مدل‌های حیوانی (موش و خوک) و انسانی نشان داده‌اند (۲۸-۳۷). لازم به ذکر است تعداد زیاد سلول‌های موردنیاز در مطالعات درمانی مبنی بر سلول‌های بنیادی، یکی از محدودیت‌های استفاده از این روش درمانی می‌باشد. در برخی مطالعات مشخص شده است که استفاده‌ی هم‌زمان از فاکتورهای نظیر فاکتور رشد هیپاتوسایتی و فاکتور رشد فیبروبلاستی همراه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت ترمیم آسیب را افزایش می‌دهد (۳۸). با توجه به حساسیت بالا و هزینه‌بر بودن پروسه‌ی کشت سلول، رهیافتی جهت افزایش قدرت ترشح فاکتورهای ترمیمی توسط این سلول‌ها در ناحیه‌ی آسیب‌دیده می‌تواند راهکاری اساسی برای کسب نتایج مطلوب اما توسط تعداد کم‌تر از سلول‌های مزانشیمی در پروسه‌ی ترمیم آسیب‌های بافتی ایجاد کند. بر روی سطح سلول‌های مزانشیمی رسپتورهایی تحت عنوان TLR^۱ وجود دارد که آگونیست‌های اختصاصی این رسپتورها، سلول‌های مزانشیمی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اثر لیپوپولی ساکارید یا (LPS) به‌عنوان آگونیست اختصاصی TLR^۴ در کسب یک فنوتیپ پیش التهابی در سلول‌های مزانشیمی مشخص شده است (۳۹-۴۱). همچنین افزایش پتانسیل درمانی سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپولی ساکارید به‌واسطه‌ی افزایش رسوب کلاژن در ماتریکس خارج سلولی بررسی شده است (۴۲).

نقش مثبت لیپوپولی ساکارید به‌منظور تحریک سلول‌های بنیادی پوست در تحریک روند نئوآنژیوژنز به‌عنوان یک فاکتور مؤثر در پیشبرد بهبود روند آسیب نیز گزارش شده است (۴۴). با این وجود تاکنون گزارش کاملی از اثر لیپوپولی ساکارید بر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و تغییر پتانسیل درمانی این سلول‌ها در ترمیم آسیب سوختگی ارائه نشده است. لذا این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپولی ساکارید بر ترمیم آسیب سوختگی درجه ۳ و مقایسه آن با گروه‌های درمان با سلول‌های مزانشیمی تحریک نشده و کنترل در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

سلول‌های مغز استخوان‌های تی‌بیا^۲ (درشت نی) و فمور^۴ (استخوان ران) موش‌های ۶-۸ هفته C57B1/6 نر که از نظر فیزیولوژیک در شرایط تقریباً یکسان قرار داشتند، به روش فلاشینگ، مطابق روش محمدی و همکاران^۵ جداسازی شده و متعاقب دو بار شستشو با سانتریفیوژ (۱۵۰۰ rpm برای مدت ۵ دقیقه) در PBS^۶ به تعداد 1×10^6 سلول به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM-LG (Gibco-انگلستان) و ۱۰ درصد FBS^۷ (Gibco-انگلستان) منتقل گردیدند. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و غلظت ۵ درصد گاز CO₂، مایع رویی کشت سلول تعویض شده و با حذف سلول‌های غیر چسبنده، کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت. در ادامه تعویض محیط کشت هر سه روز یک‌بار انجام گرفته و در مرحله بارآمدگی بالای ۷۰ درصد کشت سلولی، سلول‌های چسبنده با استفاده از محلول تریپسین ۲۵۰۰ درصد (Sigma-Aldrich - آمریکا) جداسازی و جهت پاساژ بعدی به فلاسک‌های T25 منتقل گردیدند (۴۵). با توجه به پروسه‌ی حساس کشت سلول‌های مزانشیمال و نیاز به تعداد زیاد از این سلول‌ها جهت دستیابی به نتیجه‌ی مطلوب درمانی، کشت این سلول‌ها همواره یکی از دغدغه‌های مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات مبنی بر سلول‌های بنیادی بوده است. به‌منظور بررسی تغییر پتانسیل درمانی این سلول‌ها توسط لیپوپولی ساکارید، در مرحله نهایی ۱۰ ngr از لیپوپولی ساکارید (Sigma-Aldrich, USA) در محلول ۱۰% FBS-DMEM، رقیق شده و میزان $3 \times 10^4 \mu$ از محلول رقیق شده به فلاسک کشت سلول اضافه گردید. فلاسک سلولی به مدت یک ساعت با لیپوپولی ساکارید مجاور سازی شده و پس از یک

⁵ Mohammadi et al

⁶ Phosphate buffered saline

⁷ Fetal Bovine Serum

¹ Toll Like receptor

² Lipopolysaccharide

³ Tibia

⁴ Femur

مزانشیم و آل پی اس با کلروفورم آسان‌کنشی شده و بیوپسی گردیدند. نمونه‌برداری از بافت التیام‌یافته و بافت سالم اطرافی صورت پذیرفت. نمونه‌های بیوپسی شده، به مدت ۴۸ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت‌شده و پس از آگیری به کمک درجات مختلف الکل، با پارافین قالب‌گیری شدند. در مرحله بعد، برش‌های ۵ میکرونی از نمونه‌ها توسط میکروتوم روتاری تهیه گردید. متعاقباً مقاطع تهیه شده جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک به کمک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین و ماسون‌تری‌کروم و با استفاده از عدسی چشمی مدرج^۸ خط‌کش‌دار و عدسی چشمی^۹ از نظر ضخامت بافت جوانه‌ای، تعداد فیبروبلاست‌ها و عروق خونی بررسی شدند (۴۷). تراکم فیبرهای کلاژن، با استفاده از رنگ‌های هماتوکسیلین و ائورین و ماسون‌تری‌کروم رنگ‌آمیزی و در سه گروه کنترل، مزانشیم و آل پی اس مورد مقایسه کیفی قرار گرفت. نتایج کمی به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۸ به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی توکی و post hoc مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند، $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی در پاساژ سوم:

هرچند که این سلول‌ها در کشت‌های ابتدایی حاوی برخی سلول‌های غیرچسبنده نیز بودند، اما پس از پاساژهای سلولی، سرانجام در پاساژ سوم (روز ۲۴-۲۱) اکثر سلول‌های غیرچسبنده برطرف شده و سلول‌های چسبنده با ظاهر شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل زمانی که ۸۰ درصد کف فلاسک را پر می‌کردند ویژگی سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دادند (شکل ۱).

تغییرات هیستوپاتولوژیک:

مطالعات میکروسکوپی بر روی پوست آسیب‌دیده در سه گروه کنترل، درمان با سلول‌های مزانشیمی (مزانشیم) و درمان با سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (آل پی اس) انجام پذیرفت. پارامترهایی از قبیل ضخامت بافت جوانه‌ای، تعداد فیبروبلاست‌ها، تعداد عروق تازه تشکیل و میزان کلاژن جهت بررسی روند بهبود آسیب مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. مطابق جدول شماره ۱، حداکثر ضخامت بافت جوانه‌ای ابتدا در گروه آل پی اس و سپس مزانشیم در روز ۷ و در گروه کنترل با ۷ روز تأخیر در روز ۱۴ تشکیل شده است و متعاقباً روند شروع کاهش ضخامت بافت جوانه‌ای در گروه مزانشیم و آل پی اس از روز ۷ و در گروه کنترل از روز ۱۴ مشاهده گردید. در ادامه‌ی روند ترمیم آسیب، کم‌ترین

ساعت مایع رویی فلاسک دور ریخته شده و مجدداً به مدت دوازده ساعت انکوبه شدند (۴۵).

حیوانات مورد آزمایش:

تعداد ۲۷ سر موش سوری نر سالم ۸-۷ هفته با میانگین وزنی ۳۰-۲۵ گرم به مدت یک هفته جهت گذراندن پروسه استرس زدایی و تطبیق با محیط جدید در خانه حیوانات پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. متعاقباً موش‌ها با احتساب شرایط فیزیکی یکسان (وزن، اندازه و وضعیت ظاهری) به‌صورت کاملاً تصادفی در سه گروه تقسیم‌بندی شدند. انجام کلیه آزمایشات در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۱ و با رعایت کامل ضوابط اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

القاء سوختگی درجه سه:

القاء سوختگی درجه سه به روش استاندارد به کمک یک میله استوانه‌ای فلزی به وزن ۶۵ گرم و قطر ۱ cm انجام پذیرفت. میله فلزی مزبور جهت هم دما شدن با آب جوش، به مدت چند دقیقه درون آب جوش قرار داده شد. متعاقباً القاء بیهوشی با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (کتامین هیدروکلراید ۵٪، Alfasan) و Netherland (زایلازین) زایلازین هیدروکلراید ۲٪، Alfasan) Netherland، ناحیه پشت موش‌ها به‌طور کامل تراشیده شده و سوختگی درجه سه به‌وسیله تماس میله فلزی با ناحیه مذکور به مدت ۹ ثانیه ایجاد گردید (۴۶). متعاقباً، ۱ cc محلول نرمال سالین به‌صورت درون صفاقی جهت جبران آب ازدست‌رفته طی سوختگی به موش‌ها تزریق شد. موش‌ها به‌صورت تصادفی و با احتساب شرایط فیزیکی یکسان در سه گروه کنترل، مزانشیم و آل پی اس تقسیم‌بندی شده و یک ساعت پس از القاء سوختگی به ترتیب به‌طور جداگانه تحت تزریق زیرجلدی در ناحیه اطراف سوختگی به ترتیب با بافر فسفات سالین به همراه دریافت روزانه‌ی پماد سیلورسولفادیازین تا پایان دوره، سلول‌های مزانشیمی (تعداد ۱۰^۶ سلول مزانشیمی در ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین) و سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (تعداد ۱۰^۶ سلول مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید در ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین) قرار گرفتند. نگهداری موش‌ها در قفس‌های مجزا، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سیکل ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی و با امکان دسترسی نامحدود به آب و غذا انجام پذیرفت.

نمونه‌برداری، برش‌گیری، رنگ‌آمیزی اختصاصی:

نمونه‌برداری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از القاء سوختگی انجام پذیرفت. در زمان مقرر، موش‌ها در هر سه گروه کنترل،

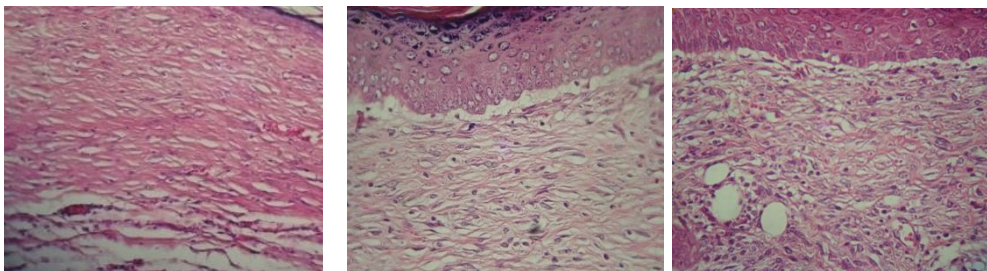
⁹ Graticule

⁸ eyepiece

فیبروبلاست (طبق جدول شماره ۱) بیشترین تعداد فیبروبلاست در روز ۷ را در دو گروه مزانشیم و آل پی اس نشان می‌دهد. همچنین کمترین تعداد فیبروبلاست در روز ۲۱ در گروه آل پی اس مشاهده می‌شود. اختلاف معنی‌داری به لحاظ تغییرات تعداد فیبروبلاست بین گروه کنترل و مزانشیم در سه مقطع زمانی مشاهده نمی‌شود. تنها اختلاف معنی‌دار از لحاظ تعداد فیبروبلاست، تنها در روز ۲۱ و بین دو گروه کنترل و آل پی اس مشاهده می‌شود ($P < 0.04$) که خود گویای برتری این گروه نسبت به گروه مزانشیم در سرعت بخشیدن به روند بهبود می‌باشد. بین گروه مزانشیم و آل پی اس در سه مقطع زمانی هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (جدول شماره ۱). همچنین نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسلین اتوزین در شکل ۲ نشان‌دهنده تفاوت نظم و آرایش بافتی در گروه کنترل، مزانشیم و آل پی اس می‌باشد که تصاویر گویای برتری گروه آل پی اس نسبت به دو گروه دیگر می‌باشد. علی‌رغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار در تعداد فیبروبلاست در سه گروه مورد بررسی در روزهای نخست ترمیم آسیب (روزهای ۷ و ۱۴)، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ماسون‌تری کروم گویای حضور تراکم بیشتر رشته‌های کلاژن در گروه آل پی اس نسبت به گروه مزانشیم و کنترل می‌باشد که می‌تواند گویای اثر لیپوپولی ساکارید در تحریک ترشح کلاژن توسط سلول‌های فیبروبلاست باشد.

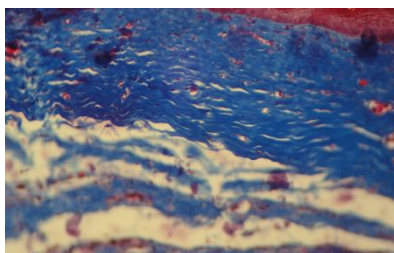
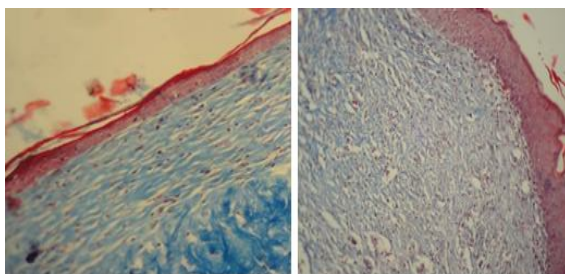


تصویر (۱): مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش در پاساژ سوم کشت سلولی



تصویر (۲): مقایسه نظم و آرایش بافت الیامی (فیبروبلاست‌ها و کلاژن) در گروه کنترل (راست)، مزانشیم (وسط) و آل پی اس (چپ) روز

۲۱ بزرگنمایی (×۲۰۰)



تصویر (۳): مقایسه تراکم کلاژن در بافت التیامی سه گروه کنترل (بالا-راست)، مزانشیم (بالا چپ) و آل پی اس (پایین) در روز ۲۱ (رنگ‌آمیزی ماسون‌تری کروم، بزرگ‌نمایی (×۱۰۰))

جدول (۱): مقایسه نتایج حاصل از تغییرات پارامترهای مربوط به ضخامت بافت جوانه‌ای، تعداد عروق خونی و تعداد فیبروبلاست در سه

گروه کنترل، مزانشیم و آل پی اس

متغیرها	گروه	گروه	P value*	Mean ± SD
	کنترل ۷	مزانشیم ۷	/۰۰۷	۱۳٫۸ ± ۱٫۳۰۳۸ = کنترل ۷
	مزانشیم ۷	آل پی اس ۷	/۰۰۱	۲۴ ± ۳٫۸۰۷۸ = مزانشیم ۷
	مزانشیم ۷	آل پی اس ۷	/۹۹۹	۲۸ ± ۵٫۳۳۸۵۴ = آل پی اس ۷
	کنترل ۱۴	مزانشیم ۱۴	/۰۱۳	۳۰٫۸ ± ۷٫۱۹۰۲۷ = کنترل ۱۴
	مزانشیم ۱۴	آل پی اس ۱۴	/۰۰۱	۲۱ ± ۴٫۴۱۵۸ = مزانشیم ۱۴
بافت جوانه ای	مزانشیم ۱۴	آل پی اس ۱۴	/۹۹۹	۱۸ ± ۲٫۵۴۹۵۱ = آل پی اس ۱۴
	کنترل ۲۱	مزانشیم ۲۱	/۰۰۱	۲۴٫۲ ± ۳٫۷۰۱۳ = کنترل ۲۱
	مزانشیم ۲۱	آل پی اس ۲۱	/۰۰۱	۱۲٫۵ ± ۲٫۱۷۹۴ = مزانشیم ۲۱
	مزانشیم ۲۱	آل پی اس ۲۱	/۹۹۹	۹ ± ۰٫۷۰۷۱۱ = آل پی اس ۲۱
	کنترل ۷	مزانشیم ۷	/۹۸۹	۱۳٫۲ ± ۲٫۵۸۸۴ = کنترل ۷
	مزانشیم ۷	آل پی اس ۷	/۹۴۰	۱۸ ± ۵٫۸۳۰۹ = مزانشیم ۷
	مزانشیم ۷	آل پی اس ۷	/۹۹۹	۱۸٫۶ ± ۴٫۰۳۷۳۳ = آل پی اس ۷
	کنترل ۱۴	مزانشیم ۱۴	/۰۶۲	۱۵٫۲ ± ۱٫۳۵۶۳۷ = کنترل ۱۴
	مزانشیم ۱۴	آل پی اس ۱۴	/۳۳۰	۶٫۴ ± ۰٫۵۴۷۷۲ = مزانشیم ۱۴
تعداد عروق	مزانشیم ۱۴	آل پی اس ۱۴	/۹۹۹	۷٫۸ ± ۲٫۷۷۴۸ = آل پی اس ۱۴

متغیرها	گروه	گروه	P value*	Mean ± SD
	کنترل ۲۱	مزانسیم ۲۱	/۰۰۲	۱۷/۴±۴,۸۱۶۶=کنترل ۲۱
		ال پی اس ۲۱	/۰۰۱	۳/۸±۱,۳۵۰۹=مزانسیم ۲۱
	مزانسیم ۲۱	ال پی اس ۲۱	/۹۹۹	۲/۶±۰,۵۴۷۷۲=ال پی اس ۲۱
	کنترل ۷	مزانسیم ۷	/۹۹۹	۲۱/۲±۳,۲۷۱۰=کنترل ۷
		ال پی اس ۷	/۹۹۹	۲۳/۸±۱,۴۸۳۲۴=مزانسیم ۷
	مزانسیم ۷	ال پی اس ۷	/۹۹۹	۲۳±۴,۸۹۸۹۸=ال پی اس ۷
	کنترل ۱۴	مزانسیم ۱۴	/۹۹۸	۱۹±۳,۵۳۵۵=کنترل ۱۴
تعداد فیبروبلاست		ال پی اس ۱۴	/۹۹۹	۱۴/۶±۲,۷۹۲۸=مزانسیم ۱۴
	مزانسیم ۱۴	ال پی اس ۱۴	/۹۹۹	۱۶±۱=ال پی اس ۱۴
	کنترل ۲۱	مزانسیم ۲۱	/۹۰۸	۱۴/۳±۶,۳۵۰۲=کنترل ۲۱
		ال پی اس ۲۱	/۰۴۰	۷/۸±۴,۷۱۱۶=مزانسیم ۲۱
	مزانسیم ۲۱	ال پی اس ۲۱	/۹۹۹	۵/۲±۲,۱۶۷۹۵=ال پی اس ۲۱

* داده‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

سوخستگی یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در جوامع مختلف می‌باشد که می‌تواند آسیب‌های روحی و اجتماعی زیادی به دنبال داشته باشد (۴۸). لذا تحقیقات زیادی در رابطه با اثر عوامل مختلف در ترمیم این آسیب در مدل‌های حیوانی مناسب از جمله موش، خرگوش و ... صورت پذیرفته است. در این بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توانایی خود نوسازی و تمایز به انواع سلول‌های رده‌ی مزانشیمال و غیر مزانشیمال که در سال ۱۹۷۰ کشف شدند افق تازه‌ای در درمان انواع بیماری‌ها و به‌ویژه در برنامه‌های بازسازی بافتی گشودند (۴۹). ضمن آنکه توانایی این سلول‌ها در تمایز به سلول‌های مختلف و نیز قدرت این سلول‌ها در ترشح فاکتورهای رشد مختلف مشخص شده بود (۱۵-۲۵). در مطالعات متعدد اثر سلول‌های مزانشیمی در ترمیم آسیب‌های بافتی بررسی شده که نتایج مثبت و همسو از قابلیت درمانی این سلول‌ها به‌واسطه‌ی تمایز به سلول‌های مختلف و نیز ترشح پاراکراین فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های درگیر در ترمیم آسیب‌های بافتی گزارش شده است (۵۰-۵۵). باین‌وجود همچنان نیاز به تعداد زیاد سلول‌های بنیادی

مزانشیمی جهت بهبود آسیب‌های بافتی مختلف (با توجه به حساسیت بالای کشت این سلول‌ها) محدودیتی در استفاده از این سلول‌ها ایجاد کرده است. به همین دلیل استفاده هم‌زمان از سلول‌های مزانشیمی به همراه فاکتورهای نظیر فاکتور رشد هیپاتوسیتی، فاکتور رشد فیبروبلاستی و ... جهت افزایش قدرت ترمیم آسیب در برخی مطالعات استفاده شده است (۳۸). همچنین افزایش قابلیت‌های درمانی سلول‌های مزانشیمی در آسیب‌های بافتی به‌واسطه‌ی تحریک این سلول‌ها با آگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای سطحی آن‌ها یا TLR یا TLR4 مورد توجه محققان قرار گرفته است. تحریک گیرنده‌های TLR3 و TLR4 در سلول‌های مزانشیمال موشی و انسانی منجر به افزایش تولید و ترشح واسطه‌های پیش‌التهابی توسط این سلول‌ها شده است (۵۶ و ۵۷). طبق مطالعات واترمن و همکاران^۱ نیز مشخص شد لیپوپولی ساکارید به‌عنوان آگونیست اختصاصی TLR4 می‌تواند یک فنوتیپ پیش‌التهابی در سلول‌های مزانشیمی ایجاد کند که باعث تسریع روند بهبود آسیب‌های بافتی می‌شود (۴۲). فنوتیپ پیش‌التهابی در فاز اولیه‌ی ترمیم با ایجاد یک محیط جاذب برای نوتروفیل‌ها به

¹ Waterman et al

روند پاک‌سازی زخم از عفونت کمک می‌کند که موجبات تسریع روند بهبود زخم را فراهم می‌کند (۵۸). در این مطالعه سعی گردید از دیدگاه هیستوپاتولوژی، اثرات ترمیمی سلول‌های مزانشیمال تحریک شده با لیپوپلی ساکارید بر شکل‌گیری بافت جوانه‌ای، تعداد عروق تازه تشکیل شده، تعداد فیبروبلاست‌ها و میزان رسوب بافت کلاژن در نقطه‌ی آسیب مورد بررسی قرار گیرد و با اثرات درمانی سلول‌های مزانشیمی تحریک نشده مقایسه شود. از آنجایی که تشکیل بافت جوانه‌ای در روزهای نخست ترمیم یکی از فاکتورهای مهم در تسریع روند بهبود آسیب می‌باشد، مطالعات صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد یکی از عملکردهای ترمیمی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان القای تشکیل اولیه‌ی بافت جوانه‌ای در روزهای نخست ترمیم آسیب می‌باشد (۴۹). در مطالعه واترمن و همکاران، سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید با کسب یک فنوتیپ پیش التهابی، بیان بالاتری از فاکتور $TGF\beta^2$ را نشان دادند. این فاکتور در مهاجرت سلول‌ها، آنژیوژنیز و رسوب ماتریکس خارج سلولی نقش اساسی دارد که خود این عوامل دلیلی بر ایجاد بافت جوانه‌ای وسیع در نقطه‌ی آسیب می‌باشد. در این مطالعه نیز بیشترین ضخامت بافت جوانه‌ای در روز ۷ ابتدا در گروه آل پی اس و سپس در گروه مزانشیم مشاهده شد. این تفاوت در هر دو گروه مزانشیم و آل پی اس با گروه کنترل معنی‌دار بود. با وجود عدم اختلاف معنی‌دار بین دو گروه مزانشیم و آل پی اس، روند انقباض زخم در روز ۱۴ نسبت به روز ۷ و همچنین در روز ۲۱ نسبت به روز ۱۴ در گروه آل پی اس با شدت بیشتری نسبت به گروه مزانشیم و کنترل انجام شد. بنابراین، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در گروه مزانشیم، حضور سلول‌های مزانشیمی، با تحریک تولید بافت جوانه‌ای و تسریع روند بلوغ زخم، موجبات جمع شدگی و انقباض زخم در روزهای نخست ترمیم آسیب را فراهم آورده است و تحریک سلول‌های مزانشیمال با لیپوپلی ساکارید احتمالاً با فراهم آوردن شرایط بهتر به واسطه‌ی افزایش ترشح فاکتورهای پیش التهابی از جمله $TGF\beta$ روند بهبود را سرعت بخشیده است. واترمن و همکاران در مطالعه خود همچنین اثر سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید را بر روی ماتریکس خارج سلولی مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید اثر قابل‌ملاحظه‌ای در رسوب بافت کلاژن در ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر تفاوت آشکار میزان بافت کلاژن در گروه آل پی اس با دو گروه دیگر در رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم مؤید این حقیقت است که

لیپوپلی ساکارید باعث تحریک سلول‌های مزانشیمی شده و قابلیت این سلول‌ها را در تحریک هر چه بیشتر فیبروبلاست‌های موجود در نقطه آسیب جهت ترشح بافت کلاژن افزایش داده است. می‌توان احتمال داد افزایش ترشح فاکتور $TGF\beta$ عامل تحریک فیبروبلاست‌ها در ترشح بیشتر کلاژن بوده است. به‌طور کلی فرایند ترمیم زخم سوختگی شامل مجموعه‌ای از فرایندهای سلولی، مولکولی و بافتی می‌باشد که در این بین عروق‌زایی و تشکیل یک شبکه‌ی عروقی وسیع، نقش مهمی در گسترش یک محیط التهابی موضعی جهت پاک‌سازی این محیط از عوامل بیگانه و پاتوژن‌ها را دارا می‌باشد (۵۹ و ۶۰). با وجود اینکه نقش مثبت سلول‌های مزانشیمی در روند آنژیوژن مشخص شده بود طی مطالعه‌ای که کیسج و همکاران^۲ داشتند سلول‌های بنیادی مشتق از پوست را توسط لیپوپلی ساکارید تحریک نمودند و اثر این سلول‌ها را نسبت به تحریک روند آنژیوژن در اسکا فولدها بررسی نمودند (۴۴). نتایج حاصل از مطالعه این محققان تفاوت معنی‌داری از میزان عروق‌زایی بین دو گروه تحت درمان با سلول‌های تحریک شده با لیپوپلی ساکارید و گروه تحریک نشده نشان داد. در مطالعه حاضر حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید در گروه آل پی اس نسبت به گروه کنترل در تعداد عروق تازه تشکیل شده اختلاف معنی‌دار ایجاد نمود اما این تفاوت با گروه مزانشیم از نظر آماری معنی‌دار نبود. از آنجایی که غلظت لیپوپلی ساکارید بکار رفته و زمان انکوباسیون آگونیست مذکور می‌تواند در تحریک سلول‌ها به ترشح فاکتورهای پروآنژیوژنیک مؤثر باشد (۴۱ و ۴۴) و با توجه به عدم عروق‌زایی معنی‌دار در گروه آل پی اس نسبت به مزانشیم در مطالعه حاضر، می‌توان علت را در غلظت لیپوپلی ساکارید مورد استفاده در این مطالعه (10 ng/lit) برای تحریک سلول‌ها و یا زمان انکوباسیون (یک ساعت) سلول‌های مزانشیمی با لیپوپلی ساکارید جستجو کرد و احتمالاً بتوان با تغییر غلظت و یا تغییر مدت‌زمان انکوباسیون سلول‌های مزانشیمی و لیپوپلی ساکارید نتایج قابل‌قبول‌تری مشاهده نمود. شمارش فیبروبلاست‌ها از دیرباز به‌عنوان یک شاخص مهم در ارزیابی کیفیت ترمیم همبندی مورد استفاده قرار گرفته است. در سال ۲۰۰۴ تتامانتی و همکاران^۴ از شمارش فیبروبلاست‌ها در تعیین کیفیت ترمیم زخم و شکل‌گیری بافت همبند در ترمیم زخم ناشی از زانو استفاده نمودند (۶۱). همچنین ایارف و آمید^۵ در سال ۲۰۱۰، شمارش فیبروبلاست‌های را به‌عنوان شاخصی برای ترمیم زخم در محل بخیه‌ی جراحی معرفی کردند (۶۲). همگام با مطالعات فوق در مطالعه حاضر، از شمارش

4 Tettamanti et al

5 Eyarefe and Amid

2 Transforming growth factor beta

3 Kisch et al

معنی داری در روند آنژیوژنز مشاهده نگردید. بنابراین لازم است برای حصول بهترین شرایط جهت تحریک سلول‌های مزانشیمی، از جمله مناسب‌ترین غلظت لیپوپلی ساکارید و یا زمان انکوباسیون لیپوپلی ساکارید با سلول‌های مزانشیمی مطالعات بیشتری صورت پذیرد. لازم به ذکر است گفته شود هرچند پژوهش حاضر در همراهی با بسیاری از مطالعات تجربی مرتبط دیگر تأثیر مثبت سلول‌های مذکور بر روی بعضی از پارامترهای مرتبط با ترمیم زخم در حیوانات آزمایشگاهی را نشان می‌دهد با این حال امکان تعمیم این نتایج به مطالعات انسانی نیازمند مطالعات دقیق‌تر، کارآزمایی‌های بالینی بیشتر و مونیتورینگ‌های طولانی‌مدت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله کمال تشکر را از همکاران پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه اعلام می‌دارند.

References:

- Oshima H, Inoue H, Mastuzaki K, Tanabe M, Kumagia N. Permanent restoration of human skin treated with cultured epithelium grafting Wound healing by stem cell based tissue engineering. *Hum Cell* 2002; 15(3): 118-28.
- Chang FC, Herzog B. Burn morbidity: a followup study of physical and psychological disability. *Annals Surgery* 1976; 183(1): 34-7.
- Andreasen NJ, Norris AS. Long-term adjustment and adaptation mechanisms in severely burned adults. *J Nervous Mental Disease* 1972; 154(5): 352-62.
- Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *Burn Care Rehabil* 2005; 26(4): 306-19.
- Slavin J. The role of cytokines in wound healing. *J Pathol* 1996; 178(1): 5-10.
- Hansbrough JF. Current status of skin replacements for coverage of extensive burn wounds. *J Trauma* 1990;30(12 Suppl):S155-160.
- Robson MC, Phillips LG, Robson LE, Thomason A, Altrock BW, Pierce. Platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 1992; 339(8784): 23-5.
- Robson MC, Phillips TJ, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, Jensen JL, Steed DL. Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen* 2001; 9(5): 347-52.
- Oshima H, Inoue H, Mastuzaki K, Tanabe M, Kumagia N. Permanent restoration of human skin treated with cultured epithelium grafting Wound healing by stem cell based tissue engineering. *Hum Cell* 2002; 15(3): 118-28.
- Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjou Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93(2): 228-34.
- Natesan S, Zamora DO, Wrice NL, Baer DG, Christy RJ. Bilayer hydrogel with autologous stem cells derived from debrided human burn skin for improved skin regeneration. *J Burn Care Res* 2013; 34(1): 18-30.

12. Leonardi D, Oberdoerfer D, Fernandes MC, Meurer RT, Pereira-Filho GA, Cruz P, et al. Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds. *Burns* 2012; 38(8): 1143-50.
13. Phinney DG. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle* 2007; 6(23): 2884-9.
14. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod WJ., Banerjee D. Mesenchyme stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 2009; 69(4): 1255-8.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
16. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309): 71-74.
17. Piryaei A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. The role of ultraweb nano-fibrillar substrates in the differentiation of in vitro mouse bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Yakhteh Med J* 2010; 12(2): 275-86.
18. Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri S.H, Piryaei A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2008; 32(10): 1183-92.
19. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Eftekhari Yazdi P, Piryaei A. The structure of Human Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Cartilage in Micromass Culture System. *Yakhte Med J* 2006; 8(3): 162-71.
20. Saheli M, Hosseini A, Piryaei A, Fadaei Fathabadi F, Bandehpour M, Salehi M, Norouzi M. Evaluation of the differentiation process of human bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells: An in vitro study. *J Iran Anat Sci* 2011; 9(36): 179-90.
21. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1(2): 92-100.
22. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk L, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(18): 10344-9.
23. Horowitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5(3): 309-13.
24. Macfarin K, Gao X, Liu LB, Deborah S, Dulchavsky PA, Kwon D, Arbab AS, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rats. *Wound Repair Regen* 2006; 14(4): 471-8.
25. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai j, Duan H, Chu W et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e88348.
26. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Herodin F, Meinneke V, et al. "Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol* 2010; 38(10): 945-56.
27. Rasulov MF, Vasilenko VT, Zaidenov VA, Onishchenko NA., "Cell transplantation inhibits inflammatory reaction and stimulates repair

- processes in burn wound. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142(1): 112–5.
28. Vassilia-ismini A, Desponia S, Marianna P, Olga R, Maria V, Ourania C et al. Adipose tissue-derived mesenchymal cells support skin re epithelialization through secretion of KGF-1 and PDGF-BB: comparison with dermal fibroblasts. *Cell Transplantation* 2012; 21(11): 2441–54.
 29. Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Kerashenniko VI, Gorshenin TL, Pidstan RE et al. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139(1): 141–4.
 30. Rasulov MF, Vasilenko VT, Zaidenov VA, Onishchenko NA. Cell transplantation inhibits inflammatory reaction and stimulates repair processes in burn wound. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142(1): 112–5.
 31. Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lie W et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artificial Organs* 2008; 32(12): 925–31.
 32. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carcin H, Huet C, Clairand I et al. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med* 2007; 2(5): 785–94.
 33. Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F et al. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen* 2010; 18(1): 50–58.
 34. Hao L, Wang J, Zou Z, Yan G, Dong S, Deng j et al. Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. *Gene Therapy* 2009; 16(1): 34–42.
 35. Ha XQ, Lu TD, Hui L, Fang. D. “Effects of mesenchymal stem cells transfected with human hepatocyte growth factor gene on healing of burn wounds. *Chinese J Traumatol* 2010; 13(6): 349–55.
 36. Xue L, Xu Y.B, Xie JL, Tang JM, Shu B, Chen L, et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(7): 1327–36.
 37. Mansilla E, Spretz R, Larsen G, Nunez L, Drago H, Sturla F et al. Outstanding survival and regeneration process by the use of intelligent acellular dermal matrices and mesenchymal stem cells in a burn pig model. *Transplant Proc* 2010; 42(10): 4275–8.
 38. Kinoshita N, Tsuda M, Hamuy R, Nakashima M, Nakamura-Kurashge T, Mstuu-Mastuyama M et al. The usefulness of basic fibroblast growth factor for radiation-exposed tissue. *Wound Repair Regen* 2012; 20(1): 91–102.
 39. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concept on the Immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Therapy* 2010; 1(34): 24-27.
 40. Miggin SM, Oneill, LAJ. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2006; 80(2): 220-6.
 41. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult bone Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 2003; 17(6): 900-8.
 42. Waterman RS, Tomchuk SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell paradigm Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *Plos one* (2010); 5(4), e10088.

43. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human pro inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated co stimulation. *J Leukoc Biol* 2006; 79(2): 285–93.
44. Kisch T, Weber C, Rapoport DH, Kruse C, Svhumann S, Stang FH, et al. LPS-Stimulated Human Skin-Derived Stem cells Enhance Neo-Vascularization during Dermal Regeneration. *PLoS ONE* 2015; 10(11) e0142907.
45. Mohammadi R, Azizi S, Amini K. Effects of undifferentiated cultured omental adipose-derived stem cells on peripheral nerve regeneration. *J Surg Res* 2013;180(2):e91-97.
46. Bruen KJ, Campbell CA, Schooler WG, Deserres S, Cairns BA, Hultman CS, et al. Real-time monitoring of keratin 5 expression during burn re-epithelialization. *J Surg Res* 2004; 120(1): 12–20.
47. Fioretti F, Lebreton-DeCoster C, Gueniche F, Yousfi M, Humbert P, Godeau G, et al. Human bone marrow-derived cells: an attractive source to populate dermal substitutes. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 87-94.
48. Mohammadi-Barzelighi H, Alaghebandan R, Motevallian A, Alinejad F, Soleimanzadeh-Moghadam S, Sattari M, et al. Epidemiology of severe burn injuries in a Tertiary Burn Centre in Tehran, Iran. *Annal Burn Fire Disaster* 2011; 24(2): 59.
49. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2(2): 83-92.
50. Shumakov VI, Onishchenko NA, Rasulov MF, Krashennnikov ME, Zaidenov VA. Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells More Effectively Stimulate Regeneration of Deep Burn Wounds than Embryonic Fibroblasts. *Bull Exp Biol Med* 2003; 136(8): 220-223.
51. Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol*, 2007; 25(1): 73-78.
52. Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu Wet al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif. Organs* 2008; 32(12): 925–31.
53. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008; 3(4): e1886.
54. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987; 165(1): 251-6.
55. Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT. Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006; 126(9): 2096-105.
56. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Mazzinghi B, Maggi L, Parronchi P, Krampera M, & Annuziato F. Toll-Like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T cell modulatory activity by Impairing Notch signaling. *Stem cell* (2008); 26(1): 279-289.
57. wang Y, Abarbanell AM, Herrmann JL, Weil BR, Manukian MC, Poynter JA, Meldrum DR. TLR4 inhibits Mesenchymal stem cell STAT3 activation Thereby exerts deleterious effect on MSC mediated Cardioprotection. *Plos One* (2010); 5 (12): e 14206.

58. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH (2006). Phenotypic and functional profiling of human pro inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 79(2): 285-93.
59. Zhou FY, Bosch-Marche M, Okuyama H, Krishnamachary B, Kimura H, Zhang L et al. Spontaneous Transformation of Cultured Mouse Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *Cancer Res* 2006; 66(22): 10849-54.
60. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(1): 1-11.
61. Tettamanti G, Grimaldi A, Rinaldi L, Arnaboldi F, Congiu T, Valvassori R, et al. The multifunctional role of fibroblasts during wound healing in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea). *Biology of the Cell* 2004; 96(6): 443-55.
62. Eyarefe OD, Amid SA. Small Bowel Wall Respons to Enterotomy Closure with Polypropylen and Polyglactin 910 Using Simple Interrupted Suture Pattern Rats. *Int J Anim Vet Adv* 2010; 2(3): 72-5.

COMPARISON EFFECT OF BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND STIMULATED BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS WITH LIPOPLYSACCHARIDE (LPS) ON HEALING OF INDUCED THIRD-DEGREE SKIN BURN IN MOUSE

Leyla Soleimani^{1*}, Samad Zare², Rahim Hobbenaghi³, Nowruz Delirezah⁴, Kiavash Hushmandi⁵

Received: 11 Oct, 2016; Accepted: 10 Dec, 2016

Abstract

Background & Aims: Burning provides irreparable effects on the affected patient. Several studies show that these cells may contribute to tissue regeneration whether through producing a variety of bioactive growth factors and/or by differentiation into mesoderm lineage. Several studies demonstrate that stimulated mesenchymal stem cells have more therapeutic potential than unstimulated cell in accelerate tissue wound healing. The aim of the present study was to investigate the effect of subcutaneous administration of stimulated bone marrow-derived mesenchymal stem cells with lipopolysaccharide in repairing or regeneration of skin wounds induced by third-degree burn and to compare it with unstimulated Mesenchymal stem cell in mouse model.

Materials & Methods: The third-degree skin burn was induced on male mice (N=27). After 1 hour, based on the equal physical condition mice were randomly divided into three separate groups which included control, mesenchyme and LPS groups and then respectively subcutaneously administered with phosphate buffered saline (PBS; 400 µl), mesenchymal stem cells and stimulated mesenchymal stem cells with LPS (106 cell in 400µl PBS) at the burn site. In order to check the speed of the process of 21-days wound repair, tissue section at days 7, 14, and 21 after induction of burn were prepared and stained with hematoxylin/eosin and Masson's trichrome.

Results: Considering investigated parameters including formation of granulation tissue, angiogenesis, fibroblast proliferation, collagen deposition and the rate and quality of healing of third-degree thermal burns were significantly accelerated in mesenchyme and LPS groups when compared to the control group (P<0.05). As well as LPS group in comparison to mesenchymal group was superior in collagen deposition and rate of wound healing.

Conclusion: The results demonstrate that stimulate cells whit LPS improve BMSc's therapeutic effect in some factors of burn wound healing.

Keywords: Burn, Healing, Stimulated mesenchymal stem cell, Lipopolysaccharide

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Tel: +893833361046

Email: lsoleimany@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2017; 27(11): 1024 ISSN: 1027-3727

¹ Master in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

³ Associate Professor of Pathology, Department of Pathobiology, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ Associate Professor of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁵ Student of Doctorate Veterinary Medicine, Department of Veterinary Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran