

## بررسی اثر Poly(I:C) در مقایسه با LPS در تحریک سلول‌های مزانشیمال برگرفته از مغز استخوان در ترمیم سوختگی درجه سه پوست موشی

لیلا سلیمانی\*<sup>۱</sup>، صمد زارع<sup>۲</sup>، رحیم حب نقی<sup>۳</sup>، نوروز دلیرز<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۱/۲۰

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** تأثیر مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم آسیب‌های بافتی مختلف از جمله سوختگی گزارش شده است. پتانسیل درمانی این سلول‌ها تحت تأثیر آگونیست‌های اختصاصی مربوط به رسپتورهای سطحی آن‌ها با نام (Toll like receptor) TLR، قابل تغییر به فنوتیپ‌های پیش التهابی و یا ضدالتهابی می‌باشد. از آنجایی که تغییر فنوتیپ سلول‌های مزانشیمال می‌تواند بر عملکرد درمانی این سلول‌ها مؤثر باشد، لذا این مطالعه به منظور بررسی تأثیر Poly(I:C) (آگونیست TLR3) در مقایسه با LPS (آگونیست TLR4) در تحریک سلول‌های مزانشیمی و تغییر پتانسیل درمانی این سلول‌ها در درمان سوختگی درجه سه پوست موش در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام گردید.

**مواد و روش کار:** تعداد ۳۶ موش سوری نر بالغ با محدوده سنی ۷-۸ هفته و میانگین وزنی ۲۵-۳۰ گرم انتخاب شدند. سوختگی به روش استاندارد و به کمک تماس یک میله فلزی داغ شده در آب جوش در قسمت پشت هر موش به مدت ۹ ثانیه ایجاد شد. یک ساعت پس از القاء سوختگی، موش‌ها به صورت تصادفی در چهار گروه کنترل با دریافت روزانه پماد سیلورسولفادیازین، گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی (تیمار یک) با دریافت زیر جلدی یک میلیون سلول مزانشیمی تحریک نشده، گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با آل پی اس (تیمار دو) با دریافت یک میلیون سلول مزانشیمی تحریک شده با LPS و گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با پلی آی سی (تیمار سه) با دریافت یک میلیون سلول مزانشیمی تحریک شده با Poly(I:C) تقسیم‌بندی شدند. نمونه‌برداری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از القاء سوختگی از ناحیه سوخته به همراه ناحیه سالم اطراف انجام شد و مقاطع بافتی به کمک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین و ماسون تری کروم از نظر ضخامت بافت جوانه‌ای، سرعت روند بهبود آسیب، نظم و آرایش بافتی در نقطه‌ی التیامی و میزان نشست رشته‌های کلاژن در نقطه‌ی آسیب بررسی شدند. نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸، پس از اجرای آزمون نرمالیت، به روش آنالیز واریانس یک طرفه one-way ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی توکی و post hoc تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** اختلاف ضخامت بافت جوانه‌ای در روز هفت بین گروه کنترل و دو گروه تیمار یک ( $P < 0/007$ ) و تیمار دو ( $P < 0/001$ ) از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین گروه تیمار دو با ایجاد وسیع‌ترین بافت جوانه‌ای در روز هفت، اختلاف معنی‌داری با گروه تیمار سه ( $P < 0/002$ ) نشان داد. کاهش ضخامت بافت جوانه‌ای در هر سه گروه تحت تیمار برخلاف گروه کنترل از روز هفت و با شدت بیشتر در گروه تیمار دو آغاز شد. کم‌ترین ضخامت بافت جوانه‌ای در روز ۲۱ مربوط به تیمار دو بود. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین \_ اُئوزین و ماسون تری کروم به ترتیب گویای نظم و آرایش بافتی بهتر و رسوب بیشتر رشته‌های کلاژن در نقطه‌ی آسیب در گروه تحت تیمار دو بود.

**بحث و نتیجه‌گیری:** افزایش پتانسیل درمانی سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با LPS در مقابل کاهش پتانسیل درمانی سلول‌های مزانشیمی تحریک شده با Poly(I:C) می‌تواند به ترتیب ناشی از کسب فنوتیپ پیش التهابی در مقابل کسب فنوتیپ ضدالتهابی توسط سلول‌های مزانشیمی در پاسخ به آگونیست‌های مذکور باشد

**کلیدواژه‌ها:** سوختگی، ترمیم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحریک شده، آل پی اس، پلی آی سی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره دوازدهم، ص ۷۹۵-۷۸۳، اسفند ۱۳۹۶

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

Email: lsoleimany@yahoo.com

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استاد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار ایمنی شناسی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

## مقدمه

مطالعات متعدد بررسی شده است (۴۴-۴۰). با توجه به ضرورت وجود یک محیط ملتهب در روزهای نخستین ترمیم آسیب جهت پیشبرد روند بهبود که توسط بافت جوانه‌ای وسیع مشخص می‌گردد، حضور سلول‌های مزانشیمال با فنوتیپ پیش التهابی می‌تواند این شرایط را تقویت نماید. و بالعکس، حضور سلول‌های مزانشیمال با فنوتیپ ضدالتهابی در نقطه آسیب می‌تواند التهاب مورد نیاز را فروکش نماید و روند ترمیم را طولانی نماید. لذا مطالعه حاضر جهت بررسی اثر Poly(I:C) (با غلظت ۵ میکروگرم و یک ساعت انکوباسیون) در مقایسه با LPS (با غلظت ۱۰ نانوگرم و یک ساعت انکوباسیون) در تغییر پتانسیل درمانی سلول‌های مزانشیمی و اثر آن بر ترمیم ضایعه‌ی سوختگی درجه سه پوست موش، در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش کار

سلول‌های مغز استخوان‌های تیپیا (درشت نی) فمور (استخوان ران) موش‌های ۶-۸ هفته C57B1/6 نر، به روش فلاشینگ، مطابق روش کویاواس<sup>۴</sup> و همکاران جداسازی شده و متعاقب دو بار شستشو با سانتریفیوژ (۱۵۰۰ rpm برای مدت ۵ دقیقه) در PBS<sup>۵</sup> به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM-LG (Gibco- انگلستان) و ۱۰ درصد FBS<sup>۶</sup> (Gibco- انگلستان) منتقل گردیدند. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و غلظت ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub>، 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 یک بار انجام گرفته و در مرحله بارآمدگی بالای ۷۰ درصد کشت سلولی، سلول‌های چسبنده با استفاده از محلول تریپسین ۲۵،۰ درصد (Sigma-Aldrich - آمریکا) جداسازی و جهت پاساژ بعدی به فلاسک‌های T25 منتقل گردیدند (۴۵). در مرحله نهایی ۵ میکروگرم از Poly(I:C) (Sigma-Aldrich, USA) و ۱۰ نانوگرم از LPS به صورت مجزا در محلول ۱۰% FBS-DMEM رقیق شده و میزان 30  $\mu$ l از هر یک از محلول‌های رقیق شده به فلاسک کشت سلول اضافه گردید. فلاسک سلولی به مدت یک ساعت با آگونیست‌های مذکور مجاور سازی شدند و پس از یک ساعت مایع رویی فلاسک دور ریخته شده و مجدداً به مدت دوازده ساعت انکوبه شدند (۴۵).

## حیوانات مورد آزمایش:

سوختگی یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در سراسر جهان به شمار می‌رود که یکی از علل مرگ‌ومیر ناشی از سوختگی، هجوم عوامل بیماری‌زا در نقطه‌ی آسیب‌دیده در صورت عدم درمان مناسب و به موقع می‌باشد (۱-۵). فرایند ترمیم در سه فاز التهاب، تکثیر و تجدید ساختار تقسیم‌بندی می‌شود. هر ماده‌ای که بتواند زمان این فازها را کاهش دهد منجر به تسریع روند بهبود آسیب می‌شود (۸ و ۷ و ۶). وجود اثرات سیتوتوکسیک پماد سیلورسولفادیاژین، کمبود ناحیه‌ی اهداکننده در روش‌هایی نظیر آلوگرافت و نیاز بالا به تعداد سلول‌های کشت داده‌شده و هزینه‌ی سنگین برای فراهم آوردن محیط مناسب جهت حفظ و تکثیر سلول‌ها در روش اتوگرافت، همچنان درمان سوختگی را به‌عنوان یک چالش مطرح می‌کند (۹-۱۲). در این بین سلول‌های مزانشیمی با خصوصیات درمانی متعدد از جمله دارا بودن قابلیت اتولوگ و آلوگرافت شدن در بافت میزبان بدون ایجاد پاسخ ایمنی (۱۴ و ۱۳)، توانایی تمایز به سلول‌های رده‌ی مزانشیمال و غیر مزانشیمال و توانایی ترشح فاکتورهای تروفیک مؤثر در التیام آسیب، تقویت قدرت بقا و بازسازی بافت‌ها و تحریک تولید بافت جوانه‌ای وسیع، این سلول‌ها را به‌عنوان سلول‌هایی کارآمد در برنامه‌های بازسازی بافتی معرفی می‌کند (۱۵-۲۵). امکان استفاده از این سلول‌ها با روش‌های مختلف درمانی از جمله تزریق زیرجلدی، تزریق سیستمیک، استفاده به صورت Co culture با داربست مورد استفاده در گرافت پوست (۲۶-۲۹)، قابلیت این سلول‌ها را در درمان آسیب‌های بافتی به‌ویژه سوختگی افزایش داده است (۲۹-۳۶). از طرفی مطالعات اخیر نشان داده است سلول‌های مزانشیمی تحت کنترل آگونیست‌های اختصاصی مربوط به رسپتورهای سطحی آن‌ها تحت عنوان (TLR)<sup>۱</sup> می‌باشند (۳۷-۴۱). نتایج متناقضی از فعال شدن رسپتورهای سطحی TLR3 و TLR4 توسط آگونیست‌های Poly(I:C)<sup>۲</sup> و LPS<sup>۳</sup> در تغییر فنوتیپ سلول‌های مزانشیمال به سمت فنوتیپ پیش التهابی و ضدالتهابی گزارش شده است. به‌گونه‌ای که برخی از مطالعات گویای اثر یکسان هر دو آگونیست در ایجاد یک فنوتیپ پیش التهابی در سلول‌های مزانشیمال بوده است، در صورتی که سایر مطالعات کسب دو فنوتیپ متفاوت پیش التهابی و ضدالتهابی را در پاسخ به آگونیست‌های مذکور مشخص نموده است. اثر فنوتیپ پیش التهابی سلول‌های مزانشیمال در تسریع بهبود آسیب‌هایی که نیازمند یک محیط ملتهب برای بهبود بوده‌اند و اثر فنوتیپ ضدالتهابی این سلول‌ها در بهبود آسیب‌هایی که نیازمند فروکش شدن التهاب داشته‌اند نیز در

<sup>4</sup> Cuevas etal

<sup>5</sup> Phosphate buffered saline

<sup>6</sup> Fetal Bovine Serum

<sup>1</sup> Toll like receptor

<sup>2</sup> Polyinosinic:polycytidylic acid

<sup>3</sup> Lipopolysaccharid

ساعت تاریکی و روشنایی و با امکان دسترسی نامحدود به آب و غذا انجام پذیرفت.

#### نمونه برداری، برش گیری، رنگ آمیزی اختصاصی پوستی:

نمونه برداری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از القاء سوختگی انجام پذیرفت. در زمان مقرر، موش‌ها در هر چهار گروه کنترل، تیمار ۱، تیمار ۲ و تیمار ۳ با کلروفورم آسان‌کشی شده و بیوپسی گردیدند. نمونه برداری از بافت التیام‌یافته و بافت سالم اطراف 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-ائوزین و ماسون‌تری‌کروم و با استفاده از عدسی چشمی مدرج (eyepiece) خط‌کش‌دار و عدسی چشمی مدرج خط‌کش‌دار<sup>۷</sup> از نظر ضخامت بافت جوانه‌ای، سرعت روند بهبود آسیب، نظم و آرایش بافت التیامی و میزان نشست رشته‌های کلاژن در نقطه‌ی آسیب‌دیده بررسی شدند (۴۷). تراکم فیبرهای کلاژن، با استفاده از رنگ‌های هماتوکسیلین و ائورین و ماسون‌تری‌کروم رنگ‌آمیزی و در سه گروه کنترل، مزانشیم و پلی‌آی‌سی مورد مقایسه کیفی قرار گرفت. نتایج کمی به‌دست‌آمده توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای بررسی نرمال بودن توزیع نتایج استفاده شد. سپس به‌منظور تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Spss ویراست ۱۸، آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی توکی و post hoc استفاده شد  $p < 0.05$  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 دوکی‌شکل زمانی که ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند ویژگی سلول‌های مزانشیمی را نشان دادند (شکل ۲).

**یافته‌های هیستوپاتولوژیک:** نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از لحاظ ضخامت بافت جوانه‌ای، نظم و آرایش بافتی در نقطه‌ی التیام

در این مطالعه، تعداد ۳۶ سر موش سوری نر بالغ سالم با ۸-۷ هفته سن و میانگین وزنی ۳۰-۲۵ گرم انتخاب شدند. به‌منظور گذراندن پروسه استرس‌زدایی و تطبیق با محیط جدید، موش‌ها به مدت یک هفته در خانه حیوانات پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. متعاقباً موش‌ها با احتساب شرایط فیزیکی یکسان از جمله وزن، اندازه و وضعیت ظاهری، به‌صورت کاملاً تصادفی در چهار گروه که هر گروه شامل ۹ سر موش بود تقسیم‌بندی شدند. انجام کلیه آزمایش‌ها در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۱ و با رعایت کامل ضوابط اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

#### القاء سوختگی درجه سه:

القاء سوختگی درجه سه به روش استاندارد به کمک یک میله استوانه‌ای فلزی به وزن ۶۵ گرم و قطر ۱cm انجام پذیرفت. میله فلزی مزبور جهت هم‌دما شدن با آب جوش، به مدت چند دقیقه درون آب جوش قرار داده شد. متعاقب القاء بیهوشی با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (کتامین هیدروکلراید ۵درصد، Alfasan, Netherland و 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 (شکل ۱). متعاقباً، ۱ cc محلول نرمال سالین به‌صورت درون صفاقی جهت جبران آب ازدست‌رفته طی سوختگی به موش‌ها تزریق شد (۴۶). موش‌ها به‌صورت تصادفی و با احتساب شرایط فیزیکی یکسان از نظر وزن، اندازه و وضعیت ظاهری، در چهار گروه کنترل، گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی (تیمار ۱)، گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با آل پی اس (تیمار ۲) و گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با پلی‌آی‌سی (تیمار ۳) تقسیم‌بندی شدند و یک ساعت پس از القاء سوختگی، به ترتیب و به‌طور جداگانه تحت تزریق زیرجلدی با بافر فسفات سالین به همراه دریافت روزانه‌ی پماد سیلورسولفادیازین تا پایان دوره، سلول‌های مزانشیمی (تعداد  $10^6$  سلول مزانشیمی جداشده در ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین)، سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با LPS (تعداد  $10^6$  سلول مزانشیمی تحریک‌شده با LPS در ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین) و سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با Poly(I:C) (تعداد  $10^6$  سلول مزانشیمی تحریک‌شده با Poly(I:C) در ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین) قرار گرفتند. تزریق زیرجلدی به کمک سرنگ انسولین از ناحیه سالم اطراف سوختگی صورت پذیرفت. نگهداری موش‌ها در قفس‌های مجزا، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سیکل ۱۲

<sup>7</sup> Graticule

سلول های مزانشیمی تحریک شده با پلی آی سی) مشاهده شد که اختلاف این دو گروه از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0.002$ ). شروع کاهش ضخامت بافت جوانه های در سه گروه تحت تیمار از روز هفت و با شدت بیشتر در گروه تیمار ۲ مشاهده شد به گونه ای که ضخامت بافت جوانه های در گروه تیمار ۲ از  $3 \pm 28$  در روز هفت به  $2/5 \pm 18$  در روز چهارده رسید. این در صورتی است که ضخامت بافت جوانه های در گروه تحت تیمار ۳ با شدت کم تر از  $3/5 \pm 17$  در روز هفت به  $1/4 \pm 16$  در روز چهارده کاهش یافت. نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین نشان داد گروه تیمار ۲ بیشترین نظم و آرایش بافتی را دارا بوده است (شکل ۳). همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی ماسون تری کروم نیز گویای برتری گروه تحت تیمار ۲ از نظر حضور رشته های کلاژن با بیشترین تراکم بود. تراکم رشته های کلاژن در گروه تیمار ۳ نسبت به گروه های تحت تیمار ۱ و ۲ کم تر بود (شکل ۴).

آسیب و میزان رسوب رشته های کلاژن به عنوان فاکتورهای دخیل در ترمیم آسیب مورد بررسی قرار گرفتند.

### نتایج حاصل از اندازه گیری ضخامت بافت جوانه ای: برای

تعیین نرمال بودن نتایج، از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد که مقادیر Z برای ضخامت بافت جوانه ای در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ به ترتیب ۰/۱۹۸، ۰/۰۶۷ و ۰/۰۶۸ گزارش شد. بر این اساس و با توجه به معنی داری در سطح ۰/۰۵، مشخص شد که توزیع مقادیر بافت جوانه ای نرمال است و مجاز به استفاده از آزمون های پارامتری هستیم. طبق جدول شماره یک، اوج ضخامت بافت جوانه ای در سه گروه تحت تیمار در روز هفت مشاهده شد، این در صورتی است که گروه کنترل با هفت روز تأخیر و در روز ۱۴ به اوج ضخامت بافت جوانه ای رسید. در گروه های تحت تیمار، بیشترین ( $5/3 \pm 28$ ) و کم ترین ( $3/5 \pm 17$ ) ضخامت بافت جوانه ای در روز هفت به ترتیب در گروه تیمار ۲ (گروه تحت تیمار با سلول های مزانشیمی تحریک شده با آل پی اس) و گروه تیمار ۳ (گروه تحت تیمار با

**جدول (۱):** مقایسه ضخامت بافت جوانه ای در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در چهار گروه کنترل، تیمار ۱، تیمار ۲، تیمار ۳ و تیمار ۴ برحسب میکرومتر

گروه (Mean±SD)	گروه (Mean±SD)	P*
تیمار یک (۳,۸۰۸۷±۲۴)	تیمار یک (۳,۸۰۸۷±۲۴)	/۰۰۷
کنترل (روز ۷) ۱,۳۰۳۸±۱۳,۸	تیمار دو (۵,۳۳۸۵۴±۲۸)	/۰۰۱
تیمار سه (۳,۵۳۵۵۳±۱۷)	تیمار سه (۳,۵۳۵۵۳±۱۷)	/۹۹۹
تیمار یک (روز ۷) ۳,۸۰۸۷±۲۴	تیمار دو (۵,۳۳۸۵۴±۲۸)	/۹۹۹
تیمار سه (۳,۵۳۵۵۳±۱۷)	تیمار سه (۳,۵۳۵۵۳±۱۷)	/۴۶۵
تیمار دو (روز ۷) ۳,۸۰۸۷±۲۴	تیمار سه (۳,۵۳۵۵۳±۱۷)	/۰۰۲
کنترل (روز ۱۴) ۴,۴۳۸۴±۳۰,۸	تیمار یک (۴,۴۱۵۸±۲۱)	/۰۱۳
تیمار سه (۱,۴۱۴۲۱±۱۶)	تیمار دو (۲,۵۴۹۵۱±۱۸)	/۰۰۱
تیمار سه (۱,۴۱۴۲۱±۱۶)	تیمار سه (۱,۴۱۴۲۱±۱۶)	/۰۰۱
تیمار یک (روز ۱۴) ۴,۴۱۵۸±۲۱	تیمار دو (۲,۵۴۹۵۱±۱۸)	/۹۹۹
تیمار سه (۱,۴۱۴۲۱±۱۶)	تیمار سه (۱,۴۱۴۲۱±۱۶)	/۹۷۹
تیمار دو (روز ۱۴) ۲,۵۴۹۵۱±۱۸	تیمار سه (۱,۴۱۴۲۱±۱۶)	/۹۹۹
کنترل (روز ۲۱) ۰,۷۰۷۱±۹	تیمار یک (۱,۷۱۷۵±۱۳,۳)	/۰۰۵
تیمار دو (۰,۷۰۷۱±۹)	تیمار دو (۰,۷۰۷۱±۹)	/۰۰۱

P*	گروه (Mean±SD)	گروه (Mean±SD)
		۳,۶۴۲۳±۲۲
/۰۱	تیمار سه (۱,۵۱۶۵±۱۳,۶)	
/۹۴	تیمار دو (۰,۷۰۷۱۱±۹)	تیمار یک (روز ۲۱)
/۹۹۹	تیمار سه (۱,۵۱۶۵±۱۳,۶)	(۱,۷۱۷۵±۱۳,۳)
/۸۹	تیمار سه (۱,۵۱۶۵±۱۳,۶)	تیمار دو (روز ۲۱) ۰,۷۰۷۱۱±۹

\* داده‌ها در سطح  $p < /05$  معنی‌دار می‌باشند.

تیمار یک (گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی)

تیمار دو (گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با LPS)

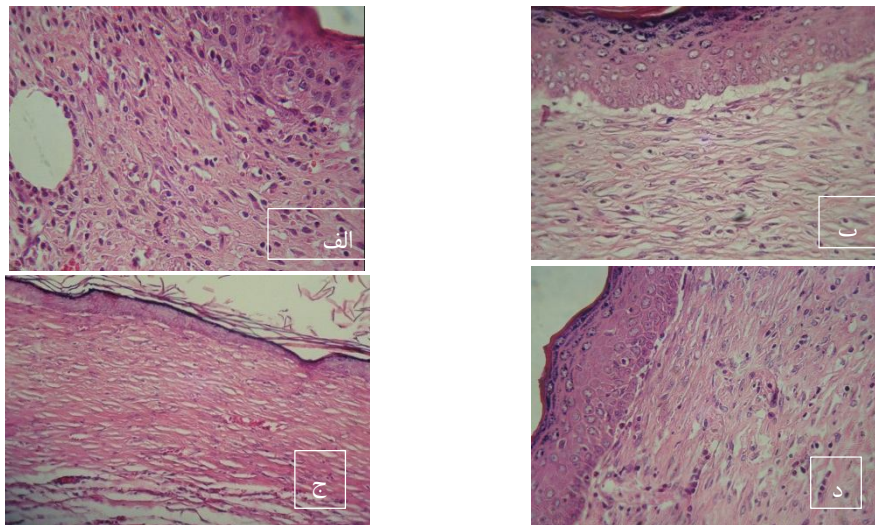
تیمار سه (گروه تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با Poly IC)



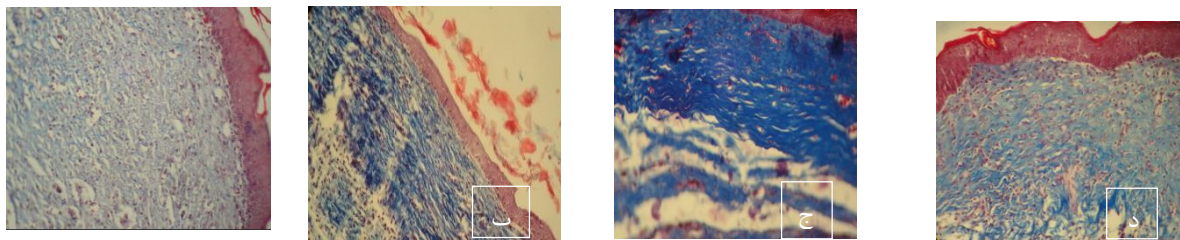
شکل (۱): نمونه زخم سوختگی درجه سه در روز اول از پروسه‌ی درمان



شکل (۲): مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش در پاساژ سوم کشت سلولی



شکل (۳): مقایسه نظم و آرایش بافتی در گروه های کنترل (الف)، تیمار ۱ (ب)، تیمار ۲ (ج) و تیمار ۳ (د) بزرگنمایی



شکل (۴): مقایسه ی تراکم کلاژن در ناحیه ی التیمی در سه گروه کنترل (الف)، تیمار ۱ (ب)، تیمار ۲ (ج) و تیمار ۳ (د) در روز بیست و یک (رنگامیزی ماسون تری کروم، بزرگنمایی  $\times 100$ )

### بحث و نتیجه گیری

در مطالعه ی حاضر، نتایج هیستوپاتولوژیک به ویژه ایجاد بافت جوانه ای وسیع در روزهای نخست ترمیم آسیب، سرعت روند ترمیم (کاهش ضخامت بافت جوانه ای) و نشست کلاژن در نقطه ی آسیب، نشان دهنده ی بهبود معنی دار آسیب در گروه تحت درمان با سلول های مزانشیمی تحریک شده با آل پی اس (تیمار ۲) بود. مشاهده ی وسیع ترین بافت جوانه ای در این گروه به همراه سرعت بیشتر روند بهبود و حضور رشته های متراکم کلاژن در نقطه ی تحت درمان، دلیلی بر تقویت مطالعات قبل مبنی بر تغییر فنوتیپ سلول های مزانشیمال تحریک شده با LPS به سمت یک فنوتیپ پیش التهابی می باشد. از طرفی، کاهش پتانسیل درمانی سلول های مزانشیمال تحریک شده با Poly(I:C) در فاکتورهای مذکور نسبت به دو گروه تحت تیمار ۱ و به ویژه تحت تیمار ۲، این احتمال را که کاهش روند بهبود می تواند ناشی از تغییر فنوتیپ سلول های تحریک شده با پلی آی سی به سمت یک فنوتیپ ضد التهابی باشد را تقویت می نماید. طی مطالعات متعددی که در خصوص اثر سلول های

بنیادی مزانشیمی بر فرایند التیام زخم پوستی صورت پذیرفته بود، مشخص شد این سلول ها به واسطه ی پتانسیل تمایزی به سلول های مختلف پوستی و نیز به واسطه ی ترشح فاکتورهای مؤثر در پیشبرد روند بهبود آسیب، تأثیر مثبتی در روند ترمیم آسیب های پوستی را دارا می باشند (۴۸-۵۰). این واسطه های درمانی که شامل سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد متعدد می باشند، اثرات درمانی گوناگونی از جمله تحریک عروقزایی، تحریک تولید بافت جوانه ای، متعادل سازی ماتریکس خارج سلولی و کاهش التهاب را در آسیب های بافتی مختلف از جمله سوختگی نشان داده اند (۵۱-۵۶). یافته های تحقیق حاضر نیز بیانگر نقش مؤثر سلول های مزانشیمی (تیمار ۱) در تحریک بافت جوانه ای، تسریع روند ترمیم و تحریک فیبروبلاست ها برای سنتز بیشتر کلاژن می باشد (جدول شماره ۱ و شکل ۳ و ۴). با این وجود مطالعات بالینی در حوضه ی درمان با سلول های بنیادی، تجویز دوز کافی از سلول ها را امری اساسی در دستیابی به اثرات قابل قبول درمانی توسط این سلول ها گزارش کرده است (۵۸ و ۵۷). از آنجای که یکی از اساسی ترین مشکلات محققین

در فاز اولیه‌ی ترمیم آسیب سوختگی، حضور یک محیط ملتهب می‌تواند در ایجاد بافت جوانه‌ای وسیع دخالت داشته باشد، بنابراین یک فنوتیپ پیش التهابی از سلول‌های مزانشیمال با افزایش ترشح فاکتورهای پیش التهابی مؤثر در ایجاد بافت جوانه‌ای وسیع و تحریک سلول‌های فیبروبلاست به ترشح بیشتر رشته‌های کلاژن موجبات تسریع روند بهبود آسیب را فراهم می‌نماید و اگر این فنوتیپ در جهت ضدالتهابی هدایت شود مسلماً روند ترمیم زخم نیز طولانی‌تر خواهد شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو با نتایج مطالعاتی از جمله واترمن<sup>۵</sup> و همکاران است که اثر Poly(I:C) را در ایجاد یک فنوتیپ ضدالتهابی و اثر LPS را در ایجاد یک فنوتیپ پیش التهابی در سلول‌های مزانشیمی مشخص نمودند (۶۴،۴۰). همان‌گونه که از نتایج نمودار و اشکال مشخص است، تحریک سلول‌های مزانشیمال با LPS (تیمار ۲)، پتانسیل درمانی این سلول‌ها را در تحریک ایجاد بافت جوانه‌ای وسیع، تسریع روند ترمیم آسیب و نشست کلاژن در نقطه‌ی آسیب افزایش داده است (دلیلی بر کسب فنوتیپ پیش التهابی). همچنین کاهش عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحریک‌شده با Poly(I:C) (تیمار ۳) در تمامی موارد فوق‌گویی کاهش پتانسیل درمانی این سلول‌ها می‌باشد (دلیلی بر کسب فنوتیپ ضدالتهابی). این نتایج متناقض با نتایج حاصل از مطالعه‌ی دانگ و همکارانش مبنی بر کسب فنوتیپ ضدالتهابی در سلول‌های مزانشیمال تحریک‌شده با LPS می‌باشد (۶۵). بنابراین تزریق سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با Poly(I:C) در فاز اولیه‌ی ترمیم آسیب توصیه نمی‌گردد و به‌منظور بررسی اثر مثبت ضدالتهابی این سلول‌ها در بهبود آسیب سوختگی، استفاده از سلول‌های مزانشیمی تحریک‌شده با Poly(I:C) در فاز دوم ترمیم آسیب، زمانی که التهاب فروکش شده است و عوامل ضدالتهابی می‌توانند باعث تسریع بهبود آسیب شوند پیشنهاد می‌شود. واترمن همچنین در مطالعه خود نشان داد، تحریک سلول‌های مزانشیمی با Poly(I:C)، به‌واسطه‌ی مهار فاکتور TGFβ به‌عنوان فاکتور کنترل‌کننده‌ی رسوب کلاژن در ماتریکس خارج سلولی، میزان نشست کلاژن را در این بافت کاهش می‌دهد در صورتی که تحریک سلول‌ها با LPS باعث افزایش رسوب کلاژن می‌گردد. نتایج رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم در مطالعه‌ی حاضر همسو با مطالعه‌ی فوق، گویای افزایش و کاهش نشست کلاژن به ترتیب در گروه‌های تحت تیمار با سلول‌های مزانشیمی تحرک‌شده با LPS و Poly(I:C) می‌باشد. با توجه به نقش کلاژن در استحکام بافت تیمای، افزایش پتانسیل درمانی سلول‌های مزانشیمال در تحریک ترشح رشته‌های کلاژن در نقطه آسیب می‌تواند راهکاری مناسب در

در زمینه‌ی سلول درمانی و همچنین در مطالعه‌ی حاضر، نیاز بالا به سلول‌های مزانشیمی و هزینه‌بر بودن پروسه‌ی کشت سلول می‌باشد، لذا راهکاری جهت افزایش پتانسیل درمانی و افزایش بقای این سلول‌ها در ناحیه‌ی آسیب‌دیده جهت استفاده از دوز کم‌تر به همراه پاسخ درمانی بالاتر از سلول‌ها مورد توجه محققان قرار گرفته است. در این مسیر، یک رویکرد مفید در تقویت اثربخشی سلول‌های مزانشیمی شناسایی شده است. حضور رسپتورهای سطحی تحت عنوان Toll like receptor (TLR) و تحت تأثیر قرار گرفتن سلول‌های مزانشیمال توسط آگونیست‌های اختصاصی این رسپتورها در مطالعات متعدد مشخص شده است (۳۷-۴۱). افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در حفاظت از این سلول‌ها در برابر عوامل استرس اکسیداتیو که توسط سلول‌های ایمنی در پاسخ به التهاب ایجاد می‌شود، در پاسخ به تحریک TLR ها توسط آگونیست‌های اختصاصی این رسپتورها گزارش شده است که اثر و بقاء این سلول‌ها را برای پیوند در ناحیه‌ی ملتهب کارآمدتر می‌سازد (۵۹ و ۶۰). لیوتا<sup>۱</sup> طی مطالعه‌ی نشان داد سلول‌های مزانشیمی تحت تأثیر هر دو آگونیست اختصاصی مربوط به TLR3,4، واسطه‌های پیش التهابی از جمله اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۸ را به میزان بالایی بیان می‌کنند (۶۱). این نتایج توسط ونگ نیز مورد تأیید قرار گرفت (۶۲). رومئو<sup>۳</sup> و همکاران نیز نشان داد تحریک TLR های ۳ و ۴ باعث ایجاد یک محیط ملتهب و جاذب نوتروفیلی برای سلول‌های ایمنی ذاتی می‌گردد که گویای اثر یکسان هر دو آگونیست در ایجاد یک فنوتیپ پیش التهابی در سلول‌های مزانشیمال بود (۴۲). با این وجود برخی مطالعات نتایج متفاوتی از تحریک TLR4 و TLR3 به ترتیب توسط LPS در ایجاد ویژگی پیش التهابی و Poly(I:C) در ایجاد یک ویژگی ضدالتهابی در سلول‌های مزانشیمال نشان دادند (۶۳ و ۶۴ و ۴۰). نتایج این مطالعات نشان داد یک فنوتیپ پیش التهابی با افزایش ترشح فاکتورهای پیش التهابی (اینترلوکین ۶ و ۸)، اثر مثبت خود را در ترمیم آسیب‌هایی که نیازمند به یک محیط ملتهب می‌باشند نشان می‌دهد و در مقابل، یک فنوتیپ ضدالتهابی با افزایش فاکتورهای ضدالتهابی (پروستوگلاندین E2، ایندول آمین داکسیژناز و...) در درمان آسیب‌هایی که نیاز به فروکش شدن التهاب داشته‌اند مؤثر می‌باشد (۶۳ و ۶۴ و ۴۰). این در صورتی است که نتایج کاملاً متناقضی در سال ۲۰۱۶ توسط دانگ<sup>۴</sup> و همکارانش ارائه گردید. این محققان در مطالعه خود مبنی بر اثر LPS در تحریک سلول‌های مزانشیمال نشان دادند فنوتیپ این سلول‌ها پس از رویارویی با LPS به سمت فنوتیپ ضدالتهابی و مؤثر در درمان آسیب‌هایی که نیازمند فروکش شدن التهاب هستند پیشرفت می‌نماید (۶۵). از آنجایی که

<sup>4</sup> Dong et al

<sup>5</sup> Waterman et al

<sup>1</sup> Liotta et al

<sup>2</sup> Wang et al

<sup>3</sup> Romieu et al

### تشکر و قدردانی

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

درمان سوختگی و سایر آسیب‌های پوستی باشد همچنین در متدهای مورد استفاده در جوان‌سازی پوست که مبنای کار بر پایه‌ی حضور کلاژن در نقطه‌ی مورد نظر می‌باشد نیز می‌تواند مؤثر واقع گردد.

### References:

1. Forjuoh SN. Burns in low-and middle- income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. *Burns* 2006; 32: 529.
2. 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.
3. Frederic C, Chang MD and Briant Herzog BS. A followup study of physical and psychological disability. *Burn Unit* 1975; 183(1): 34-7.
4. Andreasen NJ and Norris AS. Long-term adjustment and adaptation mechanisms in severely burned adults. *J Nervous Mental Disease* 1972; 154(5): 352-62.
5. Cakir B, Yegen BC. Systemic responses to burn injury. *Turkish J Med Sci* 2004; 34(2004): 215-26.
6. Brunicaudi FC, Schwartz SI. Schwartz principles of surgery. 8th ed. NewYork: McGrawHill; 2005. p: 87-107.
7. DiPietro LA, Burns AL. Wound healing. New Jersey: Humana Press; 2002; 3-16.
8. Sewall GK, Robertson KM, Connor NP, Heisey DM, Harting GK. Effect of topical mitomycin on skin wound contraction. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5(1): 59-62.
9. Hansbrough JF. Current status of skin replacements for coverage of extensive burn wounds. *J Trauma* 1990;30(12 Suppl):S155-160.
10. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Altmock BW, Pence PC, Heggers JP, Johnston GF. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Ann Plast Surg* 1992; 29(3):193-201.
11. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 2007; 33(2): 139-48.
12. Dai T, Huang YY, Sharma SK, Hashmi JT, Kurup DB, Hamblin MR. Topical antimicrobials for burn wound infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2010; 5(2): 124-51.
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, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 2009;69(4):1255-8.
15. Mcfarlin K, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Kwon D, Arbab AS, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen* 2006;14(4):471-8.
16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
17. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-4.
18. 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(46): 275-86.
19. 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.
  20. Baghaban Eslaminejad M, Nikmahzar A, Eftekhari Yazdi P, Piryaei A. The structure of Human Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Cartilage in Micromass Culture System. *Yakhteh Med J* 2006; 8(31): 162-71.
  21. Saheli M, Hosseini A, Piryaei A, Fadaei Fathabadi F, Bandehpour M, Salehi M, Norouzian 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):191-202.
  22. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1(2):92-100.
  23. 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.
  24. 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.
  25. Kellie MC, Farlin MD, Xiaohua Gao MD, Yong Bo Liu MD, Deborah S. Dulchavsky PA, David Kwon MD, Ali S. Arbab MD, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rats. *Wound Repair Regen* 2006; 14(4):471-8.
  26. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Hérodin F, Meineke 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. 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.
  28. 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.
  29. Alexaki VI, Simantiraki D, Panayiotopoulou M. et al, "Adipose tissue-derived mesenchymal cells support skin re epithelialization through secretion of KGF-1 and PDGF-BB: comparison with dermal fibroblasts. *Cell Transplant* 2012; 21(11):2441-54.
  30. Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu W, et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs* 2008; 32(12):925-31.
  31. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin 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.
  32. 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):50-8.
  33. 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 Ther* 2009; 16(1):34-42.
  34. Ha XQ, Lu TD, Hui L, and Dong F. 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.
35. Xue L, Xu YB, Xie JL, et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model. *Int J Clin Experimen Pathol* 2013; 6(7):1327–36.
36. Mansilla E, Spretz R, Larsen G, 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 Proceedings* 2010; 42(10):4275–8.
37. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concept on the Immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem cell Res Therapy* 2010; 11,1(5):34.
38. Miggin, SM and O'Neill, LAJ. New insights into the regulation of TLR signaling. *J leukocyte Biol* 2006; 80(2):220-6.
39. 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.
40. Waterman RS, Tomchuk SL, Henkle SL and Betancourt AM. new mesenchymal stem cell paradigm Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *Plos one* 2010; 5(4), e10088.
41. 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.
42. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, Cohen IR, Zipori D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 2007; 109(4): 1422–32.
- 43.. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm* 2010;2010:865601.
44. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, et al. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol* 2009;182(12):7963–73.
45. Cuevas P, Carceller F, Dujovnv M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 2002. 24: 634-8.
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(1):87-94.
48. Lee T. Stem cell therapy independent of stemness. *World J Stem Cells* 2012;4(12):120-4.
49. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011; 9(1): 11-5.
50. Shabbir A, Zisa D, Lin H, Mastri M, Roloff G, Suzuki G, Lee T. Activation of host tissue trophic factors through JAKSTAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cellmediated cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(5): H1428-H1438.
51. 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):220-3.

52. Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25(1): 73-8.
53. Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu W et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs* 2008; 32(12): 925-31.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, et al. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 2006; 113(10): 1311-25.
58. Friis T, Haack-Sørensen M, Mathiasen AB, Ripa RS, Kristoffersen US, Jørgensen E, et al. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina. *Scand Cardiovasc J* 2011; 45(3): 161-8.
59. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzon IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 2010, 5(2): e9252
60. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS: Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 2006, 24(12):2744-52.
61. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. 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 Cells* 2008;26(1):279-89.
62. Wang Y, Abarbanell AM, Herrmann JL, Weil BR, Manukyan MC, Poynter JA, et al. TLR4 inhibits mesenchymal stem cell (MSC) STAT3 activation and thereby exerts deleterious effects on MSC-mediated cardioprotection. *PLoS ONE* 2010;5(12):e14206.
63. Nemeth K, Mayer B, Mezey E. Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. *J Mol Med* 2009; 88(1):5-10.
64. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 2006;24(12):2744-52.
65. Sung DK, Chang YS, Sung SI, Yoo HS, Ahn SY, Park WS. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signalling. *Cell Microbiol* 2016;18(3):424-36.

## A STUDY ON THE EFFECT OF POLY (I: C) VS LPS ON STIMULATING BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL CELLS IN HEALING THIRD-DEGREE SKIN BURNS IN MOUSE

Leyla Soleymani<sup>1\*</sup>, Samad Zare<sup>2</sup>, Rahim Hobbenaghi<sup>3</sup>, Nowruz Delirezhi<sup>4</sup>

Received: 3 Dec, 2016; Accepted: 9 Feb, 2017

### Abstract

**Background & Aims:** The positive effect of mesenchymal stem cells in healing of various types of tissue damage such as burn has been reported. The therapeutic potential effects of mesenchymal stem cells influenced by certain agonists from their surface called Toll like receptor (TLR) can be modified into proinflammatory and anti-inflammation phenotypes. It is believed that modification of phenotypes of mesenchymal stem cells can affect their therapeutic function. Therefore, the aim of this study was to assess the influence of Poly(I:C) (TLR3 agonist) versus LPS (TLR4 agonist) in stimulating mesenchymal stem cells and alteration of the therapeutic potential of these cells for the treatment of third-degree skin burns in mice which was performed at institute of Bio-technology, Urmia University, Urmia, Iran.

**Materials & Methods:** Total 36 male mice aged 7-8 weeks with 25-30 gr average weights were selected. Based on burn standard method, a stainless-metal rod was heated to 100 in boiling water and burn wounds of 9 second duration were created on each mouse. Within an hour of burn induction, the mice were randomly assigned to four groups, control group with daily application of silver sulfadiazine gel, treatment 1 was treated by receiving subcutaneously 106 unstimulated mesenchymal cells, treatment 2 was treated by receiving subcutaneously 106 lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mesenchymal cells, treatment3 was treated by receiving subcutaneously 106 Poly (I:C)-stimulated mesenchymal cells. Biopsies were taken from wounds and some normal tissues around it on days 7, 14 and 21 after burn induction. All samples were examined histopathologically by Hematoxylin-Eosin and masson trichrome stains in terms of thickness of the granulation tissue, tissue repair process, array of granulation tissue and deposition of collagen fibers in the repairing area. Checking normality test was processed using SPSS 18.0 Software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and data then were analyzed using one-way ANOVA, Tukey and post hoc test.

**Results:** Thickness of the granulation tissue on day 7 differed significantly between the control group and treatment 1 ( $P < / 007$ ) as well as control group and the treatment 2 ( $P < / 001$ ). Moreover, treatment 2 showed statistically significant difference for creating the most extensive granulation tissue compared with treatment 3 ( $P < / 002$ ). Thickness of granulation tissue started to decrease since day 7 in all treatment groups but control with a more significant progress in treatment 2. The minimum thickness of the granulation tissue was observed for treatment 2 on day 21. The results from the hematoxylin & eosin and Masson's trichrome stained granulation tissues revealed collagen deposition develop in the repairing area

**Conclusion:** Increased therapeutic potential of LPS -stimulated mesenchymal stem cells versus reduced therapeutic potential of Poly (I:C)-stimulated mesenchymal stem cells can be as a result of attaining the proinflammatory versus anti-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells in response to the respective agonists, respectively.

**Keywords:** Burn, Healing, Stimulated mesenchymal stem cell, LPS, Poly (I:C)

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

**Tel:** +893833361046

**Email:** lsoleimany@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2018; 28(12): 794 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Master in Animal Physiology, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Professor of Biochemistry, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor of Pathology, Department of Pathobiology, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor of Immunology, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.