

بهبودی علایم بالینی در مدل تجربی سندرم زجر تنفسی حاد در گوسفند پس از پیوند اتولوگ با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان

جواد عباسی^۱، محمدرضا مخبر دزفولی^{۱،۳}، سیروس صادقیان چالشتی^{۱،۳}، محمد مهدی دهقان^{۲،۳}، علیرضا وجهی^{۲،۳}، حسین بهاروند^{۴،۵}، مصطفی قانع^۶، معصومه جباری فخر^{۳،۷}

(۱) گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۳) پژوهشکده تحقیقات زیست‌پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۴) گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

(۵) گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

(۶) مرکز تحقیقات مدیریت سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

(۷) فارغ‌التحصیل دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۸ آذر ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۷ اسفند ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS) یکی از اختلالات ریوی است که سبب مرگ در انسان و دام می‌شود و بدلیل نبود درمان دارویی ویژه برای آن، دستیابی به رویکردهای درمانی جدید مثل درمان با سلول‌های بنیادی، یک نیاز ضروری است. هدف: ارزیابی اثرات درمانی پیوند داخل نای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs) در بهبود علایم بالینی در مدل تجربی ARDS ایجاد شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) ایکلای سویه-B₅O₅₅ در گوسفند هدف مطالعه حاضر می‌باشد. روش کار: در این مطالعه از ۱۰ رأس گوسفند نر نژاد شال با سن ۳-۴ ماه، بعد از قرار دادن تصادفی در دو گروه تیمار و کنترل استفاده شد. از گوسفند های گروه تیمار بعد از بیهوشی با کتامین و زایلازین نمونه مغز استخوان اخذ و در اتاق تمیز BM-MSCs جداسازی، تکثیر و با ارزیابی مارکرهای سطحی شناسایی شدند. سپس مدل تجربی ARDS، از طریق تزریق داخل نای LPS با دوز ۴۰۰ μg/kg، ایجاد شد. علایم بالینی و تهیه تصاویر رادیوگرافی قبل و ۲۴ ساعت بعد از تزریق LPS انجام گرفت. بعد از تأیید التهاب، گوسفندها بیهوش و در موقعیت جناغی از طریق کاتتر لاواژ در محل دو شاخه شدن نای در گروه تیمار BM-MSCs پاساژ سوم به میزان ۵۰×۱۰^۶ سلول بصورت پیوند اتولوگ و در گروه کنترل PBS انتقال داده شد. سپس علایم بالینی در ساعات ۱۲، ۳۶ و روزهای ۱، ۲ و ۷ در هر دو گروه ثبت و نهایتاً بر اساس سیستم اسکور بندی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج: بررسی داده‌ها نشان داد پیوند BM-MSCs سبب بهبودی معنی‌دار در علایم بالینی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، صداهای تنفسی، سرفه، وضعیت مخاطات، ترشحات بینی، اشتها و وضعیت جسمانی در مقایسه با گروه کنترل شد. کاهش معنی‌دار در تعداد تنفس و دمای بدن از ساعت ۱۲ و در تعداد ضربان قلب از ساعت ۲۴ به بعد آغاز شد. همچنین تغییرات صداهای تنفسی در روز اول بعد از پیوند، وضعیت جسمانی، مخاطات و اشتها در روز سوم، وقوع سرفه و ترشحات غیر طبیعی از بینی در روز هفتم به حالت قبل از ایجاد التهاب (زمان ۲۴-) بازگشته بود و میانه اسکور برای آن‌ها صفر بود. نتیجه‌گیری نهایی: این مطالعه نشان داد که پیوند BM-MSCs می‌تواند بصورت معنی‌داری سبب بهبودی و کاهش در شدت علایم بالینی ARDS شود.

واژه‌های کلیدی: ARDS، BM-MSCs، علایم بالینی، درمان با سلول‌های بنیادی، گوسفند

مقدمه

تجمع نوتروفیل‌ها و سپس مهاجرت آن‌ها از سطوح اندوتلیال عروق و اپیتلیوم آئوئول‌ها شده که سبب آزادسازی پروتئازها، سیتوکین‌ها و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. این واسطه‌ها منجر به نفوذپذیری پاتولوژیک عروق، شکاف در سد اپیتلیوم آئوئول‌ها و نکرور سلول‌های آئوئولی تیپ I و II می‌شوند که نهایتاً منجر به ادم ریه، تشکیل غشای هیالینی و از دست دادن سورفاکتانت می‌شود که سبب کاهش کمپلایانس ریوی شده و تبادل هوا را دشوار می‌کند (۲). بنابراین ARDS با علایم (۱) شروع حاد تنگی نفس، (۲) فشار اکسیژن شریانی کاهش یافته (هیپوکسمی)، (۳) عدم وجود شواهد کلینیکی نارسایی اولیه قلب چپ و (۴) پیدایش ارتشاحات ریوی منتشر در کلیشه‌های رادیوگرافی مشخص می‌شود (۲۲).

بیماری‌های ریوی یک از عوامل اصلی مرگ در انسان و دام هستند و به علت شیوع بالای بیماری‌های ریوی در سراسر جهان، توسعه استراتژی‌های پیشگیرانه و روش‌های درمانی جدید به‌منظور کاهش بیماری‌های ریوی و افزایش کیفیت زندگی اهمیت بسیاری دارند. سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS) (Acute respiratory distress syndrome) برای اولین بار در سال ۱۹۶۷ به عنوان یک سندرم بالینی نارسایی حاد تنفسی شناخته شد. این سندرم نمایانگر یک اختلال تنفسی پیشرونده است (۳) که اعتقاد بر این است که در ابتدا، یک آسیب مستقیم ریوی یا غیر مستقیم خارج ریوی، منجر به افزایش یا تکثیر واسطه‌های التهابی می‌شود که این واسطه‌ها باعث



تحقیقاتی امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری شدند و سپس با انجام معاینات بالینی، آزمایشات خون شناسی و انگل شناسی از سلامت کامل آن‌ها اطمینان حاصل شد. گوسفندان مورد نظر بطور تصادفی در دو گروه کنترل (دریافت کننده PBS (Phosphate Buffer Sulfate) به عنوان دارونما) و تیمار (دریافت کننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان) قرار داده شدند. سپس از گوسفندان گروه تیمار نمونه مغز استخوان اخذ و جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه تهران انتقال داده شد.

قبل از شروع مطالعه، ابتدا گوسفندها از مرکز تحقیقاتی امین آباد به پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی منتقل و تا ۴۸ ساعت به منظور سازگاری با محیط و رفع استرس حمل و نقل نگهداری شدند و سپس مطالعه آغاز شد.

نمونه‌گیری مغز استخوان و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: به منظور کاهش احتمال پس زدن پیوند سلول‌ها، مغز استخوان اخذ شده از هر گوسفند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از آن به همان گوسفند پیوند خودی زده شد. بدین منظور گوسفندهای گروه تیمار پس از پرهیز غذایی ۱۲ ساعته، ابتدا ۲/۵ mg/kg نروفلو کساسین ۵٪ (ایوریحان-ایران) و ۵ mg/kg ترامادول (شیمی دارو-ایران) به عنوان داروی ضد درد به صورت داخل عضلانی تزریق شد. پس از گذشت یک ساعت گوسفندها بوسیله تزریق کتامین ۱۰٪ (Alfasan-Holland، ۱۰ mg/kg) و زایلازین (Interchemie-Holland، ۰/۱ mg/kg) بصورت عضلانی بیهوش شدند. سپس ناحیه بال استخوان ایلیوم لگن بصورت آسپسی جراحی آماده شد، سپس پوست ناحیه به اندازه ۲۰ ml برش داده شد و با رویت کمرست استخوان ایلیوم، حدود ۵ ml مغز استخوان با سرنگ حاوی ۱ ml هیپارین (IMAGEN، ۷۰۰ U/ml) و سوزن جمشیدی نمره ۱۳ اخذ شد.

نمونه‌های مغز استخوان اخذ شده بلافاصله به اتاق تمیز (Clean Room) پژوهشکده زیست‌پزشکی انتقال داده شدند. در اتاق تمیز کلاس B و در زیر هود لامینار کلاس II جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شد. بطوریکه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نمونه گرفته شده به نسبت ۱:۱ با محیط کشت DMEM (حاوی گلوکز بالا) حاوی FBS ۲۰٪+ Penicillin/ Streptomycin (محیط A) رقیق شد. هر ۵ ml از نمونه بدست آمده به آرامی و از دیواره فالكون بر روی ۳ ml فایکول قرار گرفت؛ بطوری که دو لایه مجزا تشکیل و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰ g سانتریفیوژ شد که سه لایه مجزا تشکیل شد:

- لایه ۱ (لایه بالایی): حاوی محیط کشت اضافه شده به مغز استخوان و پلاسما
- لایه ۲ (لایه میانی): لایه شیری رنگ حاوی باقی کورت، فایکول و سلول‌های تک هسته‌ای
- لایه ۳ (لایه پایینی): حاوی گلبول‌های قرمز

درمان دارویی ویژه‌ای برای ARDS وجود ندارد و درمان‌های آن حمایتی هستند، که شامل تجویز اکسیژن، تهویه مکانیکی، مایع درمانی، حمایت تغذیه‌ای و استراحت است. علی‌رغم انجام تدابیر درمانی میزان مرگ و میر ناشی از ARDS در انسان حدود ۵۰-۳۰٪ است (۱۹). از طرفی با توجه به میزان شیوع بیماری‌های حاد ریوی در حیوانات، شناخت بهتر نشانه‌های بالینی ARDS و روش‌های درمانی جدید می‌تواند به دامپزشکان در تشخیص و درمان بیماری کمک کند و از طرفی میتوان از آن به عنوان مدل حیوانی آزمایشگاهی در توسعه و اصلاح روش‌های مدرن پیوند سلول‌های بنیادی استفاده کرد (۲۴). لذا دستیابی به رویکردهای درمانی جدید که نه تنها به تخفیف علائم بیماری کمک کنند بلکه در دوره طبیعی بیماری مربوطه نیز تأثیر بگذارند، یک نیاز ضروری محسوب می‌شود (۲۱). یک استراتژی برای درمان ARDS، که می‌تواند جایگزین سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال آسیب‌دیده شود و از نشت مایعات و ماکرومولکول‌ها به داخل آلوئول‌ها جلوگیری کند، روش سلول درمانی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells (MSC))، سلول‌های بنیادی چندقوه با قدرت تکثیری بالا و توانایی تمایز به رده‌های سلولی مختلف و خصوصاً اثرات آن‌ها در تعدیل ایمنی بدن (۵)، باعث شده تا از این سلول‌ها به عنوان ابزاری کاربردی در جهت اهداف سلول درمانی به منظور درمان بیماری‌های ریوی استفاده نمود.

محققین خواص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را در آسیب حاد ریوی ناشی از لیپوپلی ساکراید (LPS) باکتری اشریشیا کلاهی (E. coli) را در مدل‌های حیوانی موش و رت بررسی کرده‌اند. نتایج آن‌ها نشان داده که این سلول‌ها از طریق ترشح آنژیوپروتئین و عامل رشد کراتینوسیت (۱۰) و با کاهش میزان پروتئین تام، آلبومین و Igm در مایع شستشوی برونشی-آلوئولی (BAL) (Bronchoalveolar Lavage) سبب بازیابی یکپارچگی غشاء مویرگی-آلوئولی و با ترشح آنتاگونیست گیرنده II-۱ (۱۰)، کاهش میزان TNF- α و MIP-۲ و افزایش میزان II-۱۰ در پلاسما و BAL (۶) و با کاهش نوتروفیل‌ها در BAL (۷) سبب کاهش التهاب در ریه می‌شوند.

لذا هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات درمانی پیوند داخل نایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) در بهبود علائم بالینی در مدل تجربی ARDS ایجاد شده با LPS باکتری اشریشیا کلاهی سوبه B5:O55 در گوسفند است.

مواد و روش کار

نگهداری و آماده سازی گوسفندها: برای انجام این تحقیق از ۱۰ رأس گوسفند نر نژاد شال در رده سنی ۳-۴ ماهه با میانگین وزن $30 \pm 3/7$ kg استفاده شد. گوسفندان به مدت ۳۰ روز با شرایط یکسان محیطی و تغذیه‌ای در مرکز



التهاب حاد، تصاویر رادیوگرافی قبل و ۲۴ ساعت بعد از تزریق LPS تهیه شد. لازم به ذکر است دوز LPS مورد استفاده در این مطالعه بعد از بررسی دوزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰) در گوسفند بدست آمد. بطوریکه دوزهای کمتر از ۴۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ سبب ایجاد التهاب ریه معنی دار نشدند و دوز بالاتر از ۴۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ هم سبب مرگ شد.

پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: ۲۴ ساعت بعد از ایجاد التهاب حاد ریه، تدابیر آماده سازی و بیهوشی گوسفندها با کتامین ۱۰٪ و زایلازین در هر دو گروه انجام شد. سپس گوسفندها در موقعیت جناغی قرار داده شدند و لوله نای به داخل نای هدایت و کاتتر لاواژ از داخل لوله نای تا محل دو شاخه شدن نای هدایت شد. سپس در گروه تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ سوم به میزان 5×10^6 سلول که در محلول PBS رقیق شده بودند بصورت پیوند اتولوگ به گوسفندها پیوند زده شد. در مقابل در گروه کنترل تنها PBS به داخل ریه‌ها انتقال داده شد. تمامی گوسفندها تا زمان هوشیاری کامل در اتاق مراقب‌های ویژه (ICU) پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی تحت مراقبت کامل بودند و سپس به اتاق نگهداری منتقل می‌شدند.

ثبت علائم بالینی: معاینات بالینی قبل و بعد از تزریق LPS و در ساعات ۳، ۶، ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ پس از پیوند سلول‌های بنیادی در گروه تیمار و پس از تزریق PBS در گروه شاهد بررسی و همه اطلاعات شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، تغییرات در صداهای تنفسی، وجود یا عدم وجود سرفه، وضعیت اشتها، وجود یا عدم وجود ترشحات بینی، وضعیت مخاطات و وضعیت جسمانی در فرم‌های پیش بینی شده ثبت شد و سپس اسکورهای بالینی مربوطه برای هر گوسفند در هر زمان مطابق جدول ۲ محاسبه و ثبت شد (۱). این سیستم اسکوربندی بر پایه معیارهای ارزیابی شده بالینی است که بصورت انفرادی و برای هر یک از دام‌ها سنجیده شده و برای بدست آوردن اسکور تام با هم جمع شدند. مؤلفه‌های اسکور بالینی طبق علائم اصلی ذکر شده در متون علمی و پژوهشهای منتشر شده در این زمینه تعیین گردید (۱۶، ۱۳).

آنالیز آماری: نتایج بدست آمده با بهره گیری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تعداد ضربان قلب، تنفس و میزان دما بصورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد و جهت مقایسه از آزمون‌های آماری Independent Samples T-Test و Repeated measurement ANOVA استفاده شد. سایر علائم بالینی مطابق سیستم اسکوربندی محاسبه و برای مقایسه آماری از آزمون‌های غیرپارامتری Mann-Whitney و Friedman Test استفاده شد. مقادیر $p < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان: روند

در مرحله بعد به آرامی توسط پیپت، محتویات لایه ۲ جمع آوری شد و در یک فالكون استریل جدید منتقل و به نسبت ۱:۱ با محیط A مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی خارج و رسوب تشکیل شده مجدداً با محیط A به حالت تعلیق در آمد و در همان شرایط سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی داخل فالكون دور ریخته شد و رسوب بدست آمده با محیط A مخلوط و سپس محتویات به داخل فلاسک کشت سلول انتقال داده شد و فلاسک‌ها در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و با شرایط رطوبت ۹۵٪ و CO_2 ۵٪ قرار داده شدند. هر ۲-۳ روز محیط کشت فلاسک‌ها با محیط A تازه تعویض، بطوریکه سرم جنینی گاوی (FBS) Fetal Bovine Serum) مورد استفاده در محیط کشت به تدریج به غلظت ۱۰٪ تغییر داده شد.

شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان توسط فلوسایتومتری: برای شناسایی از سلول‌های پاساژ سوم جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. ابتدا شست‌وشو و جداسازی سلول‌های SBM-MSCs (sheep Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) از کف فلاسک با استفاده از آنزیم تریپسین و سپس شمارش سلول‌ها (۱۰۶ سلول در حجم ۱ ml) انجام شد. در مرحله بعد سلول‌های جمع آوری و در دور ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی خارج گردید و ۱۰۰ μl محلول ۱٪ سرم آلبومین گاوی به سلول‌ها اضافه شد. ۳۰-۶۰ دقیقه بعد محلول رویی (سرم آلبومین گاوی) خارج گردید و ۱۰۰ μl محیط کشت و آنتی‌بادی کنژوگه (جدول ۱) به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها برای مدت یک ساعت در دمای اتاق به دور از نور قرار داده شدند. سپس سلول‌ها سه بار با PBS (سانتریفیوژ با دور ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای 4°C) شست‌وشو داده شدند. تمام مراحل برای آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل با همان غلظت آنتی‌بادی‌های اصلی انجام شد. نهایتاً نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACSCanto II (BD Bioscience, USA) قرائت و توسط نرم‌افزار FlowJo نسخه ۷/۶/۱ آنالیز شدند.

ایجاد مدل تجربی سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS): قبل از ایجاد التهاب، علائم حیاتی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، صداهای تنفسی، وجود یا عدم وجود سرفه، وضعیت اشتها، وجود یا عدم وجود ترشحات بینی، وضعیت مخاطات و وضعیت جسمانی در نمونه فرمی که از قبل طراحی شده بود ثبت شد. پس از بیهوشی گوسفندها با کتامین و زایلازین، دام‌ها در موقعیت جناغی قرار داده شدند و لوله نای به داخل نای هدایت که با رفلکس سرفه ورود لوله به داخل نای تأیید می‌شد. در ادامه کاتتر لاواژ (شرکت سوپا) از داخل لوله نای به آرامی تا محل دو شاخه شدن نای هدایت شد. سپس لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتری ایکلای سویه B5:O55 (Sigma-Aldrich) با دوز ۴۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ به آرامی در داخل ریه تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد تمامی علائم حیاتی ذکر شده در بالا مجدداً ثبت شد. همچنین برای بررسی وضعیت پارانشیم ریه و اطمینان از ایجاد



جدول ۱. آنتی‌بادی‌های کثروگه استفاده شده در فلوسایتومتری برای تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان.

نوع آنتی بادی	شماره کاتالوگ	شرکت
PE-conjugated CD۴۵	۱۰۳۱۲۱	Biolegend, Inc
PE-conjugated CD۳۱	Ab۴۶۷۳۳	Abcam, Inc
PE-conjugated CD۴۴	Ab۴۶۷۹۳	Abcam, Inc
PE-conjugated CD۲۹	Ab۳۶۳۱۹	Abcam, Inc

جدول ۲. تشریح اسکور بندی علائم بالینی التهاب حاد ریه در گوسفند.

اسکور بندی	۰	۱	۲	۳	۴
علائم بالینی					
گوش کردن صداهای ریه	طبیعی	-	-	صداهای غیر طبیعی (کراکل، ویز)	-
سرفه	ندارد	سرفه تک	سرفه‌های تکرار شونده غیر ارادی (تحریک رفلکس سرفه)	سرفه‌های تکرار شونده غیر ارادی (بدون تحریک رفلکس سرفه)	-
ترشحات بینی	عدم وجود ترشح	ترشح سروزی	ترشح سروموسی	ترشح موکوپرونت	ترشح پرونت
وضعیت مخاطات	طبیعی	اندکی پر خون	شدیداً پر خون	سیانوتیک	-
اشتها	اشتها طبیعی	اندکی کاهش اشتها (>۵٪)	کاهش اشتها (<۵۰٪)	بی اشتها	-
وضعیت جسمانی	طبیعی (هوشیار و سریع واکنش نشان می‌دهد)	گنگ (dull) (به آهستگی واکنش نشان می‌دهد)	افسرده (depressed) (به طور واضحی به آهستگی واکنش نشان می‌دهد)	از پا افتاده (recumbent) (خوابیده)	-

تنفس ($p=0/018$)، افزایش تعداد ضربان قلب ($p=0/014$)، افزایش دمای بدن ($p=0/001$)، پر خونی مخاطات، ترشحات غیر طبیعی از بینی، کاهش اشتها و غیر طبیعی شدن وضعیت جسمانی همگی تأییدی بر درگیری حاد ریوی بودند. نتایج تصاویر رادیوگرافی نیز نشان دادند ریه‌ها قبل از تزریق LPS کاملاً طبیعی و کنتراست مناسب بین ریه‌های پر از هوا با سایه قلب، عروق منشعب از قلب و عروق ریوی وجود داشت اما ۲۴ ساعت بعد از تزریق LPS الگوی رادیوگرافی غیر طبیعی ریه (الگوی مخلوط با غلبه الگوی آئولولار) دیده شد و روند التهاب کاملاً مشهود بود. افزایش دانسیته در قفسه سینه و کاهش کنتراست به دلیل پر شدن هوای آئولولها توسط مایعات یا بقایای سلولی، کلاپس آئولولها و افزایش ضخامت دیواره برونشها و برونشبولها مشاهده گردید. غالب درگیری‌ها در نواحی خلفی و پشتی ریه که در هر دو نمای عمود بر هم جانبی و شکمی-پشتی مشاهده می‌شدند.

علائم بالینی: الف) بررسی تعداد ضربان قلب، تنفس و درجه حرارت راست روده‌ای: همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود ۲۴ ساعت پس از تزریق LPS افزایش مشخصی در تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و درجه حرارت راست روده‌ای در هر دو گروه (زمان صفر) به وجود آمد که نشان‌دهنده شکل‌گیری التهاب در ریه است. پس از سلول‌درمانی در گروه تیمار از ساعت ۶ روند کاهشی در تعداد ضربان قلب مشاهده شد. این کاهش در تعداد ضربان قلب در روزهای ۱، ۲ و ۳ نسبت به زمان صفر و در مقایسه با زمان‌های مشابه در گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<0/05$).

تعداد تنفس در گروه تیمار از ساعت ۳ پس از تجویز سلول‌های بنیادی روند کاهشی را نشان داد. این کاهش در ساعت ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷

رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان گوسفند در روزهای مختلف به صورت زیر بود: سلول‌هایی که تازه از مغز استخوان جدا شده بودند کروی و همراه با دیگر سلول‌ها شامل سلول‌های هماتوپویتیک و گلبول‌های قرمز بودند. به دلیل خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به تدریج و با تعویض محیط کشت و پاساژ دادن سلول، درصد خلوص آن‌ها بالا رفت و سایر سلول‌ها حذف شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ابتدا زائده دار بودند و سپس ظاهری شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل داشتند بطوریکه بعد از دو هفته، ۹۰-۸۰٪ کف ظرف کشت را سلول‌های دوکی شکل پوشانده بودند که در این مرحله سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. در مطالعه حاضر سلول‌ها بعد از سه پاساژ متوالی مورفولوژی پهن و کشیده و الگوی گردابی داشتند.

تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان توسط فلوسایتومتری: نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها شاخص‌های سطحی سلولی CD۲۹ و CD۴۴ را به ترتیب با فراوانی ۹۱٪ و ۸۹٪ بیان کردند و بیان شاخص‌های CD۴۵ (نشانگر سلول‌های هماتوپویتیک) و CD۳۱ (نشانگر سلول‌های اندوتلیال) منفی بود (۲۱). این نتایج به خوبی مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی را تأیید کردند.

مدل تجربی سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS): نتایج بررسی‌ها یک روز پس از تزریق LPS نسبت به حالت طبیعی نشان دهنده وقوع التهاب حاد بود. تغییر در صداهای تنفسی هنگام معاینات به صورت شنیدن صداهای کراکل و ویز یکطرفه یا دو طرفه، سختی تنفس، وقوع سرفه، افزایش تعداد



جدول ۳. تغییرات تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و دمای راست روده‌ای گوسفند (میانگین±انحراف معیار) در زمان‌های مختلف قبل و بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان/PBS در گروه‌های تیمار و شاهد. * تغییرات معنی‌دار نسبت به زمان صفر در همان گروه. # تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه شاهد در همان زمان.

گروه	زمان (ساعت)	-۲۴	۰	۳	۶	۱۲	۲۴ (روز اول)	۴۸ (روز دوم)	۷۲ (روز سوم)	۱۶۸ (روز هفتم)
تعداد ضربان قلب در دقیقه	تیمار	۸۶/۴±۴/۳*	۱۰۹/۴±۳/۲۸	۱۱۰/±۱۱/۸۳	۱۰۴/۲±۱۲/۱۳	۱۰۰/۸±۱۱/۲۱	۹۵/۰±۱۱/۵۸**	۹۲/۶±۲/۵۰**	۹۲/۶±۴/۰۳**	۹۱/۶±۶/۳۴
شاهد		۸۵/۸±۲/۱۶*	۱۰۷/۸±۴/۶۰	۱۱۰/۲±۵/۵۸	۱۱۰/۴±۶/۲۲	۱۰۷/۲±۵/۸۹	۱۰۷/۸±۴۰/۶۰	۱۰۶/۴±۵/۳۱	۱۰۲/۸±۹/۵۴	۱۰۴/۰±۴/۴۷
تعداد تنفس در دقیقه	تیمار	۲۲/۶±۱/۸۱*	۴۲/۶±۵/۶۸	۴۱/±۵/۰۹	۳۸/۲±۹/۰۹	۳۶/±۴/۸۲*	۳۵/۲±۴/۲۳**	۳۱/۲±۴/۲۰**	۲۹/۰±۳/۹۳**	۲۵/۰±۳/۰۸**
شاهد		۲۲/۲±۲/۱۶*	۴۱/۲±۳/۲۷	۴۰/۶±۳/۲۸	۴۱/۴±۳/۷۸	۴۲/۴±۲/۳۰	۴۱/۸±۷/۵۲	۳۹/۴±۱/۵۱	۳۷/±۱/۵۸	۳۴/۸±۵/۷۱
دمای راست روده‌ای (°C)	تیمار	۳۹/۱۶±۲*	۴۰/۱±۱۴	۴۰/۰۶±۱۶	۳۹/۸۸±۲۵	۳۹/۰۶±۲۴	۳۹/۴۸±۰۴**	۳۹/۲۸±۲۰**	۳۹/۲۸±۲۶**	۳۹/۲۲±۲۲**
شاهد		۳۹/۱±۱۵*	۴۰/۰۶±۲۰	۴۰/۰۸±۲۵	۴۰/۱۴±۱۶	۴۰/۰۸±۱۶	۴۰/۰۲±۵۱	۴۰/۰۸±۱۰	۳۹/۹۴±۰۸	۳۹/۸±۰۷

صداهای ریوی به تدریج کاهش یافت بطوریکه دو روز بعد از پیوند سلول‌ها، صداهای ریوی طبیعی (همانند زمان ۲۴-) و با میانه اسکور صفر بودند و مقایسه آماری نیز نشان داد در گروه تیمار در روزهای ۳ و ۷ نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$).

بهبودی در اشتهای گوسفندها در گروه تیمار از ساعت ۶ با میانه اسکور ۱ آغاز شد، بطوریکه در روز سه اشتهای کاملاً طبیعی با میانه اسکور صفر بود. مقایسه نتایج بین دو گروه نیز حکایت از حضور ارتباطی معنی‌دار در ساعت ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ داشت ($p < 0.05$).

در گروه تیمار ۲۴ ساعت پس از تزریق سلول‌های بنیادی روند کاهشی در ترشحات بینی با میانه اسکور ۲ آغاز شد، بطوریکه پس از یک هفته از پیوند سلول‌ها ترشحاتی از بینی وجود نداشت (همانند زمان ۲۴-) و میانه اسکور صفر بود. مقایسه نتایج بین دو گروه نیز در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$).

بررسی نتایج سرفه نیز نشان داد در گروه تیمار از روز دوم کاهش در تعداد سرفه با میانه اسکور ۲ رخ داده است تا اینکه در روز هفتم سرفه‌ای حتی با تحریک رفلکس وجود نداشت و میانه اسکور صفر بود. مقایسه آماری نیز نشان داد در گروه تیمار در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$).

در گروه تیمار شدت پرخونی ناشی از التهاب، ۴۸ ساعت پس از زمان پیوند سلول‌های بنیادی با میانه اسکور ۱ روند کاهشی را نشان داد و در ساعت ۷۲ به حالت قبل از ایجاد التهاب (زمان ۲۴-) با میانه اسکور صفر بازگشت و در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p < 0.05$).

همچنین سلول درمانی در گروه تیمار سبب شدت تا ۴۸ ساعت بعد از پیوند این سلول‌ها به تدریج رفتار عمومی و وضعیت جسمانی گوسفندها با میانه اسکور ۱ به حالت طبیعی برگردد و در روز سوم درمان کاملاً هوشیاری اولیه خود را بدست آوردند که میانه اسکور صفر بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز نشانگر بازگشت معنی‌دار هوشیاری گوسفندها در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ در

نسبت به زمان صفر معنی‌دار بود که میزان ($p < 0.05$) بود. همچنین نتایج مقایسه بین دو گروه در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$).

همانطور که از جدول ۲ مشاهده می‌شود ۳ ساعت پس از شروع سلول درمانی کاهش دما آغاز شده است. بطوریکه این کاهش دما تا انتهای مطالعه ادامه داشته تا اینکه به سطح پایه برگشته است. این کاهش دمای راست روده در ساعت ۱۲ و روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ در مقایسه با زمان صفر معنی‌دار بود ($p < 0.05$). بررسی آماری بین دو گروه نیز حاکی از معنی‌داری در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۷ بود ($p < 0.05$).

بنابراین نتایج تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و درجه حرارت راست روده‌ای در گروه تیمار نشان‌دهنده تأثیری بسیار مناسب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در کاهش این علائم در مدل تجربی ARDS است. همچنین لازم به ذکر است مقایسه آماری داده‌های ضربان قلب، تنفس و دمای راست روده‌ای در گروه شاهد در زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، که این بیان‌کننده بی‌اثر بودن PBS در کاهش این سه علامت بالینی در گوسفندهای مبتلا به التهاب حاد ریه است.

ب) بررسی صداهای تنفسی، سرفه، اشتهای، ترشحات بینی، مخاطات و وضعیت جسمانی: در معاینات بالینی گوسفندها، قبل از شروع مطالعه در هر دو گروه تیمار و شاهد، صداهای ریوی، اشتهای، مخاطات و وضعیت جسمانی طبیعی بودند و سرفه و ترشحات بینی وجود نداشت و تمامی علائم دارای میانه اسکور صفر بودند اما پس از تزریق LPS (زمان صفر) صداهای ریوی غیرطبیعی شدند که میانه اسکور در هر دو گروه ۳ بود. همچنین در زمان صفر، تغییر در اشتهای، خروج ترشحات از بینی و سرفه در هر دو گروه رخ داد. بطوریکه میانه اسکور برای آن‌ها در هر دو گروه ۲ بود. تغییر رنگ مخاطات و غیر طبیعی شدن وضعیت جسمانی در هر دو گروه در زمان صفر دارای میانه اسکور یک بودند.

۲۴ ساعت بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تغییرات در



مقایسه با گروه شاهد بود ($p < 0.05$).

این درحالی است که در گروه شاهد صداهای ریه و ترشحات بینی تا روز هفتم غیر طبیعی بودند و میانه اسکور برای آن‌ها ۳ بود، وضعیت غیرطبیعی مخاطات و جسمانی گوسفندها و همچنین سرفه تا آخر مطالعه ادامه داشت و از روز سوم به بعد کاهش مختصری در وضعیت این علائم مشاهده شد بطوریکه در پایان روز هفتم میانه اسکور ۲ بود. در مورد وضعیت اشتیهای گوسفندها در گروه کنترل نیز باید گفت اشتیهای آن‌ها هیچگاه به حالت قبل از التهاب (زمان ۲۴-) برنگشت و در میانه اسکور ۱ باقی ماند. این نتایج به خوبی نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (گروه تیمار) برخلاف PBS (گروه شاهد) تأثیر بسیار مثبتی در بهبود علائم بالینی مرتبط با ARDS داشته‌اند.

بحث

بیماری‌های ریوی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در انسان و دام هستند و درمان‌های دارویی فعلی در بسیاری از بیماری‌های ریوی تأثیرگذاری لازم را ندارند (۱۲). در سندرم زجر تنفس حاد (ARDS) درمان دارویی ویژه‌ای وجود ندارد و درمان‌های موجود رویکرد حمایتی دارند. لذا دستیابی به روش‌های درمانی جدید مانند درمان با سلول‌های بنیادی که مطالعه حاضر نیز بر همین اساس پایه‌ریزی شد می‌تواند راه‌حل مناسبی برای درمان این سندرم و دیگر بیماری‌های ریوی باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان در مدل تجربی ARDS در گوسفند به خوبی تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و دمای بدن را بعد از التهاب کاهش می‌دهد و به سطح پایه بر می‌گرداند. همچنین پیوند این سلول‌ها سبب شد تغییراتی که در صداهای تنفسی، اشتیها، مخاطات، وضعیت جسمانی، وقوع سرفه و خروج ترشحات بینی در اثر التهاب ریه ایجاد شده بود، بهبود یافته و به وضعیت قبل از التهاب (زمان ۲۴-) بازگردند. مطالعاتی که محققین در این ارتباط انجام داده‌اند، موید این مطلب است که استراتژی جدید درمانی به کمک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند سبب کاهش قابل توجه در التهاب حاد ریه ناشی از تزریق LPS شود (۱۰).

تاکنون مطالعات کمی بر روی مدل حیوانی بزرگ مثل گوسفند صورت گرفته است (۳) و مشابه مطالعه حاضر که بصورت بالینی و پیوند اتولوگ انجام گرفته است، تاکنون مطالعه‌ای گزارش نشده است. مطالعات پیش بالینی در مدل حیوانی بزرگ دارای کارایی بهتری در مقایسه با جوندگان کوچک دارد (۱۱). تعدادی از محققین بیان کرده‌اند با توجه به ویژگی‌های مدل حیوانی بزرگ (مانند گوسفند) از جمله تبادلات گازی، مانیتورینگ همودینامیک و پذیرفتن تهویه با فشار مثبت مشابه بیماران مبتلا به سندرم دیسترس تنفسی حاد می‌توان از این مدل حیوانی برای مقایسه با بیماران سندرم دیسترس تنفسی حاد انسانی استفاده مناسب کرد که بسیاری از این

ویژگی‌ها را نمی‌توان به سادگی در مدل حیوانی کوچک ایجاد کرد (۳). Rojas و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که پیوند آلوزن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به روش داخل نایی به مدل تجربی ARDS ایجاد شده با LPS باکتری ایکلاوی در گوسفند شدت التهاب را کاهش می‌دهد. آن‌ها همچنین بیان کردند که پیوند سلول‌های بنیادی به روش داخل نایی، فاکتورهای همودینامیکی افزایش یافته در نتیجه التهاب را کاهش می‌دهند و در مطالعه حاضر که پیوند بصورت اتولوگ انجام گرفت سلول‌های بنیادی در روزهای ۱، ۲ و ۳ سبب کاهش معنی‌دار در تعداد ضربان قلب نسبت به گروه شاهد شد (۱۸). در مطالعه دیگری محققین نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به روش داخل وریدی شدت التهاب حاد ریه در مدل گوسفندی که بصورت تجربی دچار پنومونی باکتریایی شده بودند را کاهش می‌دهد. آن‌ها همچنین بیان کردند که پیوند سلول‌های بنیادی سبب کاهش معنی‌دار در تعداد ضربان قلب در مقایسه با گروه شاهد بعد از ۲۴ ساعت می‌شود (۳) که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که نشان داد ۶ ساعت پس از پیوند سلول روند کاهش در تعداد ضربان قلب رخ می‌دهد بطوریکه این کاهش در روزهای ۱، ۲ و ۳ پس از پیوند سلول معنی‌دار بوده است، همخوانی دارد.

با توجه به ماهیت چندقوه‌ای طبیعی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و توانایی آن‌ها برای ترشح عوامل پاراکرین مختلف از قبیل عوامل رشد، فاکتورهای تنظیم کننده نفوذپذیری اندوتلیال و اپیتلیال و سیتوکین‌های ضد التهابی می‌توانند در درمان اختلالات عمده‌ای که زمینه ساز بروز ARDS هستند، مؤثر باشند (۹). حفظ یکپارچگی اندوتلیوم عروق کوچک ریوی برای جلوگیری از نشت مایعات غنی از پروتئین از پلاسما و همچنین سلول‌های التهابی ضروری است تا از وقوع ادم آلوتولی جلوگیری شود. یکی از مکانیسم‌های اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اثرات مؤثر آن‌ها بر روی اندوتلیوم آسیب دیده است. فاکتورهای متعدد پاراکرینی تولید شده توسط این سلول‌ها مثل آنژیوپوئیتین ۱ و عامل رشد کراتینوسیت (KGF) Keratinocyte Growth Factor) بصورت بالقوه بر روی اندوتلیوم آسیب دیده نقش دارند (۸). آنژیوپوئیتین ۱ پیش ماده‌ای برای گیرنده Tei۲ اندوتلیال است که به عنوان محافظت کننده اندوتلیوم و عامل تثبیت کننده عروقی عمل کرده و نفوذپذیری اندوتلیال را کاهش می‌دهد و مانع چسبندگی لکوسیت‌ها به اندوتلیوم و فعل و انفعالات متعاقب آن می‌شوند (۱۵).

در مطالعات دیگر به جهت اینکه بر روی مدل‌های حیوانی کوچک انجام گرفته است وضعیت علائم بالینی مورد توجه قرار نگرفته بود. از این رو به ذکر مواردی که آن‌ها بررسی کرده‌اند پرداخته می‌شود. در مطالعه‌ای محققین بیان کردند تجویز هر دو نوع سیستمیک و داخل ریوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان علی‌رغم



با ترشح آنتاگونیست گیرنده ۱-۱۱ سبب کاهش تجمع کلاژن، فیبروز و متالوپروتئیناز ماتریکس زمینه‌ای می‌شوند (۱۴).

بطور کلی نتایج مطالعات انجام گرفته بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان‌دهنده تأثیر مناسب سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی التهاب ریه بوده بطوریکه پیوند این سلول‌ها از پیشرفت التهاب جلوگیری کرده و سبب بهبودی در بافت ریه شده‌اند. در مطالعه حاضر نیز بررسی علائم بالینی بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مدل تجربی ARDS در گوسفند نشان داد که پیوند این سلول‌ها سبب بهبودی قابل توجه در علائم بالینی می‌شوند که می‌توان گفت نتیجه کاهش التهاب ریه و بهبودی در بافت ریه است.

نتیجه‌گیری: آنچه از مطالعه حاضر می‌توان به آن اشاره نمود آن است که در روند جلوگیری از پیشرفت التهاب تجربی بوسیله LPS باکتری ایکلاهی، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نقش مؤثری دارند، بطوریکه پیوند داخل نایی این سلول‌ها در گوسفند مبتلا به ARDS تجربی سبب بهبودی معنی‌دار در علائم بالینی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، دمای بدن، صداهای تنفسی، وقوع سرفه، پرخونی مخاطات، ترشحات غیر طبیعی از بینی، اشتها و وضعیت جسمانی شد و این علائم همگی در گروه تیمار به حالت قبل از ایجاد التهاب بازگشتند. بنابراین این مطالعه نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان می‌توانند در روند درمان و بهبودی ARDS مؤثر باشند، اگرچه مطالعات بیشتری در این زمینه باید انجام شود تا بتوان روش درمان با سلول‌های بنیادی را به یک روش روتین در درمان بیماری‌های ریوی توصیه کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری صمیمانه کارکنان موسسه تحقیقاتی امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Amrine, D. E., White, B. J., Larson, R., Anderson, D. E., Mosier, D. A., Cernicchiaro, N. (2013) Precision and accuracy of clinical illness scores, compared with pulmonary consolidation scores, in Holstein calves with experimentally induced *Mycoplasma bovis pneumonia*. *Am J Vet Res*. 74: 310-315.
2. Abraham, E. (2003) Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med*. 31: S195-S199.
3. Asmussen, S., Ito, H., Traber, D. L., Lee, J. W., Cox, R. A., Hawkins, H. K., Enkhbaatar, P.

حداقل پیوند سلول‌های بنیادی در ریه منجر به کاهش مرگ‌ومیر، التهاب و بهبود کلیرانس مایع آلوئولی می‌شود. در تجویز سیستمیک سلول‌ها در مویرگ‌های ریوی به دام می‌افتند و اثرات خود را نمایان می‌کنند (۱۷). اما با این حال تجویز داخل نایی سلول‌های مزانشیمی انسانی را در التهاب ریوی ایجاد شده با باکتری ایشریشیا کلاهی در رت نسبت به تجویز داخل وریدی آن ارجح دانستند (۴).

Gupta و همکاران در سال ۲۰۱۲، چهار ساعت بعد از ایجاد التهاب ریه توسط LPS باکتری *E.Coli* در موش، آن‌ها را از طریق پیوند داخل نایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تحت درمان قرار دادند. درصد بهبود گروه درمان در مقایسه با گروه شاهد که تنها PBS دریافت کرده بودند به ترتیب ۸۰٪ در مقابل ۴۲٪ پس از ۴۸ ساعت و ۶۴٪ در مقابل ۱۸٪ بعد از ۷۲ ساعت گزارش شد. آن‌ها بیان کردند سلول‌های بنیادی مزانشیمی شدت آسیب ریه را از طریق کاهش نفوذ مایعات به ریه و کاهش غلظت پروتئین در مایعات برونکوآلوئولار محدود کرده است (۶).

در مطالعه‌ای پژوهشگران بیان کردند که استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بصورت داخل وریدی سبب کاهش التهاب ریه و حفظ یکپارچگی غشاء مویرگی-آلوئولی در موش می‌شوند. آن‌ها نشان دادند که میزان سلول‌های التهابی (خصوصاً نوتروفیل‌ها)، میزان سایتوکین‌ها ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-6) و همچنین میزان پروتئین تام، آلبومین و IgM در مایعات لاواژ شده از ریه کاهش یافته است (۱۰).

Xu و همکاران در سال ۲۰۱۱، LPS را بصورت داخل صفاقی در موش تزریق کردند و یک ساعت بعد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان را بصورت داخل وریدی پیوند زدند. نتایج آن‌ها نشان داد که پیوند این سلول‌ها سبب کاهش التهاب و ادم ریه می‌شوند. بطوریکه سلول‌های التهابی هم بصورت سیستمیک و هم بصورت موضعی کاهش یافته بودند. آن‌ها همچنین نشان دادند که غلظت سرمی $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$ و MIP بعد از پیوند سلول‌های بنیادی کاهش می‌یابند. بررسی هیستولوژی نیز کاهش چشمگیر نوتروفیل‌های ریه را در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پیوند سلول نشان داد (۲۴).

همچنین Krasnodembskaya و همکاران در سال ۲۰۱۰، نشان دادند که ۴ ساعت بعد از ایجاد مدل پنومونی ناشی از *E.Coli* در موش، پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان به روش داخل نایی سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در التهاب ریه (از طریق ارزیابی تعداد نوتروفیل‌های مایع برونکوآلوئولار ریه) می‌شود (۷).

محققین در مطالعه‌ای، از طریق تزریق LPS باکتری ایکلاهی در موش، التهاب ریه ایجاد و نشان دادند استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش داخل وریدی از طریق ترشح آنژیوپوتئین و عامل رشد کراتینوسیت، موجب بازبانی نفوذپذیری اندوتلیال عروق آلوئولی می‌شوند (۱۰). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان همچنین



- (2014) Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. *Thorax*. 69: 819-825.
4. Devaney, J., Horie, S., Masterson, C., Elliman, S., Barry, F., O'Brien, T., Laffey, J. G. (2015) Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by *E. coli* in the rat. *Thorax*. 70: 1468-3296.
 5. Doyonnas, R., LaBarge, M. A., Sacco, A., Charlton, C., Blau, H. M. (2004) Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 13507-12.
 6. Gupta, N., Su, X., Popov, B., Lee, J. W., Serikov, V., Matthay, M. A. (2012) Intra-pulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol*. 179: 1855-1563.
 7. Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J. W., Matthay, M. A. (2010) Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. *Stem Cells*. 28: 2229-2238.
 8. Kwak, H. J., So, J. N., Lee, S. J., Kim, I., Koh, G. Y. (1999) Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett*. 448: 249-253.
 9. Lee, J. W., Fang X. Fau., Gupta, N., Serikov, V., Matthay, M. A. (2009) Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 16357-16362.
 10. Mei, S. H. J., McCarter, S. D., Deng, Y., Parker, C. H., Liles, W. C., Stewart, D. J. (2007) Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med*. 4: 1525-1537.
 11. Moodley, Y., Sturm, M., Shaw, K., Shimbori, C., Tan, D. B., Kolb, M., Graham, R. (2016) Human mesenchymal stem cells attenuate early damage in a ventilated pig model of acute lung injury. *Stem Cell Res*. 17: 25-31.
 12. Mokhber Dezfouli, M. R., Sadeghian Chaleshtori, S., Dehghan, M. M., Tavanaeimanesh, H., Baharvand, H., Tahamtani, Y. (2017) The therapeutic potential of differentiated lung cells from embryonic stem cells in lung diseases. *Cur Stem Cell Res & Ther*. 12: 80-84.
 13. Mokhber Dezfouli, M. R., Lotfollahzadeh, S., Heidari Sureshjani, M., Dehghan, M. M., Nikbakht, Gh. R., Eftekhari, Z., Tavanaeimanesh, H., Sadeghian Chaleshtori, S., Jani, M., Arab Yarmohammadi, M. (2017) Changes in clinical signs after treatment in calves with experimental colisepticemia with *Escherichia coli*. *J Vet Res*. 72: 63-71.
 14. Ortiz, L., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A. C., Torres, G., Go, K., Phinney, D. G. (2007) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 11002-11007.
 15. Pizurki, L., Zhou, Z., Glynos, K., Roussos, C., Papapetropoulos, A. (2003) Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol*. 139: 329-336
 16. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. (2007) *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed.) Elsevier Health Sciences, Philadelphia, USA. p. 847-89.
 17. Rojas, M., Xu J., Woods, C. R., Mora, A. L., Spears, W., Roman, J., Brigham, K. L. (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33: 1445-152.
 18. Mauricio, R., Nayra, C., Ergin, K., John, R. T., Eder, C., Robert, D., Anthony, T., Christian, B. (2014) Human adult bone marrow-derived stem cells decrease severity of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in sheep. *Stem Cell Res & Ther*. 5: 42-55.
 19. Rubenfeld, G. D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D. P., Neff, M., Hudson, L. D. (2005) Incidence and outcomes of acute lung injury. *New England Journal of Medicine*. 353:



- 1685-1693.
20. Sadeghian Chaleshtori, S., Mokhber Dezfouli, M. R., Dehghan, M. M., Tavanaeimanesh, H. (2016) Generation of Lung and Airway Epithelial Cells from Embryonic Stem Cells In Vitro. *Criti Rev in Eukar Gene Expr.* 26: 1-9.
 21. Tagami, T., Kushimoto, S., Tosa, R., Omura, M., Yonezawa, K., Akiyama, G., Hiramata, H., Yokota, H. (2011) Plasma neutrophil elastase correlates with pulmonary vascular permeability: a prospective observational study in patients with pneumonia. *Respiro.* 16: 953-958.
 22. Volk, S. W., Theoret, C. (2013) Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Journal of Reproductive Medicine.* 21: 382-394.
 23. Xu, J., Woods, C., Mora, A. L., Mora, A., Joodi, R., Brigham, K. L., Iyer, S., Rojas, M. (2007) Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology.* 293: 131-141.



Improvement of Clinical Signs in Experimental Model of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) in Sheep Following Autograft of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs)

Abbasi, J.¹, Mokhber Dezfouli, M.R.^{1,3}, Sadeghian Chaleshtori, S.^{1,3*}, Dehghan, M.M.^{2,3}, Vajhi, A.^{2,3}, Baharvand, H.^{4,5}, Ghanei, M.⁶, Jabari Fakhri, M.^{7,3}

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³Institute of Biomedical Research, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

⁵Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran.

⁶Health Management Research Centre, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷Graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received 29 November 2017, Accepted 26 February 2018)

Abstract:

BACKGROUND: ARDS is a lung disorder that causes death in human and livestock and new therapeutic approaches such as stem cell therapy are essential because of lack of specific drug therapies for it. **OBJECTIVES:** Evaluation of the therapeutic effects of intrapulmonary transplantation of BM-MSCs to improve clinical signs in experimental model of ARDS created by lipopolysaccharide(LPS) *E.Coli* strains-O55:B5 in sheep is the aim of this study. **METHODS:** In this study, 10 male sheep 3-4 months old were used after random placement into two groups, treatment and control. Of sheep in the treatment group, after anesthesia with ketamine and xylazine bone marrow samples were collected and in the clean room BM-MSCs were isolated, amplified and were identified with the evaluation of surface markers. Then experimental model of ARDS was induced by endotracheal injection of LPS at dose of 400 µg/kg. Clinical signs and radiograph images were performed before and 24 hours after injection of LPS. After confirming inflammation, the sheep were anesthetized and on sternal position 50×10⁶ cells of BM-MSCs third passage were transferred in treatment group as autograft by the catheter lavage in the bifurcation of the trachea and PBS in control group. Then clinical signs were recorded at 3, 6 and 12h and on days 1, 2, 3 and 7 in both groups, and finally were analyzed based on the scored system. **RESULTS:** The data showed transplantation of BM-MSCs caused significant improvement in clinical signs including heart rate, respiratory rate, body temperature, respiratory sounds, cough, mucosal status, nasal secretions, appetite and physical condition compared with control group. A significant decrease in respiratory rate and body temperature from 12 h and in heart rate from 24 h to next was begun. Also, changes in breathing sounds on the first day after transplantation, physical condition, mucous membranes and appetite on the third day, the occurrence of cough and abnormal discharge from the nose on the seventh day had returned to pre-inflammation (-24 time) and the median score was zero for them. **CONCLUSIONS:** This study showed that transplantation of BM-MSCs can improve and cause reduction in the severity of the clinical signs of ARDS, significantly.

Keyword: ARDS, BM-MSCs, clinical signs, stem cell therapy, sheep

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Conjugated antibodies used in flow cytometry to confirm bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs).

Table 2. Explain score for clinical signs of acute inflammation of the lungs in sheep.

Table 3. Changes in heart rate, respiration rate and rectal temperature of sheep (mean±SD) at various times before and after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells/PBS in groups of treatment and control.

*Corresponding author's email: s.sadeghian@ut.ac.ir, Tel: 021-61117000, Fax: 021-66933222

