DOI: 10.48305/jims.v40.i698.1008

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۹۸/هفته‌ی دوم بهمن ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۱ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۵ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۱/۱۴

اثرات محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با کورکومین بر روی فیبروز قلبی ناشی از انفارکتوس میوکارد

ندا عابدپور[۱]، اصغر هاشمی محمود آباد[۲]، معصومه زیرک جوانمرد[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف کلی از مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی آثار حمایتی ترشحات سلول‌های بنیادی بافت مزانشیمال مغز استخوان تیمار شده با کورکومین بر روی فیبروز قلبی در موش صحرایی بود.

روش‌ها: تعداد ۱۸ سر موش صحرایی نر بالغ به صورت اتفاقی به سه گروه ۶تایی؛ گروه شاهد سالم (نرمال‌سالین)، گروه شاهد بیمار (ایزوپروترنول)، گروه درمان (ایزوپروترنول + محیط رویی سلول‌های بنیادی تیمار شده با کورکومین) تقسیم شدند. پس از خون‌گیری، استخوان‌های ران و درشت نی جدا شده و برای کشت سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفتند. ترشحات سلولی استخراج شده از سلول‌های مغز استخوان از طریق ورید دمی تزریق شد. همچنین نمونه‌های قلب به دست آمده، وارد فرمالین ۱۰ درصد شد و از نظر بافت‌شناسی ارزیابی گردید. سطوح سرم لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase) LDH و کراتین فسفوکیناز (Creatine phosphokinase) CPK اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تزریق زیرجلدی ایزوپروترونول منجر به القای سکته‌ی قلبی همراه با افزایش CPK و LDH سرم خون در مقایسه با گروه شاهد طبیعی شد. در مقابل تزریق داخل وریدی محیط رویی سلول‌های بنیادی در کاهش معنی‌دار سطوح CPK و LDH در مقایسه با گروه شاهد بیمار نتیجه داد. همچنین میزان فیبروز در گروه محیط رویی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیمار داشت. اما میزان التهاب و ادم قلب در هر دو گروه، دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد بود.

نتیجه‌گیری: تزریق تک دوز محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با کورکومین می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای آثار مضر ایزوپروترونول را تضعیف کرده و فیبروز قلبی را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: ایزوپروترونول؛ موش صحرایی؛ ایسکمی میوکارد؛ محیط رویی؛ کورکومین

ارجاع: عابدپور ندا، هاشمی محمود آباد اصغر، زیرک جوانمرد معصومه. **اثرات محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با کورکومین بر روی فیبروز قلبی ناشی از انفارکتوس میوکارد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۹۸): ۱۰۱۵-۱۰۰۸

مقدمه

نارسایی قلبی، یک سندرم بالینی پیچیده است که در آن، ساختار یا عملکرد غیرطبیعی باعث ناتوانی قلب می‌شود (۱). امروزه پزشکی نوین نتوانسته در بهبود و درمان قطعی MI موفق باشد و محققان، اصلاح سبک زندگی، طب سنتی، استفاده از سلول‌های بنیادی و داروهای طبیعی را به عنوان راه‌حل‌های نوین ارائه داده‌اند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells) MSCS، به عنوان یک منبع ایده‌آل برای سلول‌درمانی، ژن‌درمانی و به عنوان ابزاری برای درمان بیماری های مادرزادی محسوب می‌گردند. مغز استخوان که حاوی دو نوع سلول بنیادی (۱- سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic stem cells) HSCs و ۲- سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone marrow mesenchymal stem cells) BMSCs می‌باشد، به عنوان منبع اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطرح می‌شود (۲). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های سلول‌های مزانشیمی، جایگزین شدن در مناطق آسیب دیده است که در حالات پاتولوژیک سرعت مهاجرت آن‌ها افزایش یافته و سریع‌تر به منطقه‌ی

۱- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۲- کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: معصومه زیرک جوانمرد: دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

Email: zirak.m@umsu.ac.ir

مورد نیاز مهاجرت می‌کنند (۳). بر اساس تحقیقات in vivo و in vitro انجام شده در زمینه‌ی تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت، روشن شده که بعد از تزریق وریدی این سلول ها، درصد بالایی از آن‌ها در ریه به تله می‌افتند (٤) و بعد از دو هفته در قلب جایگزین می‌شوند (۵). بنابراین به نظر می‌رسد که تأثیر درمانی MSCs در آسیب‌های قلبی احتمالاً مربوط به توانایی تبدیل به کاردیومیوسیت نیست و در عوض آزاد شدن فاکتورهای تروفیک و سرکوب عوامل التهابی می‌تواند دلیل بهبودی باشد (٦). لذا جدیدترین نظریه در این زمینه نشان می‌دهد که تأثیر سودمند این سلول‌ها و قدرت ترمیمی آن‌ها، مربوط به فعالیت‌های ترشحی و پاراکراینی آن‌هاست نه تبدیل شدن به سلول مورد نظر. استراتژی بدون سلول (cell-free) یعنی بکار بردن ترشحات سلول‌های بنیادی که شامل سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد است که به تنهایی توانایی درمان دارند (۷).

علاوه بر این یکی دیگر از راه‌حل‌های نوین ارائه شده، بهره‌گیری از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است که می‌تواند در بهبود و پیشگیری از MI مفید باشد. زردچوبه یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین ادویه‌جات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که به ماده‌ی مؤثر آن کورکومین (Curcumin) می‌گویند (۸). مطالعات انجام شده، بیانگر توان درمانی این مولکول در گستره‌ی وسیعی از بیماری‌ها می‌باشد. علاوه بر این، مطالعات زیادی خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضدالتهابی، ضدسرطان، ضدفشارخون و ضد آرترواسکلروز آن را نشان دادند (۱۱-۹). این ماده با مهار فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن و با مکانیسم‌های پیچیده‌ی بیوشیمیایی و با تغییر شاخص‌های دینامیکی باعث بهبود عملکرد قلب نکروتیک می‌شود (۱۲).

در مطالعه‌ی قبلی انجام شده، نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مستخرج از مغز استخوان پس از مجاورت با کورکومین در قلب ایسکمیک باعث کاهش سایز ایسکمیک، تعداد سلول های آپوپتوتیک، فاکتورهای سرمی، آسیب قلبی و فیبروز می‌شود (۱۳). هنوز هم مطالعات بالینی فراوانی با استفاده از کورکومین به عنوان عامل درمانی تحت بررسی است.

با توجه به اینکه طی دهه‌ی اخیر محققین در مورد استفاده‌ی درمانی از محیط رویی سلول‌های بنیادی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی متمرکز شده‌اند و با توجه به نبود گزارشی در جستجوهای انجام شده، مطالعه‌ی پیش‌رو در صدد است تا با استفاده از ایزوپروترنول ایسکمی قلبی ایجاد کرده و محیط رویی مستخرج از سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با کورکومین را از طریق وریدی به موش‌ها تزریق نموده و اثر آن را از بعد بافت‌شناسی و بیوشیمیایی بر فیبروز قلبی (که متعاقب ایسمکی ایجاد می‌شود) بررسی کند تا بینش جدیدی را در مورد عملکرد محیط رویی مستخرج از سلول های بنیادی مزانشیمی و کورکومین برای بیماران ارائه دهد.

روش‌ها

در این مطالعه، ۱۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد albino با محدوده‌ی وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. آب و غذا به اندازه‌ی کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت و در یک شرایط حرارتی ۲۰ تا ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبتی ۵۰-٤۰ درصد نگهداری شدند.

گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: ۱- گروه شاهد سالم: نرمال‌سالین، ۲- گروه شاهد بیمار: ایزوپروترنول، ۳- گروه درمان: ایزوپروترنول + محیط رویی سلول‌های بنیادی.

ایجاد قلب ایسکمیک: جهت ایجاد انفارکتوس میوکارد از داروی ایزوپروترنول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت زیرجلدی روزانه یکبار به مدت دو روز با فاصله‌ی ٢٤ ساعت (٤٨ ساعت پس از اولین تزریق) استفاده شد (۷).

آماده‌سازی کورکومین: در گروه تحت درمان، کورکومین (Sigma, USA) پس از حل شدن در DMSO (Sigma, USA) به میزان ۱۰ M/Lμ (میزان دوز بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد) به محیط کشت اضافه شد (۱۳).

جمع‌آوری نمونه‌ها: برای انجام آزمایشات موش‌های مذکور با کتامین ۱۰ درصد (با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند (با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی). سپس قفسه‌ی سینه‌شان باز شد و بعد از خون‌گیری از طریق سوراخ کردن قلب، قلب خارج گردید و سریعاً با نرمال‌سالین شستشو داده و بعد از مشاهده‌ی ماکروسکوپی و ثبت وزن، راس قلب‌ها جهت تهیه‌ی برش‌های بافتی وارد فرمالین ۱۰ درصد شد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی: برای تهیه‌ی سلول‌های بنیادی استخوان‌های ران و درشت نی جدا شده و در داخل پتری دیش محتوای محیط کشت DMEM (Dulecco modified Eagle medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS (Fetal serum bovin، ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین قرار داده شدند. سلول‌های به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند، پس از آن محیط رویی تخلیه شده و پلاک سلولی تشکیل شده، در ۱ میلی‌لیتر محیط (DMEM) تازه معلق گردید و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از سلول، به هر فلاسک استریل کشت سلول که حاوی ٦ سی‌سی محیط کشت است اضافه شد، سپس فلاسک حاوی سلول به انکوباتور با دمای

۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 منتقل گردید و بعد از ۳ روز، محیط رویی تعویض و سلول‌های غیر چسبنده، خارج گردیده و محیط تازه به فلاسک، اضافه گشت. محیط سلول‌ها هر ۳- ٤ روز یکبار تعویض شد تا به سطح تراکم ۸۰ درصد برسند. در این مطالعه سلول‌های پاساژ سوم مورد استفاده قرار گرفت (۷).

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی: بعد از اتمام خون‌گیری، سرم به وسیله‌ی سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه جداسازی شده و فاکتورهای بیوشیمیایی لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase) LDH و فسفوکراتین کیناز (Creatine phosphokinase) CKP مطابق دستور کیت پارس آزما به روش الایزا اندازه‌گیری شد.

مطالعات هیستولوژیک

۱- رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (hematoxylin and eosin) H&E جهت بررسی‌های بافت‌شناسی، انفیلتراسیون سلولی و ادم پس از طی مراحل فیکساسیون، آبگیری، شفاف‌سازی، قالب‌گیری و برش زنی (با ضخامت ۵ میکرومتر)، برش‌های عرضی تهیه شده به روش هماتوکسیلین- ائوزین، رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد.

۲- رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون: برای تعیین درجه‌ی منطقه‌ی فیبروز از رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون استفاده شد. برای تعیین شدت منطقه‌ی فیبروز، از رنگ‌آمیزی کلاژن استفاده شد. مناطق فیبروتیک به رنگ آبی ظاهر گردید و با درجه‌بندی چشمی وسعت مناطق آبی در رتبه‌های ۳-۰ درجه‌بندی شد (۲۳): ۰ = بدون فیبروز، ۱ = فیبروز متوسط، ۲ = فیبروز شدید و ۳ = فیبروز بسیار شدید.

روش تحلیل داده‌ها: برای مقایسه‌ی بین گروه‌های مختلف از آنالیز One-Way ANOVA استفاده گردید. همه‌ی داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار و $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نتایج بر اساس میانگین ± خطای معیار گزارش گردید. داده‌های کمی در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱٦ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شدند.

تمام مراحل کار با حیوانات، مطابق دستورالعمل هلسینکی انجام گرفت. در ضمن تمام پیشنهادات و دستورات کمیته‌ی محترم اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه لحاظ شد (کد اخلاق: IR.UMSU.REC.1398.500).

یافته‌ها

تأثیر تزریق محیط رویی بر وزن بدن: ایسکمی ناشی از ایزوپروترونول در حیوانات آزمایشگاهی می تواند به اختلالات متابولیکی منجر شود. تزریق ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ایزوپروترونول باعث کاهش معنی‌دار وزن بدن در گروه MI نسبت به گروه شاهد نرمال شد. میانگین وزن بدن گروه درمانی CM نسبت به شاهد، کمتر و نسبت به گروه MI بیشتر بود که هیچ‌کدام از این اختلالات معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱. تأثیر محیط رویی سلول‌های مزانشیمی بر وزن قلب موش‌های صحرایی

گروه	وزن بدن (گرم)	وزن قلب (گرم)
شاهد	۲۵۳/۵ ± ۱۰/۲۱	۱/۲۳ ± ۰/۱۵
MI	۲۳۵/۱ ± ۷۹۸*	۱/۱۴ ± ۰/۱۳
CM	۲۴۳/۶ ± ۵/۵	۱/۱۷ ± ۰/۱۴

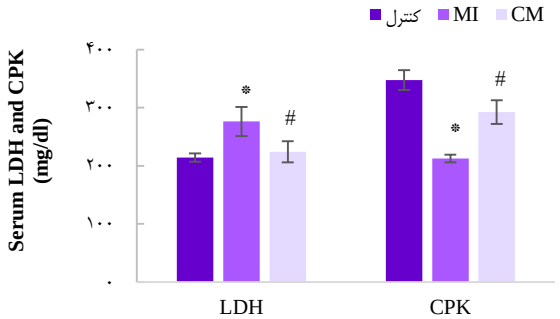
*: نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد است.

کاهش وزن بدن گروه MI نسبت به گروه شاهد معنی‌دار، اما گروه درمان CM با وجود افزایش وزن، ارتباط معنی‌دار با گروه MI نداشت.

اختلاف وزن قلب در گروه‌ها معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

تأثیر محیط رویی سلول‌های مزانشیمی بر وزن قلب موش‌های صحرایی: در این قسمت از مطالعه، وزن قلب هر سه گروه با یکدیگر مقایسه شدند. از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین سه گروه شاهد، MI و درمان وجود نداشت (جدول ۱).

تأثیر تزریق محیط رویی بر مقادیر لاکتات دهیدروژناز: بر اساس نتایج به دست آمده تزریق ایزوپروترنول منجر به افزایش معنی‌دار مقادیر LDH سرم گروه MI در مقایسه با گروه شاهد سالم شده است ($P < ۰/۰۵$). به دنبال تزریق تک دوز محیط رویی سلول‌های بنیادی مقادیر LDH کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$). بدین ترتیب نتایج این بخش از مطالعه نشان می‌دهد که تزریق وریدی محیط رویی سلول‌های بنیادی منجر به بهبودی ایسکمی قلب شده و از میزان بروز اختلال قلبی کاسته است (شکل ۱).



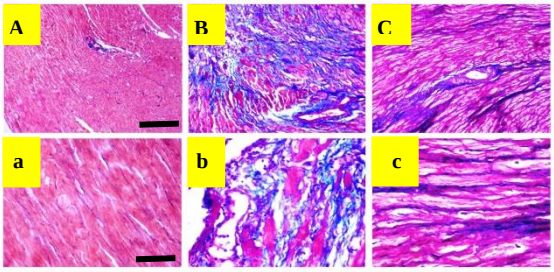
شکل ۱. مقادیر LDH و CPK سرم در گروه‌های مورد مطالعه

*: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد سالم (MI $P < ۰/۰۰۱$) و CM ($P = ۰/۰۳۳$)

#: نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه MI (شاهد سالم $P < ۰/۰۰۱$ و محیط رویی ($P = ۰/۰۲۳$)

تأثیر تزریق محیط رویی بر مقادیر فسفوکراتین کیناز: بر اساس نتایج به دست آمده، تزریق ایزوپروترنول منجر به افزایش معنی‌دار در مقادیر CPK سرم گروه MI در مقایسه با گروه شاهد سالم شده است (P < ۰/۰۵). به دنبال تزریق محیط رویی سلول‌های بنیادی کاهش معنی‌داری در گروه محیط رویی مشاهده شد (۲۰/۳۸ ± ۲۹۲/۵، P < ۰/۰۵) (شکل ۱).

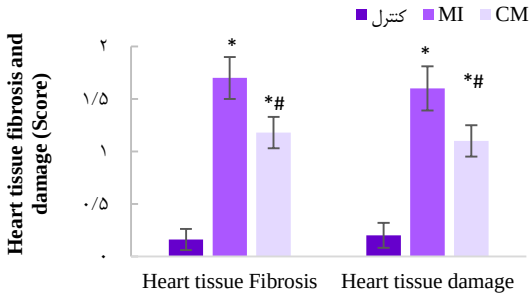
بررسی کیفی فیبروز قلبی: بررسی لام‌های رنگ‌آمیزی شده با تری‌کروم ماسون در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که در گروه MI نواحی فیبروز وسیعی به صورت رنگ آبی در بافت قلب دیده می‌شود. تعداد پنج لام از هر گروه بررسی شد و در هر لام ۱۰ فیلد با بزرگ‌نمایی ٤٠ از نظر فیبروز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲. فتومیکروگراف از قلب موش صحرایی جهت بررسی فیبروز

(A,a) گروه شاهد، (B,b) فیبروز بافت قلب به صورت رنگ آبی ظاهر شده است، (C,c) گروه محیط رویی کاهش فیبروزبافتی است، رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون با بزرگ‌نمایی ۱۰X (A, B, C) و 40X (a, b, c)

بررسی کمی فیبروز قلبی: میانگین درجات آسیب فیبروتیک در هر گروه محاسبه شد. میانگین گروه شاهد برابر با ۰/۱۰ ± ۰/۱٦ بود که در گروه MI این میزان به ۰/۳۸ ± ۱/۷ افزایش یافت. در گروه درمانی با محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی میانگین به ۰/۷۰ ± ۱/۱۸ (P = ۰/۰۰۲) رسید که اختلاف معنی‌داری با گروه MI داشت (شکل ۳).

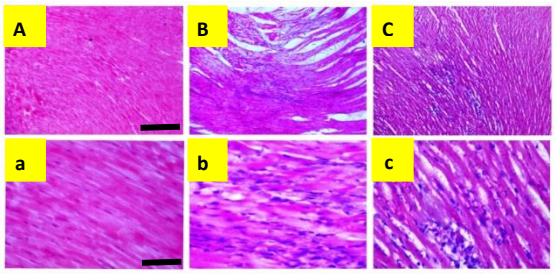


شکل ۳. **درجه‌بندی فیبروز و تغییرات هیستو پاتولوژیک بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه**

*: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد سالم (MI (P < ۰/۰۰۱ و C

#: نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه MI (شاهد سالم P < ۰/۰۰۱ و محیط رویی (P = ۰/۰۰۲؛ M (P < ۰/۰۰۱)

نتایج بافت‌شناسی: بررسی‌های میکروسکوپیک با رنگ‌آمیزی H&E در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد، در گروه MI نوارهای عضلانی قلب از هم فاصله گرفته و فضاهای خالی وسیعی که حاکی از ادم بافتی است مشاهده شد (شکل ۳). التهاب بافتی به صورت تهاجم سلول‌های التهابی Infiltration در بافت قلب به خوبی مشخص بود که با تزریق وریدی محیط رویی به شدت کاهش یافت (شکل ٤).



شکل ٤. فتومیکروگراف از قلب موش صحرایی جهت بررسی تجمع سلول‌های التهابی

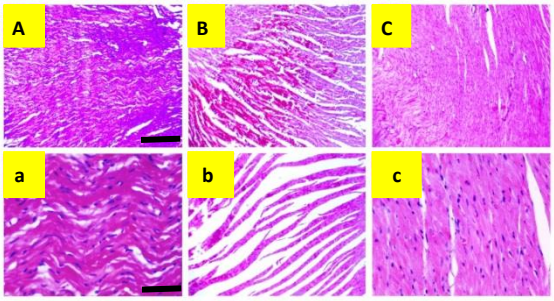
(A,a) گروه شاهد، (B,b) تجمع سلول‌های التهابی در بافت قلب به صورت گسترده مشاهده می‌شود، (C,c) گروه محیط رویی که با کاهش سلول‌های التهابی همراه است، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگ‌نمایی بزرگ‌نمایی ۱۰X (A, B, C) و (a, b, c) 40X

میانگین درجات آسیب بافتی در هر گروه محاسبه شد. میانگین گروه شاهد برابر با ۰/۳۹٤ ± ۰/۲ بود که در گروه MI این میزان به ۰/٤۸۹ ± ۱/٦ افزایش یافت. در گروه درمانی با محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی میانگین به ۰/۲ ± ۱/۱ رسید که با (P = ۰/۰۹۲) اختلاف معنی‌دار با گروه MI داشتند. در کاهش ادم بافتی و کاهش چشمگیر سلول های التهابی به دنبال تزریق محیط رویی سلول‌های بنیادی، اختلاف معنی‌داری بین گروه درمانی CM و گروه شاهد بیمار (MI) وجود داشت (P = ۰/۱۷) (شکل ۵).

بحث

در نتایج مطالعه‌ی حاضر، افزایش سلول های التهابی، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، به دنبال تزریق ایزوپروترونول ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد که حضور این سلول های التهابی باعث ادم، هیپرتروفی و از هم باز شدن میوفیبریل‌ها می‌شود. Myofibroblasts (میوفیبروبلاست‌ها) یک رویداد کلیدی در شروع فیبروز قلب دارند و با بیان α- SMA (Smooth muscle actin) و رسوب اجزاء سازنده ECM (Extra cellular matrix) مانند کلاژن نوع I و III نقش مهمی در روند فیبروژنزیس دارند (١٤). تجمع کلاژن در بافت بینابینی قلب مارکر اصلی فیبروز قلبی است. ۸۵ درصد آن از نوع I و

۱۱ درصد، نوع III بوده که توسط فیبروبلاست‌های قلبی تولید می شوند (۱۵). مطالعات قبلی نشان داده که کورکومین در مهار فیبروز در آئورت و شریان‌های کلیوی مؤثر بوده و باعث حفظ انعطاف‌پذیری دیواره‌ی رگ‌ها شده است (۱۶).



شکل ۵. فتومیکروگراف از قلب موش صحرایی جهت بررسی ادم بافتی

(A,a) گروه شاهد، (B,b) جدا شدن فیبرهای عضلانی و مشاهده‌ی فضای نسبتاً وسیع مابین رشته‌های عضلانی که حاکی از ادم بافتی است، (C,c) گروه محیط رویی که با کاهش ادم همراه است، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگ‌نمایی ۱۰X (A, B, C) و 40X (a, b, c).

همچنین در تحقیقات قبلی نشان داده شد که تزریق CM میزان این دو کلاژن I و III را کاهش می‌دهد و به نظر می‌رسد ترشحات سلول های بنیادی محتوی فاکتورهایی است که در غیر فعال کردن ژن‌های درگیر در ساخت کلاژن مؤثرند (۱۷). TGF-β1 فاکتور پرو فیبروتیک است که تکثیر فیبرو بلاست‌ها را تحریک کرده و باعث تولید ماتریکس خارج سلولی می‌شود. این فاکتور رشدی باعث فعال شدن سایت‌هایی از ژن کلاژن می‌شود و متعاقباً افزایش سنتز کلاژن را به دنبال دارد (۱۸). گزارش شده که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیر فیبرو بلاست‌ها را از طریق ویژگی «آنتی فیبروتیک» و مهار TGF-β انجام می‌دهند (۱۹).

تأثیر محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر فیبروز بافت قلبی: در مطالعه‌ی حاضر، تزریق تک دوز محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با کورکومین به طور قابل ملاحظه‌ای از فیبروز قلبی ایجاد شده در مدل حیوانی MI کاسته است. Toma و همکاران نشان دادند که کورکومین با کاهش فاکتور رشد فیبروبلاست، مهار تمایز مایوفیبروبلاست، کاهش سنتز کلاژن و تسریع تخریب کلاژن می‌تواند باعث کاهش فیبروز قلبی ناشی از ایزو شود. BMSCsها هم با داشتن توانایی تمایز به سلول‌های قلب (میوسیت)، می‌توانند عملکرد قلب را افزایش داده و به طور قابل توجهی بافت فیبروز را کاهش دهد. گزارش شده است که عواملی مانند Ho_1 و ویتامین B12 در تمایز BMSCs به کاردیو میوسیت ها دخیل هستند (۲۰).

Cargnoni و همکاران در مطالعه‌ی خود نشان دادند محیط رویی سلول های بنیادی مستخرج از جفت باعث کاهش فیبروز در بافت ریه و کاهش رسوب کلاژن شده است (۲۱).

Liu و همکاران نیز گزارش کردند که محیط رویی حاصل از سلول های مزانشیمی مشتق از طناب نافی، باعث کاهش فیبروز حالب از طریق کاهش کلاژن I و کاهش MDA و ROS و مهار اپوپتوز شده است (۲۲). در مطالعه‌ی حاضر نیز با تزریق وریدی CM میزان فیبروز قلبی به طور معنی‌داری کاهش یافت که می‌تواند به دلیل وجود فاکتورهای ترمیمی و ترشحات پاراکرین این سلول ها باشد. CM از طریق افزایش آنژیوژنز، عملکرد قلب را ارتقاء داده و آسیب بافتی را کاهش می دهد. تکثیر فیبروبلاست های قلبی در CM سلول های بنیادی مزانشیمی بسیار کاهش یافته و آنالیز CM نشان داده که میزان بیان تعداد ژن هایی که در روند تکثیر سلولی مشارکت می‌کنند کاهش یافته و مهار کننده‌های تکثیر سلولی در CM افزایش یافته است (۲۳). علاوه بر این، محیط رویی سلول‌های بنیادی چسبندگی سلول‌های التهابی را کاهش داده و از این طریق التهاب را کنترل می‌کنند. مارکرهای فیبروبلاستی که در حالت نرمال در فیبروبلاست بیان نمی‌شود، در صورت وجود فشار مکانیکی یا آسیب، فعال می‌شود و نشان داده شد که استفاده از CM، کاهش معنی‌دار در توانایی انقباضی فیبرو بلاست های فعال شده ایجاد می کند و مانع بروز فیبروز التهابی می‌شود (۲۴).

تأثیر محیط رویی سلول های بنیادی مزانشیمی بر CPK و LDH در سرم موش‌های صحرایی: تارهای عضلانی قلب محتوی آنزیم LDH است و متعاقب القاء انفارکتوس حاد از عضلات به خون آزاد می‌شود. افزایش این آنزیم ابزار تشخیص غیر اختصاصی برای انفارکتوس میو کارد است و معمولاً طی ۱۲-۶ ساعت پس از MI افزایش می یابد و سطح آن در ۴۸ ساعت اول به اوج خود رسیده و می‌تواند ۱۴-۱۲ روز در سرم خون باقی بماند. CPK در بافت‌های قلب، روده کوچک، دیافراگم و پروستات وجود دارد و در ایسکمی حاد قلبی به دنبال آسیب میوکاردیوم در جریان خون آزاد می‌شود. میزان آن در ۹-۴ ساعت بعد از MI افزایش می‌یابد و در مدت ۲۴ ساعت به اوج خود می‌رسد و تا یکماه به میزان عادی برنمی‌گردد (۲۵). تجویز ایزوپروترونول منجر به القا ایسکمی حاد قلبی شده و افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم LDH و CPK ایجاد می‌کند. یافته‌های قبلی نشان داده که نانو ذره‌ی کورکومین، میزان این دو آنزیم را در موش‌های صحرایی با ایسکمی قلبی به طور معنی‌داری کاهش داده که ناشی از ویژگی ضدالتهابی آن است (۲۶) همچنین تزریق چهار میلیون سلول بنیادی مزانشیمی مستخرج از مغز استخوان باعث کاهش این دو آنزیم در مدل حیوانی MI شده است (۱۳).

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر، تزریق تک دوز محیط رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با کورکومین به طور قابل ملاحظه‌ای فیبروز قلبی ایجاد شده در مدل حیوانی MI را کاهش داد که می‌تواند به دلیل وجود فاکتورهای ترمیمی و ترشحات پاراکرین این سلول‌ها باشد. نتایج به دست آمده نشان داد، استفاده از محیط رویی می‌تواند آثار مضر ایزوپروترونول را بعد از ٤ هفته تضعیف کند و به شکل معنی‌داری روند ادم و التهاب قلبی را متعاقب فیبروز میوکارد مهار نماید.

برای تأثیر محیط رویی بر روند ادم و التهاب قلبی متعاقب فیبروز میوکار نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد که توصیه می‌شود توسط همکاران محترم بررسی‌های آتی در این زمینه انجام گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با شماره پایان‌نامه‌ی ۱۰۰۷٤ توسط دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تصویب و حمایت شده است.

References

1. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. Lancet 2015; 385(9970): 812-24.
2. Cable J, Fuchs E, Weissman I, Jasper H, Glass D, Rando TA, et al. Adult stem cells and regenerative medicine-a symposium report. Ann N Y Acad Sci 2020; 1462(1): 27-36.
3. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. Biotechnol Adv 2018; 36(4): 1111-26.
4. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. J Tissue Eng Regen Med 2019; 13(9): 1738-55.
5. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. Stem Cells Dev 2009; 18(5): 683-92.
6. Taghdiri Nooshabadi V, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, Allahverdi A, Izadpanah M, Daneshimehr F, et al. The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. J Cell Biochem 2018; 119(10): 8048-73.
7. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. Mol Med Rep 2015; 12(1): 20-30.
8. Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, et al. Wound healing effects of curcumin: A short review. Curr Pharm Biotechnol 2016; 17(11): 1002-7.
9. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. Molecules 2019; 24(16): 2930.
10. Farhood B, Mortezaee K, Hashemi Goradel N, Khanlarkhani N, Salehi E, Shabani Nashtaei M, et al. Curcumin as an anti-inflammatory agent: Implications to radiotherapy and chemotherapy. J Cell Physiol 2019; 234(5): 5728-40.
11. Zorofchian Moghadamtousi S, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. Biomed Res Int 2014; 2014: 186864.
12. Du W, Zhang K, Zhang S, Wang R, Nie Y, Tao H, et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer. Biomaterials 2017; 133: 70-81.
13. Zirak Javanmard M, Rahnavard M, Soraya H, Karimipour M. Curcumin improves the efficacy of BMSCs in myocardial ischemia injury in rat. Iran Red Crescent Med J 2022; In Press: e86592.
14. Cargnoni A, Ressel L, Rossi D, Poli A, Arienti D, Lombardi G, et al. Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis. Cytotherapy 2012; 14(2): 153-61.
15. Van Den Borne SW, Diez J, Blankesteijn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. Nat Rev Cardiol 2010; 7(1): 30-7.
16. Zhu H, Sun X, Wang D, Hu N, Zhang Y. Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart. Eur J Pharmacol 2015; 754: 66-72.
17. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-β signaling in fibrosis. Growth Factors 2011; 29(5): 196-202.
18. Xiao J, Sheng X, Zhang X, Guo M, Ji X. Curcumin protects against myocardial infarction-induced cardiac fibrosis via SIRT1 activation in vivo and in vitro. Drug Des Devel Ther 2016; 10: 1267-77.
19. Guo J, Lin G, Bao C, Hu Z, Hu M. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. Inflammation 2007; 30(3-4): 97-104.
20. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105(1): 93-8.
21. Cargnoni A, Ressel L, Rossi D, Poli A, Arienti D, Lombardi G, et al. Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis. Cytotherapy 2012; 14(2): 153-61.
22. Liu B, Ding FX, Liu Y, Xiong G, Lin T, He DW, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells conditioned medium attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells in an

irreversible model of unilateral ureteral obstruction. Nephrology (Carlton) 2018; 23(8): 728-36.
23. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. FEBS Lett 2007; 581(21): 3961-6.
24. Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. J Cell Physiol 2006; 207(2):491-8.
25. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. Vasc Health Risk Manag 2019; 15: 1.
26. Boarescu PM, Boarescu I, Bocşan IC, Gheban D, Bulboacă AE, Nicula C, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin nanoparticles on drug-induced acute myocardial infarction in diabetic rats. Antioxidants (Basel) 2019; 8(10): 504-14.

DOI: *10.48305/jims.v40.i698.1008*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 698, 2nd Week, February 2023**

Received: 20.09.2022 Accepted: 26.12.2022 Published: 03.02.2023

Investigation the Effects of Curcumin Pretreatment of Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium on Heart Fibrosis Followed Induction of Myocardial Infarction

Neda Abedpour[1], Asghar Hashemi Mahmood Abad[2], Masoumeh Zirak Javanmard[3]

Original Article

Abstract

Background: The aim of the present study was to evaluate the protective effect of curcumin pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells conditioned medium on heart fibrosis in rat.

Methods: Eighteen male mice were randomly divided into three groups of six; Healthy control group: (normal saline), Patient control group: (isoproterenol (ISO)), Treatment group: ISO + condition medium (CM). Blood samples were then collected. Then the femur and tibia bones were separated and used for stem cell culture. Cell secretions extracted from bone marrow cells were injected through the tail vein. In order to perform the test, the obtained heart samples were fixed in formalin 10% and histologically evaluated. Also, serum levels of LDH (lactate dehydrogenase) and CPK (creatine phosphokinase) were measured.

Findings: Subcutaneous injection of ISO led to the induction of (myocardial infarction: MI) with increase in serum CPK and LDH compared to the normal control group ($P < 0.05$). Intravenous injection of conditioned medium resulted in a significant decrease in serum CPK and LDH levels compared with the MI group ($P < 0.05$). The mean severity of fibrosis in the CM group was significantly lower compared to the MI group, but the inflammation and edema of the heart in both groups were significantly different with normal group.

Conclusion: In the present study, single-dose injection of the CM of mesenchymal stem cells treated with curcumin can attenuate adverse effects of ISO and significantly reduced cardiac fibrosis.

Keywords: Isoproterenol; Rat; Myocardial ischemia; Conditioned medium; Curcumin

Citation: Abedpour N, Hashemi Mahmood Abad A, Zirak Javanmard M. **Investigation the Effects of Curcumin Pretreatment of Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium on Heart Fibrosis Followed Induction of Myocardial Infarction.** J Isfahan Med Sch 2023; 40(698): 1008-15.

1- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2- Student Research Committee, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
Corresponding Author: Masoumeh Zirak Javanmard, Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran; Email: zirak.m@umsu.ac.ir