

بررسی تأثیر سلول‌های بنیادین اتولوگ با منشأ سلول‌های منوکلتر خون محیطی (CD34) در بهبود زخم پای دیابتی و جلوگیری از آمپوتاسیون اندام

لیلا محمدزاده^۱، اعظم کشاورزی^۲، سید حسین صمدانی فرد^۱، ابوالفضل شجاعی فرد، کامران علی مقدم^۳، محمدرضا امینی^۲، سیده حمیده فخرایی^۴، اردشیر قوام‌زاده^۲، محمدرضا استادعلی^۲، علی شهریار احمدی^۱، باقر لاریجانی^۱، ارمغان فرد اصفهانی^۱، اشرف ملک محمدی^۳، مریم اعلاء^۲، محمدرضا مهاجری تهرانی^{۲*}

چکیده

مقدمه: چندین مطالعه به صورت مداخله‌ای نشان داده که سلول‌های بنیادین حاصل از آسپیراسیون مغز استخوان یا سلول‌های منونوکلتر خون محیطی (CD34) می‌توانند منجر به آنژیوژنز و بهبود فعالیت بافتی در بافت ایسکمیک شده و به بهبود زخم کمک کنند اما نتایج آنها ضد و نقیض بوده، لذا ما تصمیم گرفتیم تحقیق حاضر را با نمونه بیشتر انجام دهیم. **روش‌ها:** در این روش سلول‌های بنیادین گرفته شده از خون محیطی تحریک شده با فاکتور کلونی محرک گرانولوسیت (G-CSF) به ۷ بیمار مبتلا به زخم پای دیابتی تزریق گردید و ۱۴ بیمار به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که ۳ ماه بعد هر دو گروه از نظر اندازه و بهبود زخم و کاهش درد و برقراری مجدد نبض و میزان آمپوتاسیون و عوارض ناشی از سلول‌های بنیادین مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در گروه مورد، خون‌رسانی بافتی نسبت به گروه شاهد بهتر شده است که این مساله با بهبود ABI ($P=0/035$) و برقراری مجدد نبض ($P=0/01$) تفاوت معنی‌داری داشته و میزان آمپوتاسیون ماژور (بالای مچ پا) در گروه شاهد ۷ نفر از ۱۴ نفر بوده اما در گروه مورد در طی سه ماه آمپوتاسیون ماژور دیده نشد ($P=0/04$). همین‌طور درد ناشی از ایسکیمی اندام در گروه مورد در طی سه ماه کاهش بارزی نسبت به گروه شاهد داشت ($P=0/01$).

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر نشان داد که تزریق سلول‌های بنیادین گرفته شده از خون محیطی در بهبود زخم پای دیابتی مؤثر بوده و در بهبود خون‌رسانی به اندام مبتلا کمک کننده است و از آمپوتاسیون اندام جلوگیری می‌کند.

واژگان کلیدی: ایسکیمی شدید اندام، سلول‌های بنیادین، زخم پای دیابتی

۱- بیمارستان رسول اکرم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- مرکز تحقیقات خون و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- بیمارستان دکتر شریعتی، مرکز تحقیقات پزشکی هسته‌ای، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: mr.mohajeri@tums.ac.ir

مقدمه

ایسکیمی شدید اندام تحتانی حالتی است که در آن جریان خون اندام کاهش می‌یابد و منجر به زخم می‌گردد و اگر اقدامات جراحی و آنژیوپلاستی موفق به بهبود خون‌رسانی نشوند، معمولاً به آمپوتاسیون اندام منجر می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌های بنیادین می‌توانند منجر به بهبود فعالیت بافتی و آنژیوژنز در بافت ایسکمیک شده و به بهبود زخم کمک کنند [۲،۱]. سلول‌های پروژنیاتور اندوتلیال EPCs نقش ترمیم عروقی در اختلالات مختلف مثل سکنه قلبی و ایسکمی اندام و دیابت دارند. این سلول‌ها در تشکیل عروق جدید و شکل‌دهی به آنها در بالغین نقش مهمی دارند. این کار با چند مکانیزم انجام می‌شود:

۱- تبدیل شدن سلول‌های پروژنیاتور اندوتلیال EPCs به سلول‌های اندوتلیال
 ۲- ترشح سیتوکین‌ها که باعث تغییر فضای اطراف عروقی می‌شود.

سلول‌های EPCs واقع در گردش خون به صورت سلول‌های پرکورسور CD34 و CD133 عمل می‌کنند [۳]. در پاسخ به آسیب بافتی پرولیفراسیون و مهاجرت و تشکیل عروق جدید اتفاق می‌افتد که در بیماران دیابتی سلول‌های پروژنیاتور اندوتلیال ۱ (EPCs) از نظر تکثیر و چسبندگی و تشکیل ساختار عروقی دچار آسیب شده‌اند که سلول‌های بنیادین استخراج شده از مغز استخوان یا خون محیطی می‌تواند به نئواسکولاریزاسیون به دنبال آسیب ایسکمیک در بیماران دیابتی کمک کند [۴]. سلول‌های بنیادین بالغین می‌توانند به استخوان، عضله، تاندون، چربی و سایر بافت‌های همبند تبدیل شوند و می‌توانند در بافت‌های آسیب‌دیده جهت بازسازی مجدد مورد استفاده قرار گیرند [۵].

سلول‌های بنیادین خون‌ساز در خون محیطی گردش می‌کنند ولی غلظت آنها بسیار کم است پس از تجویز برخی عوامل محرک خون‌سازی مثل عامل محرک کلونی گرانولوسیت G-CSF غلظت سلول‌های پیش‌ساز خونی به مقدار زیاد افزایش می‌یابد. این امر برداشت نمودن تعداد کافی سلول‌های بنیادین از خون محیطی را به منظور پیوند

امکان‌پذیر می‌کند به این منظور فرد به مدت ۴ تا ۵ روز با عامل رشد خون‌ساز G-CSF یک آمپول ۳۰۰ میکروگرم در روز درمان می‌شود و پس از آن سلول‌های بنیادین در یک جلسه ۴ ساعته به وسیله لکوفرز^۱ جمع‌آوری می‌شود [۶].

این سلول‌ها یا از اسپیراسیون مغز استخوان از خار خاصره خلفی لگن بدست آمده و بعد از سانتریفوژ در آزمایشگاه کشت داده شده و به صورت داخل رگ یا در محل مورد نظر مثل پوست، دستگاه گوارش یا عضله تزریق شده و منجر به ترمیم بافت‌های مورد نظر می‌شوند یا می‌توانند از سلول‌های منوکلونال خون محیطی تحریک شده با فاکتور رشد کلونی گرانولوسیت باشند که در پیوند اتولوگ به عنوان منشأ سلول‌های بنیادین مورد استفاده قرار گیرند [۷]. کارآزمایی‌های بالینی با عوامل رشد آنژیوژنیک در حال پیشرفت هستند. انتقال ژنی داخل عضلانی که فاکتور رشد اندوتلیوم عروق، فاکتور رشد پایه فیبروبلاست، فاکتور رشد هپاتوسیت و فاکتور آلفا القا شونده با هیپوکسی را رمزدهی می‌کند و نیز تزریق سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیوم ممکن است سبب پیشبرد رشد عروق جانبی در مبتلایان به ایسکمی بحرانی اندام شود [۸].

مطالعات انجام شده قبلی بیشتر به صورت مداخله‌ای بوده در حالی که علاوه بر مقایسه قبل و بعد از سلول درمانی در تحقیق حاضر بیماران تحت درمان با سلول بنیادی با گروه کنترل از نظر متغیرهای مطالعه مقایسه شدند.

روش‌ها

این مطالعه به صورت مداخله‌ای و مورد-شاهدی از آذر ماه سال ۱۳۸۷ تا آذر ماه سال ۱۳۸۹ با انتخاب ۴۸ بیمار متناسب با معیارهای طرح که از میان بیماران مراجعه کننده به درمانگاه مرکز دیابت و بیماران بستری شده در بیمارستان‌های شریعتی و رسول اکرم (ص) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. از بین این افراد ۲۱ بیمار بطور تصادفی و با توجه به شرایط موجود از بین افراد داوطلب و آنهایی که رضایت به انجام طرح داشتند و تمایل به آنژیوگرافی نداشتند، انتخاب شده که از بین آنها ۷ بیمار تحت درمان با سلول‌های بنیادین قرار گرفتند و

سلول‌های CD34 که برای بیماران پای دیابتی تزریق گردید ۸۰ میلیون سلول بود. این سلول‌ها یک روز در دمای 4°C - ۲ نگهداری شده، روز بعد سلول‌های فوق در اتاق عمل بعد از بی‌حسی ایتراتکال و استریل کردن محل به پای بیمار تزریق گردید. تزریق سلول به ۶۰ محل به فاصله سه در سه سانتی‌متر به عمق ۱/۵ سانتی‌متر صورت گرفت و به مدت سه ماه، پیگیری از نظر اندازه زخم، بهبود خون‌رسانی و ترمیم زخم و اقدامات جراحی مورد نیاز یا عوارض احتمالی ناشی از زخم یا عوارض درمان انجام شد.

غربالگری بیماری شریان محیطی (PAD) با استفاده از اندکس مچ پا-بازویی (ABI) و سونوگرافی داپلر و CT آنژیوگرافی و معاینه نبض انجام شد. نحوه انجام ABI به این ترتیب بود که ابتدا فشار سیستولیک در دست‌ها با استفاده از سونوگرافی داپلر اندازه‌گیری و میانگین آنرا به عنوان فشار اصلی دست ثبت می‌شود. سپس فشار سیستولیک در مچ پا اندازه‌گیری و از فرمول زیر ABI محاسبه گردد [۹]:

$$ABI = \frac{\text{بالاترین میانگین متوسط فشار در مچ پا}}{\text{بالاترین میانگین متوسط فشار در دست}}$$

ABI کمتر از ۰/۹ در حالت استراحت غیر طبیعی تلقی می‌شود. مقادیر کمتر نشان دهنده بیماری انسدادی عروق محیطی PDA شدیدتر و لنگش متناوب ناتوان کننده است. از تمام بیماران عکس گرفته شده و با خط‌کش مندرج سایز زخم مشخص و با نرم‌افزار osairis سطح زخم تعیین گردیده است تا قبل و بعد از درمان و در گروه مورد شاهد مقایسه شود.

بررسی وضعیت نورولوژیک پای بیمار دیابتی در افراد کم‌خطر با استفاده از مونوفیلانمان ۱۰ گرم صورت گرفت. در این تست مونوفیلانمان ۱۰ گرم در ده نقطه پا تماس داده می‌شود و در صورتی که توسط بیمار حس نشود، حس محافظتی بیمار مختل تلقی می‌شود. در این تست نسبت تعداد محلی که بیمار از ده نقطه معاینه حس می‌کند، سنجیده می‌شود. بررسی اولیه عروق محیطی پای بیمار دیابتی شامل شرح حال وجود لنگیدن و بررسی نبض‌های دور سالیس پدیس و تیبیالیس پوسترینور و پوپلیتئال و

متناسب با آن ۱۴ بیمار وارد گروه شاهد شد. بیماران وارد شده به گروه کنترل از نظر درجه زخم بر اساس تقسیم‌بندی واگنر (دو تا چهار) مشابه گروه مورد انتخاب شدند (یعنی Random Allocation صورت گرفته و امکان دو سویه کور کردن وجود نداشت).

معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از: افراد بین ۷۵-۱۸ سال، زخم ایسکمیک اندام تحتانی بر اساس یافته‌های CT آنژیوگرافی عروق اندام تحتانی (معیار شاخص قطع ناگهانی مسیر رگ در عروق دور سالیس پدیس و تیبیالیس پوسترینور و بیمارانی که از آنژیوپلاستی سود نمی‌برند یا آنژیوپلاستی در آنها با شکست مواجه شده بود)، ABI کمتر از ۰/۰۹، زخم پای دیابتی که بر حسب درجه‌بندی واگنر دو تا چهار باشد و بیمارانی که انتظار می‌رفت همکاری لازم جهت ادامه طرح را داشته باشند.

معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: افراد زیر ۱۸ سال و بالای ۷۵ سال، وجود عفونت فراگیر، EPCs: Endothelial Progenitor Cells Leukaphresis سابقه، سکته مغزی و سکته قلبی در سه ماه گذشته، بیماری کلیوی با کراتینین $\leq 2/5 \text{ mg/dl}$ ، نارسایی قلبی شدید (بر اساس اکوکاردیوگرافی کسر جهشی کمتر از ۴۰٪)، حاملگی و شیردهی، آلرژی شدید، مصرف داروهای ایمنوساپرسیو، اختلال انعقادی و سابقه تنگی نفس حاد و شدید.

ابتدا بیماران در دو گروه مورد یا شاهد قرار گرفتند و سپس هر دو گروه بیماران از نظر درجه‌بندی و سایز و عمق زخم و نحوه خون‌رسانی بافتی بر اساس ABI و سونوگرافی داپلر و نبض اندام‌ها و علائم نوروپاتی و واسکلوپاتی بر اساس CT آنژیوگرافی و آزمایشات و گرافی لازم مورد بررسی واقع شده و در صورت نیاز تحت درمان با آنتی‌بیوتیک وریدی یا خوراکی و دبریدمان کافی قرار گرفتند. سپس برای گروه مورد درمان با سلول‌های بنیادین انجام شد بدین ترتیب که بیماران (هم گروه مورد و هم گروه شاهد) به مدت ۵ روز تحت درمان با G-CSF (PDgrastim®) قرار گرفته سپس در روز پنجم خون بیمار ۴ ساعت در دستگاه Cell Separator بنام Cobe spectra با سرعت ۴۰-۵۰ ml/min جریان یافته و ۱۰۰ میلی‌لیتر خون حاوی CD34 بعد از سانتریفوژ جدا گردید، تعداد

از بین ۲۱ بیمار مورد ارزیابی، ۷ بیمار (۳۳/۳٪) تحت درمان سلول‌های بنیادین خون محیطی تحریک شده با G-CSF و ۱۴ بیمار (۶۶/۷٪) تحت درمان حمایتی G-CSF و در گروه کنترل قرار گرفتند.

مقایسه اطلاعات دموگرافیک بین دو گروه

در این مطالعه اطلاعات دموگرافیک از جمله سن بیماران، مدت دیابت، مدت زخم و... در زمان بستری و شروع درمان در دو گروه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

ارتباط در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبوده است. میانگین سن بیماران در گروه مورد ۷/۸ ± ۶۳/۵ سال و در گروه کنترل ۷/۸ ± ۶۴/۲ سال بود که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت (P=۰/۸۴).

از نظر مدت زمان دیابت نیز، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد (P=۰/۵۷). میانگین مدت بیماری دیابت در گروه بیمار ۸/۷ ± ۱۶/۵ ماه و در گروه کنترل ۸/۵ ± ۱۴/۲ ماه بدست آمد. همچنین در مورد مدت زخم در دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P=۰/۳۳) (جدول ۲).

فمورال می‌باشد. رتبه‌بندی نبض به صورت زیر می‌باشد: عدد صفر برای نبض غیر قابل لمس، عدد یک برای نبض کاهش یافته و عدد دو برای نبض طبیعی.

اطلاعات مربوط به بیماران قبل و بعد از انجام اقدامات فوق، تحت تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ قرار گرفت. آزمون t-test برای مقایسه متغیرهای کمی به کار گرفته شد. آنالیز تمام متغیرهای کیفی با آزمون Chi-square انجام گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۲۱ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران ۷/۶ ± ۶۴/۰۴ سال و محدوده سنی آنها بین ۵۳ تا ۷۵ سال بود. فراوانی جنسی بیماران در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جنس بیماران	تعداد	درصد
مردان	۱۶	۷۶/۲
زنان	۵	۲۳/۸
جمع	۲۱	۱۰۰٪

جدول ۲- مشخصات دموگرافیک بیماران قبل از دریافت سلول‌های بنیادین

مشخصات	گروه مورد (تعداد ۷ بیمار)	گروه شاهد (تعداد ۱۴ بیمار)
متوسط سن (سال)	۶۳/۵ ± ۷/۸	۶۴/۲ ± ۷/۸
طول مدت دیابت (سال)	۱۶/۵ ± ۸/۷	۱۴/۲ ± ۸/۵
درجه نوروپاتی (اسکور میشیگان)	۴/۸ ± ۲/۰	۵/۵ ± ۱/۹
مدت ابتلا به زخم (ماه)	۵ ± ۳/۹	۳/۴ ± ۳/۰
اندازه زخم (Cm ²)	۸/۹ ± ۵/۹	۷/۴ ± ۴/۴
درجه زخم بر حسب درجه‌بندی واگنر	۲/۸ ± ۰/۸	۲/۹ ± ۰/۷
هموگلوبین (Mg/dl)	۱۱/۵ ± ۱/۲	۱۱/۶ ± ۱/۵
کراتینین (ml/min)	۱/۱ ± ۰/۰۱	۱/۲ ± ۰/۰۲
معاینه با منوفیلمان	۰/۶ ± ۰/۲	۰/۵ ± ۰/۲
مصرف سیگار	٪۱۴/۳	٪۱۴/۳
سابقه CVA	٪۴/۸	٪۴/۸
هایپر لیپیدمی	٪۲۳/۸	٪۲۸/۶
پرفشاری خون	٪۲۳/۸	٪۲۸/۶
رتینوپاتی	٪۹/۵	٪۱۴/۳

نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار و درصد بیان شده است. نوع مطالعه: مداخله‌ای

گروه مشاهده نشد (بترتیب $P=0/61$ و $P=1$) (جدول ۲). همچنین در این مطالعه، دو گروه مورد بررسی از نظر سابقه رتینوپاتی، سابقه HLP, HTN نیز از نظر آماری یکسان و مشابه بودند (به ترتیب $P=1$ و $P=0/36$, $P=0/36$) (جدول ۲). بر اساس داده‌های جدول ۲ عواملی مثل هموگلوبین، کراتینین، میزان نوروپاتی، مصرف سیگار، مدت ایجاد زخم و درجه زخم که می‌توانند بر بهبود زخم تأثیر بگذارند در دو گروه تفاوت معنی‌داری ندارند یعنی همانندسازی صورت گرفته است.

میانگین امتیاز نوروپاتی در گروه مورد $2/02 \pm 4/8$ و در گروه کنترل $1/9 \pm 5/5$ بود و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/46$). در مورد فراوانی افراد سیگاری در دو گروه مورد مطالعه، $42/9\%$ بیماران در گروه مورد و $21/4\%$ بیماران در گروه کنترل سیگاری بودند. با وجود بالاتر بودن فراوانی افراد سیگاری در گروه مورد نسبت به گروه کنترل، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/34$). در مورد سابقه IHD و سابقه CVA، نیز تفاوت معنی‌داری بین دو

جدول ۳- مقایسه میانگین ساینز زخم، تست مونوفیلان، اندکس ABI و درجه‌بندی واکنر در دو گروه مورد بررسی قبل و بعد از درمان

متغیرها	گروه مورد	گروه کنترل
اندازه زخم قبل از درمان (cm)	$8/1 \pm 5/9$	$4/7 \pm 4/4$
اندازه زخم سه ماه بعد از درمان (cm)	$6/4 \pm 3/9$	$6/7 \pm 5/5$
تست مونوفیلان قبل از درمان	$0/6 \pm 0/2$	$0/5 \pm 0/2$
تست مونوفیلان سه ماه بعد از درمان	$0/8 \pm 0/1$	$0/6 \pm 0/2$
اندکس ABI قبل از درمان	$0/89 \pm 0/26$	$0/72 \pm 0/3$
اندکس ABI سه ماه بعد از درمان	$0/92 \pm 0/15$	$0/65 \pm 0/25$

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار و درصد بیان شده است. نوع مطالعه: مداخله‌ای
تعداد گروه مورد ۷ بیمار و تعداد گروه شاهد ۱۴ بیمار

میانگین اندازه زخم پای بیماران، پس از درمان در گروه مورد، $3/9 \pm 6/4$ سانتی‌متر و در گروه کنترل $4/7 \pm 5/4$ سانتی‌متر بدست آمد. با وجود تفاوت اندازه زخم در گروه مورد و گروه کنترل، این میزان تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/92$). در مورد اندازه زخم، در گروه بیماران تحت درمان با سلول‌های بنیادین، از $8/1 \pm 5/9$ سانتی‌متر قبل از درمان به $6/4 \pm 5/9$ سانتی‌متر بعد از درمان تقلیل یافت که باتوجه به این میزان کاهش در اندازه زخم در گروه مورد نسبت به گروه شاهد مشاهده شده ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/46$).

در گروه مورد $4/7 \pm 4/4$ سانتی‌متر قبل از درمان به $6/7 \pm 5/4$ سانتی‌متر بعد از درمان رسید

درمان نیز، علی‌رغم بالاتر بودن میانگین امتیازات در گروه مورد $0/8 \pm 0/1$ در برابر $0/6 \pm 0/2$ در گروه کنترل، از نظر تأثیر سلول بنیادی بر نوروپاتی به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/14$).

در مورد اندکس ABI انجام شده بعد از درمان، در گروه مورد، میانگین آن $0/15 \pm 0/92$ و در گروه کنترل $0/25 \pm 0/65$ بدست آمد که از نظر آماری میانگین ABI بعد از درمان در گروه مورد بطور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0/03$) (جدول ۳).

درمان نیز، علی‌رغم بالاتر بودن میانگین امتیازات در گروه مورد $0/8 \pm 0/1$ در برابر $0/6 \pm 0/2$ در گروه کنترل، از نظر تأثیر سلول بنیادی بر نوروپاتی به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/14$).

در مورد اندکس ABI انجام شده بعد از درمان، در گروه مورد، میانگین آن $0/15 \pm 0/92$ و در گروه کنترل $0/25 \pm 0/65$ بدست آمد که از نظر آماری میانگین ABI بعد از درمان در گروه مورد بطور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0/03$) (جدول ۳).

جدول ۴- نتایج ۳ ماه بعد از دریافت سلول‌های بنیادین و پیگیری بیماران هر دو گروه

گروه شاهد n=۱۴	گروه مورد n=۷	
۷ (%۵۰)	۰ (%۰)	آمپوتاسیون مازور
۴ (%۲۸/۶)	۶ (%۸۵/۷)	بهبودی در راه رفتن
۳ (%۲۱/۴)	۷ (%۱۰۰)	بهبود نبض

نتایج بصورت میانگین \pm انحراف معیار و (درصد) تعداد بیان شده است. نوع مطالعه: مداخله‌ای ارتباط در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بوده است.

مشاهده شد. ($P=۰/۰۴$). در مورد بهبودی در راه رفتن پس از درمان، در گروه مورد، ۸۵/۷٪ بیماران و در گروه کنترل ۲۸/۶ \pm بیماران بهبودی در راه رفتن داشتند که در گروه مورد بطور معنی‌داری این میزان بالاتر بود ($P=۰/۰۲$) (جدول ۴).

پس از درمان بیماران، در تمامی بیماران گروه مورد نبض مجدد برقرار شد در حالی که در گروه کنترل فقط ۲۱/۴٪ برقراری نبض مجدد برقرار شد که این میزان تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P=۰/۰۱$). فراوانی آمپوتاسیون مازور در گروه مورد صفر درصد و در گروه کنترل ۵۰٪ بود (جدول ۱۰). از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه

بحث

براساس یافته‌های مطالعه حاضر سلول‌های بنیادین منونوکلیر تحریک شده با G-CSF باعث بهبودی در ایسکیمی اندام در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی می‌شوند.

هیچ عارضه جانبی به غیر از اریتم مختصر محل تزریق به دنبال تزریق سلول‌های بنیادین مشاهده نشد که آن هم طی چند روز اول بهبود یافت. در مطالعات مختلف عارضه خاصی ناشی از تزریق سلول بنیادین در پای دیابتی گزارش نشده است [۴، ۱۰]. در اولین بیمار طرح، بعد از دو سال احساس سردی پاها بهبود یافته و موهای ریخته شده دوباره رشد کرده و عارضه خاصی در این مدت وجود نداشت که این مساله در CT آنژیوگرافی وی مشهود بود.

ما برای هر دو گروه G-CSF تجویز کردیم چون برخی مطالعات نشان داده که G-CSF به تنهایی در بهبود زخم اسکیمیک با تحریک مهاجرت سلول‌های پروژنیاتور اندوتلیال به خون محیطی مؤثر است [۵].

چندین مطالعه آینده‌نگر بر روی ۱۶۷ بیمار که با استفاده از G-CSF درمان شده بودند نشان داد که این روش میزان عفونت زخم را کمتر نمی‌کند ولی نیاز به اقدامات جراحی و نیاز به آمپوتاسیون را کمتر می‌کند، این مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که G-CSF باید در بیماران زخم پای دیابتی به

ویژه آنهایی که در معرض خطر از دست دادن اندام به علت عفونت هستند استفاده شود [۱۱].

یک تحقیق توسط Burt و همکاران در دانشگاه شیکاگو بر روی ۹ بیمار با ایسکمی بحرانی پا انجام شده که در آن تزریق سلول‌های بنیادین از خون محیطی به وسیله روش تحریک با G-CSF به صورت عضلانی به عضله گاستروکنمیوس و سولئوس باعث جلوگیری از آمپوتاسیون پا در هفت بیمار از ۹ نفر شده است. علایم زخم در سه ماه بهبود پیدا کرده ($P=۰/۰۲$) و تا شش ماه بهتر هم شده ($P=۰/۰۱$) ولی در یکسال رو به کاهش گذاشته است ($P=۰/۰۸$) [۱۰]. مطالعه دیگر توسط Madeddu نشان داد استفاده از سلول‌های بنیادین می‌تواند منجر به بهبود زخم دیابتیک شود لیکن نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد [۱۲].

همچنین در یک کارآزمایی بالینی دوسوکور، سلول‌های مزانشیمال آسپیره شده از مغز استخوان به عضلات پای دارای زخم تزریق شده و همه بیماران به مدت ۳ ماه تحت پیگیری قرار داشتند و مراقبت لازم از نظر کنترل قند خون، فشار خون، چربی خون، دبریدمان زخم و آنتی بیوتیک درمانی لازم را دریافت کردند (در مقایسه با گروه کنترل که فقط تحت درمان فوق بدون درمان سلول‌های بنیادین قرار گرفته بودند)، تأثیر مثبت سلول‌های بنیادین بر زخم پا از

در مقایسه بین روش اسپیراسیون سلول بنیادین از مغز استخوان و بدست آوردن سلول‌های بنیادین از خون محیطی به وسیله روش تحریک با G-CSF، استفاده از روش سلول‌های بنیادین خون محیطی آسان‌تر و سریع‌تر از روش اسپیراسیون مغز استخوان بوده و حتی نتایج بهتر از آن داشته، بدون اینکه خطر عوارض را بیشتر کند [۱۵]. مقایسه نتایج مطالعه حاضر و چندین مطالعه مشابه دیگر در جدول ۵ خلاصه شده است.

نظر بهبود زخم و بهبود خون‌رسانی بعد از ۳ ماه با ($P < 0/005$) گزارش شد [۱۳]. در تحقیق دیگر، بطور تصادفی از ۳۶ بیمار بستری شده به علت پای دیابتی، ۱۲ بیمار انتخاب و از سلول‌های بنیادین خون محیطی استفاده شده بود. تشکیل عروق جدید و بهبود پای دیابتی بطور بارز دیده شد که این موارد با ABI index و آنژیوگرافی عروق و TCPO₂ تأیید گردید [۱۴].

جدول ۵- مقایسه نتایج چند مطالعه مشابه [۱۰، ۱۶]

نویسندگان	تعداد بیمار	نوع زخم	منشاء سلول‌های بنیادین	ABI	کاهش درد	میزان آمپوتاسیون
Mohammadzade, et al.	۲۱	CLI	PBSC	↑	+	٪۰
[۱۷] Nizankowski R, et al.	۱۰	CLI	BM-MNC	↑	+	٪۳۰
[۱۸] Tateishi-Yuyama E, et al.	۴۷	CLI	PBSC, BM-MNC	↑	+	٪۰
[۱۹] Durdu S, et al.	۲۸	CLI	BM-MNC	↑	+	٪۳/۶
[۲۰] Hernandez P, et al.	۱۲	CLI	BM-MNC	↑	+	٪۸
[۲۱] Bartsch T, et al.	۱۳	C	BM-MNC	↑	-	٪۰
[۲۲] Koshikawa M, et al.	۷	اسکیمی دست	BM-MNC	↑	+	٪۰
[۲۳] Lenk K, et al.	۷	CLI	CPC	↑	+	٪۱۴
[۲۴] Kajiguchi M, et al.	۷	CLI	BM-MNC	↑	+	٪۴۳
[۲] Ishida A, et al.	۶	CLI	PBSC	↑	+	٪۰

ABI: Ankle- Brachial Index C: Claudication CLI: Critical Limb Ischemia
CPC: Circulating blood-derived Progenitor Cell MNC: Mononuclear Cells
PBSC: Peripheral Blood stem Cell

معنی‌داری در میانگین اندکس ABI بیماران نسبت به قبل از درمان با سلول‌های بنیادین گزارش شد [۴]. در مورد فراوانی آمپوتاسیون ماژور در این مطالعه، در گروه مورد، هیچ موردی گزارش نشد ولی در گروه کنترل ۵۰٪ بیماران نیاز به آمپوتاسیون ماژور پیدا کردند. در مطالعات مشابه نیز گزارشاتی مبنی بر کاهش فراوانی آمپوتاسیون اندام‌های مبتلا ارائه شده است و در مطالعه Pingping hung نشان داده شد که پس از درمان با سلول‌های بنیادین در بیماران گروه مورد هیچ موردی از آمپوتاسیون گزارش نشده ولی در گروه کنترل ۵۰٪ از بیماران تحت عمل آمپوتاسیون قرار گرفتند [۴]. درمان با سلول‌های بنیادین خون محیطی در مطالعه ما با باعث بهبودی در راه رفتن

در مطالعه ما نشان داده شد که میانگین اندکس ABI در گروه مورد بعد از درمان به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0/003$) و میزان اندکس ABI در ۵ بیمار در گروه مورد (۷۱/۴٪) نسبت به قبل از درمان افزایش یافت. در مطالعات مشابه انجام شده در این زمینه نیز افزایش اندکس ABI در بیماران تحت درمان با سلول‌های بنیادین مشاهده شده است. ABI روش قابل اعتماد و قابل اندازه‌گیری مجدد بوده و حساسیت و ویژگی به ترتیب ۹۰٪ و ۹۵٪ دارد و بیمار را متحمل اشعه یا ماده حاجب مثل CT آنژیوگرافی نمی‌کند و هزینه کمتری دارد [۹]. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Pingping hung بر روی ۲۸ بیمار زخم پای دیابتی انجام شده بود، افزایش

درمان، به عنوان درمان‌های متداول در زخم پای دیابتی بهره جست.

پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ای مشابه با حجم نمونه بیشتر و در صورت امکان دو سوکور انجام شود که در آن بیماران دیابتی در معرض خطر از لحاظ زخم پای دیابتی که اندکس ABI آنها کاهش یافته است، تحت درمان پیشگیرانه با سلول‌های بنیادین خون محیطی قرار گرفته تا هم بهبود خون‌رسانی اندام‌های مبتلا و هم کاهش شیوع زخم در آنها مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه تحت حمایت مالی شبکه سلول‌های بنیادی کشور و مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. همچنین از کلیه اساتید؛ آقایان دکتر حسین قناعتی، دکتر علی موافق، دکتر پرویز حسینی، دکتر علی محمد شریفی و خانم دکتر پیوند امینی که در این طرح ما را راهنمایی کردند و شرکت فرآورده‌های پویش دارو برای تامین (G-CSF(PDgrastim®) و از همه بیمارانی که با همکاری نمودند نهایت تشکر را داریم.

بیماران شده که نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بوده است ($P=0/02$).

با بهبودی زخم پای دیابتی نه تنها بیماران، سریع‌تر به روند عادی زندگی خود باز می‌گردند، بلکه از بسیاری عوارض ناشی از زمین‌گیر شدن از جمله ترومبوز وریدهای اندام‌های تحتانی و بدنبال آن آمبولی ریه کاسته می‌شود که این خود جزء مزایای اصلی این درمان محسوب می‌شود.

پس درمان با سلول‌های بنیادین خون محیطی با بهبود زخم و افزایش خون‌رسانی بافت‌های درگیر، نیاز به آمپوتاسیون اندام‌های مبتلا را کم می‌کند که با کاهش مورتالیتی و موربیدیتی در بیماران دیابتی همراه می‌باشد. لذا بسیاری از هزینه‌های پزشکی و درمانی آنها کاسته شده و همچنین با افزایش بقای بیماران همراه می‌باشد، مجموع این مزایا باعث می‌شود درمان با سلول‌های بنیادین خون محیطی را بتوان به عنوان یکی از درمان‌های رایج در درمان زخم پای دیابتی مطرح نمود.

در مجموع در این مطالعه با حجم نمونه کم که امکان دو سوکور کردن آن نبود، نشان داده شد که درمان زخم‌های دیابتی با سلول‌های بنیادین خون محیطی با افزایش اندکس ABI، کاهش آمپوتاسیون، کاهش اندازه زخم و بهبودی در راه رفتن و فعالیت بیماران همراه است. باتوجه به مزایای بالای این درمان، می‌توان با مطالعات تکمیلی، از این

ماخذ

1. Laura S. The contribution of bone marrow derived mesenchymal stem cells in diabetic wound healing from news-medical Net later medicals news and research from Around the world, *American Diabetes association* 2008; 87(1): 37-45.
2. Ishida A, Ohya Y, Sakuda H, Ohshiro K, Higashiuesato Y, Nakaema M et al. Autologous peripheral blood mononuclear cell implantation for patients with peripheral arterial disease improves limb ischemia. *Circ J* 2005; 69: 1260-1265.
3. Kown S. Endothelium. Masters J.R, Human Adult Stem Cells, Japan 2009: 73-78.
4. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 2155-2160.
5. Yang XF, Wu YX, Wang HM, Xu YF, Lu X, Zhang YB, Wang F, Zhang Y Autologous peripheral blood stem cells transplantation in treatment of 62 cases of lower extremity ischemic disorder. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2005; 44: 95-98.
6. Fredrick R. *Hematopoietic cell Transplantation*. Harrison's principles of Internal medicine, 17nd ed. New York. 2008:713-717.
7. Michele H, cottle, F, et al. Stem cell Mobilization, *Hematology Journal* 2003, 419.
8. Mark AC, Joseph L. *Vascular Diseases of the Extremities*. Harrison's principles of Internal medicine, 17nd ed. New York. 2008:1568-1570.
9. Bickley, LS. *Bate's guide to physical examination and history taking* 10th ed. 2009: 437-459.
10. Burtl RK, Testori A, Oyama Y, Rodriguez HE, Yaung K, Villa M, Bucha JM, et al. Autologous peripheral blood CD133 cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Bone Marrow Transplantation* 2010; 45: 111-116.
11. Mario C, Carlo M, Benjamin A, Fausto L, Are Granulocyte colony stimulating factors

- Beneficial in treating Diabetic foot infection. *American Diabetes Association* 2005; 454-460.
12. Madeddu P, Emanuelli C, Pelosi E, Salis MB, Cerio AM, Bonanno G, Patti M, Stassi G, Condorelli G, Peschle C. Transplantation of low dose CD34+KDR+ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs. *Faseb J* 2004; 18: 1737-1739.
 13. Bing C. Autologous Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal stem cells on Diabetic foot. Third Military medical University. No. 2009.
 14. Yang Y, perg D, et al. Influence of mixed grafting of autologous and allogenic microskin on burn wound healthy *NLM Journal* 2004; 20(4): 229-31.
 15. Bensinger WI, et al. transplantation of Bone Marrow as compared with peripheral Blood cells form HLA – Indetical Relative in patients with Hematologic cancer. *New England Journal of Medicaine* 2001; 344: 175-181.
 16. Xabier L. Aranguren & Catherine M. Verfaillie & Aernout Lutun Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease. *J Mol Med* 2009; 87: 3-16.
 17. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A, Szczeklik A. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. *Kardiol Pol* 2005; 63:351-360.
 18. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-435.
 19. Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous bone-marrownonuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans. *J Vasc surg* 2003; 44: 73288.
 20. Hernandez P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticos E, Macias C, Hernandez C, del Valle L, Blanco A, Martinez A, Diaz F. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis* 2007; 194: e52-e56.
 21. Bartsch T, Falke T, Brehm M, Zeus T, Kogler G, Wernet P, Strauer BE. [Transplantation of autologous adult bone marrow stem cells in patients with severe peripheral arterial occlusion disease]. *Med Klin (Munich)* 2006; 101 (Suppl 1): 195-197.
 22. Koshikawa M, Shimodaira S, Yoshioka T, Kasai H, Watanabe N, Wada Y, Seto T, Fukui D, Amano J, Ikeda U. Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 793-798.
 23. Lenk K, Adams V, Lurz P, Erbs S, Linke A, Gielen S, Schmidt A, Scheinert D, Biamino G, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *Eur Heart J* 2005; 26: 1903-1909.
 24. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 2007; 71: 196-201.