بررسی اثر تزریق سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست ختنه‌گاه بر بهبود هیستولوژیک زخم دیابتی در مدل حیوانی

عباس ذبیحی[۱]، رحیم احمدی [۱،۲*]، عاطفه دهقانی[۱]

۱- گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

۲- گروه بیولوژی، کالج بین المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان

*مسئول مکاتبات: drrahahmadi@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2021.687834

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۲

چکیده

علیرغم شماری از تحقیقات تجربی، اثرات التیامی سلول‌های بنیادی بر زخم‌های مزمن هنوز هم با چالش‌های جدی روبروست. مطالعه حاضر به بررسی اثر تزریق سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست ختنه‌گاه بر بهبود هیستوپاتولوژیک زخم دیابتی در موش‌های صحرایی نر پرداخته است. طی این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم‌بندی شدند.گروه‌های شاهد و تیمار با استفاده از استرپتوزوتوسین مورد القای دیابت قرار گرفتند. با استفاده از پانچ بیوپسی، زخم در ناحیه پشتی نمونه‌ها ایجاد گردید. در گروه تیمار سلول‌های فیبروبلاست مشتق از پوست ختنه‌گاه به درون درم تزریق شدند. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از تیمار التیام زخم با استفاده از مشاهده مورفولوژیک، بررسی بافت شناسی از طریق رنگ آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین و اندازه گیری زخم با استفاده از Image j مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بین گروهها مقایسه شدند. مساحت زخم در روز ۱۴ پس از تیمار در گروه تیمار شده با فیبروبلاست نسبت به گروه شاهد به طور معناداری کمتر بود ($p < ۰/۰۰۱$). بررسی بافت شناسی و مورفولوژی زخم نشان داد که ضخامت پوست در گروه تیمار در روزهای ۱۴ و ۲۱ نسبت به گروه شاهد دچار افزایش معناداری گردید ($p < ۰/۰۱$). از سویی، عوارض مورفولوژیک در بافت پوست متعاقب تزریق سلول‌های فیبروبلاست مشاهده نگردید. نتایج بیانگر آنند که سلول‌های فیبروبلاست قادر به تسریع التیام زخم دیابتی می باشند بدون آنکه عوارض مورفولوژیک در بافت پوست ایجاد کنند؛ بر این اساس، سلول‌های فیبروبلاست مشتق از پوست ختنه‌گاه می‌توانند در حوزه سلول‌درمانی کاربرد داشته باشند.

کلمات کلیدی: فیبروبلاست، پوست ختنه‌گاه، زخم دیابتی، ائوزین- هماتوکسیلین، موش صحرایی.

مقدمه

دیابت بیماری شایع قرن است که دارای رشد فزاینده ای در تمامی جوامع می باشد و عوارض بسیاری را به همراه خود دارد که از آن جمله می توان به زخمهای مزمن پوستی اشاره کرد که به راحتی درمان نمی شوند و درمان این زخمها از چالشهای بزرگ عصر حاضر به شمار می آید. در واقع، به قندخون بالای ۹۶ تا حدود ۱۱۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر دیابت گفته می‌شود که در این بیماری توانایی تولید هورمون

انسولین در بدن از بین می‌رود یا بدن در برابر انسولین مقاوم شده و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد. در دیابت عوامل ژنتیکی، چاقی و کم‌تحرکی نقش مهمی در ابتلای فرد دارد. دیابت سبب تخریب رگ‌های بسیار ریز در بدن می‌شود که می‌تواند اعضای مختلف بدن همچون کلیه، چشم و اعصاب را درگیر کند. همچنین دیابت با افزایش ریسک بیماری‌های قلبی عروقی ارتباط مستقیمی دارد .علاوه بر آن دیابت می‌تواند منجر به ایجاد زخم‌های پوستی شود. زخم‌های دیابتی، جراحت‌هایی در پوست، چشم، اعضای موکوسی یا یک تغییر ماکروسکوپی در اپیتلیوم نرمال افراد دیابتی تیپ ۱ و ۲ می‌باشند. این زخم ها در اثر آسیب عصبی یا جریان خون ضعیف به وجود می‌آیند. زخم‌ها اغلب بالای قوزک یا زیر شست یا در محلی از پا که ناشی از نامناسب بودن کفش است، تشکیل می‌شود. دیگر دلایل ایجاد این زخم‌ها شامل عفونت ثانویه (باکتری، قارچ یا ویروس) و ضعف شدید بیمار می‌باشند (۵).

سلول‌های بنیادی از جمله فیبروبلاست‌ها می‌توانند در ترمیم زخم‌های دیابتی موثر باشند (٦). سلول‌های فیبروبلاستی فراوان‌ترین سلول‌ها در بافت همبند هستند که دوکی‌شکل، پهن و بزرگ می‌باشند و همه انواع رشته‌های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه‌ای را سنتز می‌کند. این سلول‌ها نوع خاصی از سلول‌های بافت همبند هستند که در پوست، تاندون‌ها و سایر بافت‌های سخت بدن وجود دارند. فیبروبلاست‌ها در ترمیم زخم نقش مهمی دارند و تصور می‌شود به دنبال آسیب بافتی، فیبروبلاست‌ها به محل آسیب مهاجرت می کنند و در آن‌جا کلاژن جدید رسوب می‌کند و روند بهبود را تسهیل می‌کنند (۱۸). سلول‌های بنیادی، که سلول‌هایی بسیار قدرتمند می‌باشند، روش‌های خاصی در درمان بیماری‌های مزمن از جمله درمان زخم‌های غیرقابل التیام ارائه می دهند (۱۰). درمان با سلول‌های بنیادی چشم‌انداز روشنی در بسیاری از مطالعات پیش‌بالینی در مورد زخم‌های پوستی مانند سوختگی دارد. تجزیه و تحلیل متاآنالیز نشان داده‌است که درمان سلول‌های بنیادی عملکرد ترمیم را برای زخم‌های پوستی اعمال می‌کند و این عمل عمدتا از طریق رگ‌زایی و اقدامات ضدالتهابی می‌باشد (١٦). سلول‌های بنیادی به شیوه قابل توجهی می‌توانند بهبود زخم‌های دیابتی را تسریع بخشند (۲۹). سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی همچنین می‌توانند نقش مهمی در ترمیم زخم و استراتژی‌های مهندسی بافت و جراحی زیبایی و ترمیمی داشته‌باشند (۱۱). بررسی‌های چند سال گذشته حاکی از آن است که فیبروبلاست‌ها نقش مهمی در حفظ هموستاز ریزمحیط و هماهنگی پاسخ فیزیولوژیکی پیچیده به زخم‌های پوستی دارند. در طی ترمیم زودهنگام زخم، فاکتورهای رشد آزاد شده توسط سلول‌های التهابی باعث تحریک فیبروبلاست‌ها به سمت زخم می شوند (١٤). روش‌های متعددی برای درمان زخم‌های مقاوم دیابتی مانند کنترل قند، ترمیم عروق، استفاده از اکسیژن پرفشار، اصلاح ناهنجاری‌های پا و ... به‌کار رفته‌است . همچنین روش‌های نوینی وجود دارد که در آن‌ها از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های فیبروبلاستی در درمان زخم‌های دیابتی استفاده می‌شود (۲۱). شیوع دیابت در سالهای اخیر با سیر صعودی قابل توجهی روبروست و از سویی، ابتلا به دیابت می‌تواند عوارض گسترده‌ای بخصوص ایجاد زخمهای مزمن را به همراه خود داشته باشد (۱۲، ۱۷، ٢٤). علیرغم کاربرد گسترده سلول‌های بنیادی در ترمیم زخمها، هنوز هم نحوه به کارگیری سلول‌های بنیادی به ویژه اینکه چه روشی از روشهای تیمار از قبیل اسپری، تزریق و یا به کارگیری موضعی دارای اثرات موثری در التیام زخمهای دیابتی است، با چالشهای جدی روبروست. بر این اساس، پژوهش

حاضر با بهره‌گیری از روش تزریق سلول‌های فیبروبلاست مشتق شده از پوست ختنه‌گاه به بافت پوست در ناحیه زخم، ترمیم زخم دیابتی در موش‌های صحرایی نر را مورد ارزیابی قرار داده است و نتایج حاصل از این پژوهش دارای اهمیت ویژه‌ای در حوزه سلول‌درمانی خواهد بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهشهای زیست‌پزشکی از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 دریافت شد.

حیوانات: در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی از ۲۴ سرموش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم که از موسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شدند استفاده گردید. موش های خریداری شده در قفس های مخصوص نگه داری شدند. دمای اتاق حدود ۲۲ درجه سانتیگراد بود که با برنامه‌ی نوری شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی که با شروع صبحگاهی در ساعت ۸ همراه بوده است و آب و غذا بصورت نامحدود در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت و هر روز آب حیوانات تعویض و آب تازه در اختیار آنها قرار می‌گرفت. در طول پژوهش، تمامی قوانین بین المللی حقوق حیوانات، براساس استانداردهای بین المللی رعایت گردید.

جداسازی درم: روند جداسازی درم مطابق مطالعات پیشین انجام گرفته توسط Monfared و همکاران (۲۰) و Oh و همکاران (۲۲) اجرا گردید. به طور خلاصه نمونه پوست ختنه‌گاه از نوزادان تازه متولد شده به روش سزارین با رعایت شرایط اخلاق در پژوهش و کسب رضایت از والدین، دریافت شد. ظرف‌های نمونه استریل به آزمایشگاه منتقل شده و اجزای مختلف آن جهت کشت سلول‌های آن جدا گردید. ابتدا پوست ختنه‌گاه مورد استریلیزاسیون قرار گرفت. تحت شرایط استریل نمونه پوست به کمک قیچی و پنس جراحی‌استریل، قطعه قطعه شد و سپس قطعات پوست به لوله فالکون حاوی آنزیم دیسپاز و بافر HBSS منتقل شد. پس از ۱۸ ساعت با استفاده از پنس نوک باریک، درم جدا و به یک پتری دیش منتقل شد.

جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از درم: جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از درم، درم در داخل پتری دیش با استفاده از اسکالپل کاملا خرد شد. سپس آنزیم کلاژناز به دیش اضافه شد و نمونه به مدت ۲ساعت در انکوباتور قرار داده شد. محتویات داخل دیش به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ سی‌سی محیط کشت DMEM-HG دارای ۱۰درصد FBS منتقل و حدود ۳۰-۲۰بار پیپتاژ شد. محتوای فالکون از فیلتربا منافذی به اندازه ۷۰ میکرومتر عبور داده شد تا سلول‌ها از قطعات بافتی جدا شوند. سلول‌ها به مدت۵ دقیقه با دور g ۲۰۰ در ۱۴درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. محیط رویی تخلیه شد و بر روی ته نشست سلولی، ۵ سی‌سی محیط کشتDMEM-HG فاقد سرم ریخته شد. مجددا" سلول‌ها به مدت۵ دقیقه با دور g ۲۰۰ در ۱۴درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. در ادامه، محیط رویی لوله فالکون تخلیه شد و ۱ سی‌سی محیط کشت به سلول‌های فیبروبلاست اضافه و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. فلاسک ها در انکوباتور انکوبه شدند. پس از کشت اولیه، روند تکثیر و شکل ظاهری سلول‌ها و زنده بودن آنها به وسیله میکروسکوپ اینورت (معکوس) مورد بررسی قرار گرفت (۱۷-۱۵).

تعیین هویت سلول‌ها و زنده مانی سلول‌ها: جهت تعیین هویت سلول ها از روش ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکر ویمینتین استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا لام سیالینیزه شده و سپس سلول‌های جداسازی

شده بر روی لام کشت داده می شوند. آنگاه پس از ۲٤ ساعت لام با محلول استون–متانول فیکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در درون بافر و در مایکروفر قرار داده می شود. پس از سرد شدن لام با محلول تریس (Tris) شستشو می گردد. پس از افزودن آب اکسیژنه، آنتی بادی ضد ویمنتین بر روی لام افزوده شده و پس از شستشو، آنتی بادی ثانویه ریخته می شود و متعاقبا" رنگ کروموژن و سپس هماتوکسیلین افزوده شده و نهایتا" لام شسته شده و پس از آبگیری در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار می گیرد (۲۷، ۲۳).

گروه‌بندی و تیمار: موش‌ها به گروه کنترل (موش‌هایی که در آنها زخم ایجاد شد اما فیبروبلاست تزریق نشد) و گروه تیمار (موش‌هایی که مورد تزریق سلول‌های فیبروبلاست قرار گرفتند)، تقسیم بندی شدند.

نحوه دیابتی کردن موش‌ها: جهت دیابتی کردن موش‌ها یک دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. سطح گلوکز ناشتا در نمونه خون گرفته شده از دم با استفاده از گلوکومتر ٤ روز پس از تزریق اندازه‌گیری شد. موش‌هایی که میزان گلوکز آنها بیشتر از ۲٤٦ میلیگرم /دسی‌لیتر بود بعنوان موش‌های دیابتی درنظر گرفته شدند (۱۵،۲۵).

نحوه ایجاد زخم و تزریق سلول‌های فیبروبلاست: موش ها پس از بیهوش شدن توسط تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میلی‌گرم /کیلوگرم کتامین و ۱۰میلی‌گرم /کیلوگرم زایلازین، بر روی میز جراحی قرار گرفتند. ناحیه پشتی نمونه‌ها با ترکیب آب و مایع دستشویی، خیس و توسط تیغ کاملا موزدایی شد. سپس ناحیه مورد نظر با الکل و بتادین ضدعفونی و پس از آن با قرار دادن پانچ استریل شده ۰/۸ میلی‌متر ، زخمی با برداشتن تمام ضخامت پوست شامل اپیدرم و درم ایجاد شد. جهت تزریق سلول‌های فیبروبلاست به ناحیه زخم در گروه تیمار، ۲×۱۰^{۵} سلول در یک سی‌سی نرمال سالین به صورت ساب درمال در پوست اطراف ناحیه زخم تزریق و پس از قرارگرفتن پانسمان سیلیکونی مپیتل بر روی زخم، با چسب شفاف پوشانده شد و دور حیوان پیچیده شد. در گروه کنترل یک سی سی نرمال سالین در پوست ناحیه اطراف زخم تزریق شد (۱۹).

ارزیابی بافت‌شناسی ترمیم زخم: در روزهای ۷، ۱۰ و ١٤ پس از تیمار، موش‌ها توسط روش نخاعی معدوم شدند و بافت پوستی شامل ناحیه زخم و ناحیه پوستی اطراف آن به میزان ۲ سانتی‌متر برداشته و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. نمونه‌های فیکس شده در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. نمونه-ها در دستگاه تمام اتوماتیک وارد ظرف‌های شیشه‌ای حاوی الکل‌های با درجه خلوص متفاوت، فرمالین، گزیلول و پارافین شدند (به ترتیب فرمالین، فرمالین–الکل (۵۰–۵۰)، الکل ۵۰، الکل ۸۰، الکل ۹٦، الکل ۱۰۰ درصد، گزیلول و پارافین). سپس نمونه ها از پارافین بیرون آورده شده و به فور ٦۰ درجه منتقل شدند و پارافین آن‌ها به طور کامل پاک شد و نمونه های بافتیبه صورت بلوکهای پارافینی قالب گیری شدند. بلوک‌های پارافینی توسط دستگاه میکروتوم [مدل ERMA ساخت ژاپن] برش داده شدند. لایه‌های برش داده شده به ضخامت۵ میکرون به درون ظرف حاوی الکل ۵۰ درصد قرار گرفتند. سپس این لایه‌های بافتی توسط یک لام برداشته شده و به درون حمام آب گرم وارد شدند تا پارافین انها ذوب شده و در نهایت بافت‌ها توسط لام از روی آب برداشته شدند. در ادامه جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، لام‌ها ابتدا در گزیلل به مدت ۱۰ دقیقه و سپس به مدت ۱ دقیقه در هر الکل گزیلل و الکل با درصدهای ۱۰۰، ۹٦، ۷۰ و ۵۰ جهت آبدهی قرار گرفتند. پس از شستشوی لام‌ها با آب جاری و

نمونه ها در رنگ هماتوکسیلین به مدت ۲ دقیقه قرار داده شده و سپس در رنگ ائوزین به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. پس از شستشو با آب، در مرحله آخر، آبگیری با قرار دادن لام‌ها به ترتیب در الکل‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد، الکل ۱۰۰، الکل گزیلل و گزیلل صورت گرفت. در نهایت لام‌ها با چسب مخصوص چسبانده و شماره‌گذاری شده و مورد بررسی هیستولوژیک توسط متخصص بافت شناسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده ها با استفاده از نرم افزار **SPSS** نسخه ۱۸ مورد بررسی آماری قرار گرفتند. در این راستا ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف از توزیع طبیعی داده ها اطمینان به عمل آمد. پس از حصول اطمینان از توزیع طبیعی داده ها، تجزیه و تحلیل آماری توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی بنفرونی **(Bonferoni)** انجام گرفت.

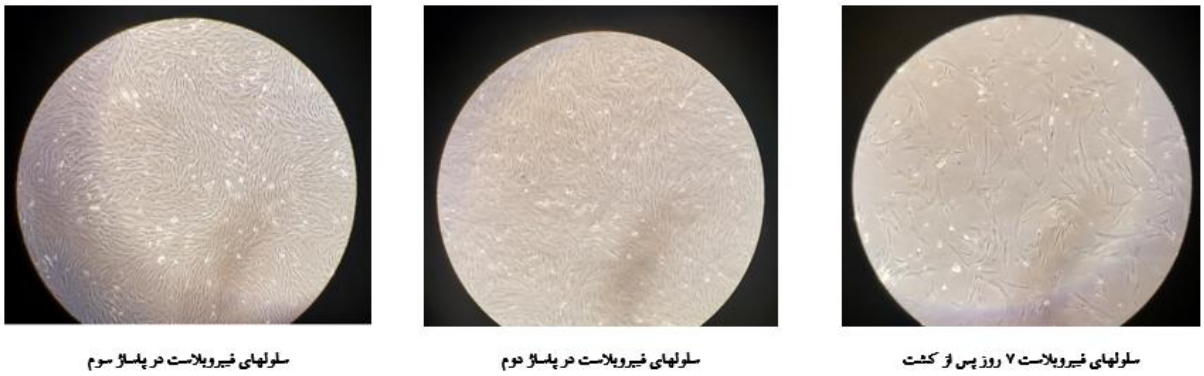
نتایج

مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست کشت شده: در بررسی با میکروسکوپ معکوس سلول‌های فیبروبلاست چسبنده و دوکی شکل به صورت شعاعی در پاساژهای مختلف مشاهده شدند (شکل ۱). از سلول‌ها در پاساژ ۳ جهت تزریق استفاده شد. شمارش سلول‌ها نشان داد که هر فلاسک دارای ۷۵ درصدتراکم سلولی و حدود ۲ میلیون سلول در پاساژ سوم بود.

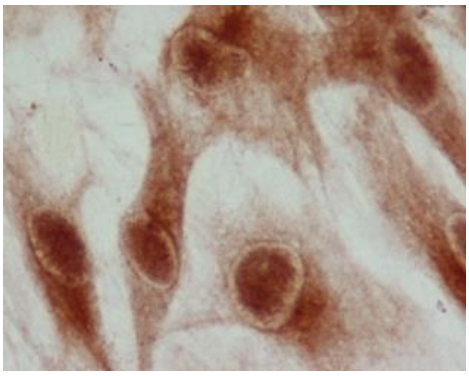
تعیین هویت سلول‌ها: در بررسی میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از بافت و رنگ‌آمیزی شده با روش ایمونوسیتوشیمی برای مارکر ویمنتین، همه‌ی سلول‌ها به صورت یکدست به رنگ قهوه‌ای مشاهده شدند. نتایج نشان داد که سلول‌های جداسازی شده مارکر ویمنتین را در سطح بالایی بیان می‌کنند (شکل ۲).

مشاهده بسته شدن زخم: مشاهده و بررسی مورفولوژیک بسته شدن زخم نشان داد که بسته شدن و ترمیم زخم با سرعت بیشتری در گروه تیمار رخ داد. این امر به ویژه در روزهای ۱۴ و ۲۱ روز پس از تیمار در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده بود (شکل ۳). از طرفی نتایج بررسی با Image j نشان دادند که در هر دو گروه تیمار و کنترل مساحت زخم در روزهای ۱۴ نسبت به روز ۷ و روز ۲۱ نسبت به ۱۴ دچار کاهش معناداری شد ($p<$ ۰/۰۵). در مقایسه بین گروه تیمار با گروه کنتری گرچه در روزهای ۰، ۷ و ۲۱ پس از تیمار تفاوت معناداری بین دور گروه مشاهده نشد، اما مساحت زخم در روز ۱۴ و در گروه تیمار با سلول های فیبروبلاست به طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ($p <$ ۰/۰۰۱).

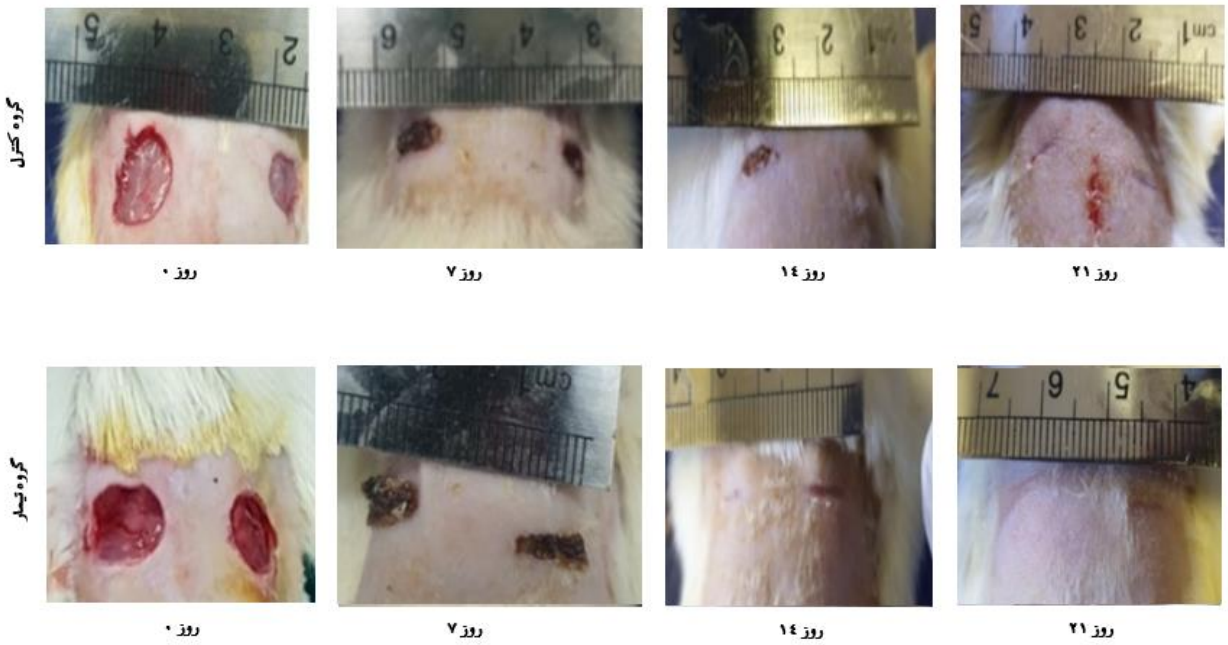
بررسی بافت‌شناسی التیام زخم: بررسی بافت شناسی التیام زخم نشانگر آن بود که ضخامت لایه های پوست به ویژه درم با سرعت بیشتری در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل دچار افزایش شد. این افزایش به ویژه در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از تیمار چشمگیر بود.در هر دو گروه تشکیل اپیتلیال در روز ۷ مشاهده شد و تا روز ۲۱ روند افزایشی داشت اما درصد تشکیل اپیتلیال در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل بیشتر بود. همچنین طبق گزارش پاتولوژی تعداد نوتروفیل‌ها مشاهده شده در برشهای بافتی در هر دو گروه طی هفته اول پس از ایجاد زخم به حداکثر خود رسیده، اما پس از آن روند کاهشی داشت. این امر نشانگر آن بود که یک هفته پس از ایجاد زخم تحریک سیستم ایمنی و ایجاد واکنش التهابی از بین رفته و شرایط به حال طبیعی خود بازگشته است (شکل ٤).



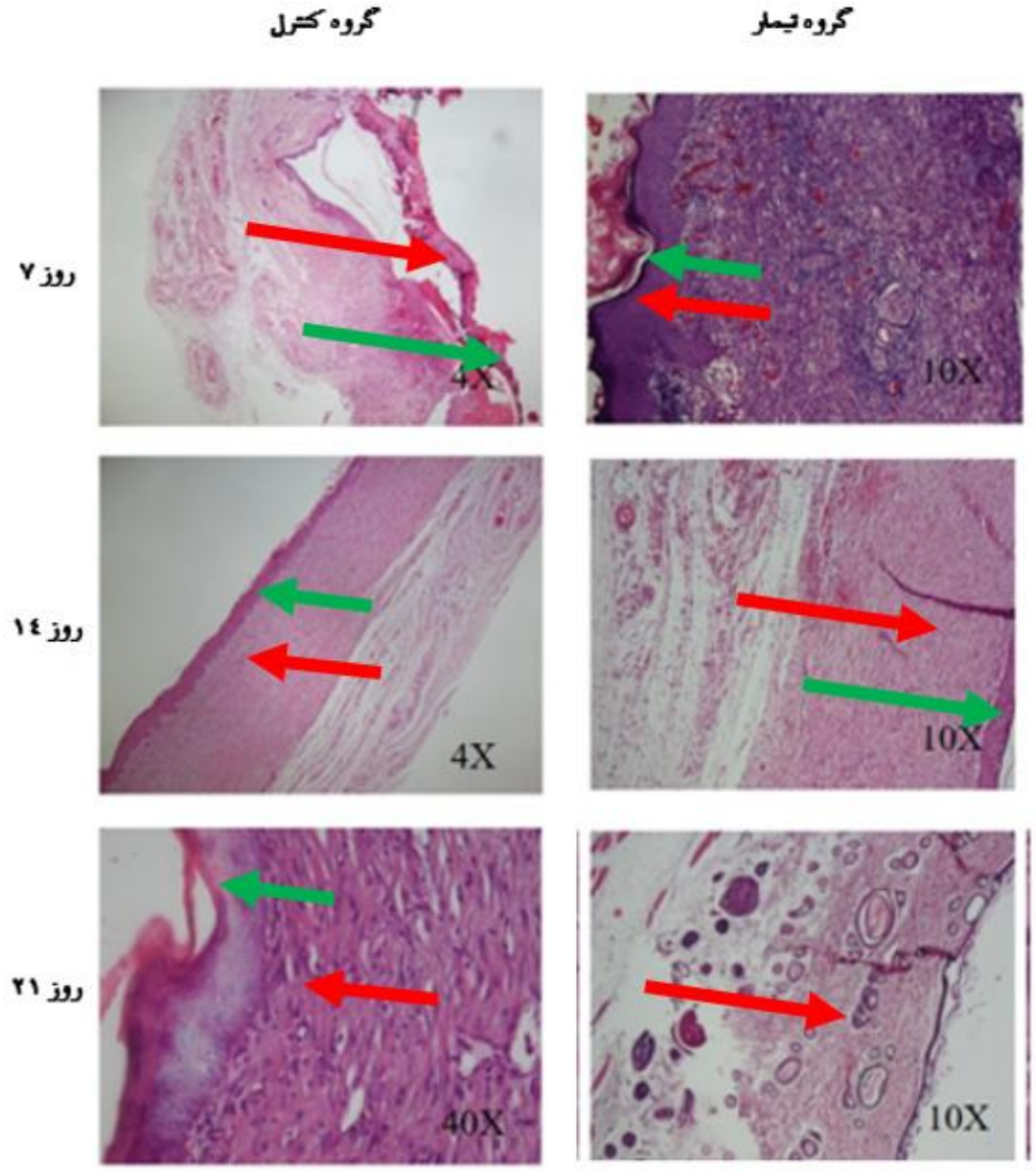
شکل ۱- سلول‌های فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست ختنه گاه ۷ روز پس از کشت و پاساژهای دوم و سوم.



شکل ۲- رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی فیبروبلاست‌ها برای مارکر ویمنتین (بزرگنمایی × ۱۰۰۰). سلول‌ها به صورت یکدست به رنگ قهوه‌ای مشاهده شدند که نشانگر وجود ویمنتین در هسته و سیتوپلاسم سلول‌ها بود.



شکل ۳- بسته شدن و مورفولوژی زخم در گروه کنترل و تیمار در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱.



شکل ٤- نتایج بافت شناسی (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین) در گروه کنترل و تیمار در روزهای ۷، ١٤ و ٢١ با بزرگنمایی 4X، 10X و 40X. فلشهای سبز رنگ نمایانگر اپیدرم و فلشهای قرمز رنگ بیانگر درم می باشد (با توجه با برشهای بافتی حاصل تلاش شده است جهت نمایاندن مناسب نتایج بافتی، از شکلهای مناسب با بزرگنمایی مختلف استفاده گردد).

بحث

سلول‌های بنیادی مشتق از منابع مختلف از قبیل بافت چربی، پوست و مغز استخوان و محصولات آنها می توانند در حوزه سلول درمانی به ویژه جهت التیام زخم‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۲۸)، اما نوع

سلول‌های به کار گرفته شده و نیز روش تیمار زخمها با سلول‌های بنیادی دارای نتایج متفاوتی بوده است و هنوز هم موضوعی چالش برانگیز است به گونه‌ای که علیرغم شباهت‌های موجود در بسیاری از تحقیقات انجام یافته، نتایج گاه بسیار ضد و نقیض می باشند. این موضوع گاهی از این جهت که به کارگیری سلول‌های بنیادی می‌تواند عوارض جدی از قبیل تحریک رشد سلول‌های ناهنجار را به بار آورد نیز دارای چالش جدی در حوزه درمانی و بالینی است (۱،۲،۳۰) و بسیاری از پزشکان و متخصصان بالینی گاه نظر خوشایندی نسبت به این روشهای درمانی از خود نشان نمی‌دهند. از همین رو تحقیقاتی که به بررسی روند بافت شناسی ترمیم زخم متعاقب استفاده از سلول‌های بنیادی می پردازند به لحاظ بررسی عواقب و عوارض احتمالی در سطح بافتی و نشان دادن ایمن بودن روشهای پیوند سلول‌های بنیادی در التیام زخمها، حایز اهمیت است.

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که تزریق سلول‌های فیبروبلاستی مشتق شده از پوست ختنه‌گاه می‌تواند سبب تسریع بهبود زخم‌های دیابتی شود و از نظر بافت شناسی دارای عوارضی معنادار در سطح بافتی نبوده و بنابراین، این امر از ایمنی قابل توجهی حداقل در مدل حیوانی برخوردار است. در مقایسه با یافته های تحقیقات پیشین و موافق با یافته تحقیق حاضر، پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی و به ویژه سلول‌های فیبروبلاست می‌توانند در ترمیم زخم‌ها بویژه ترمیم زخم دیابتی نقش قابل توجهی داشته باشند. Bainbridge و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که فیبروبلاست‌ها نقش حیاتی در حمایت از التیام زخم داشته و در فرآیندهای کلیدی همچون تجزیه فیبرین لخته‌ها، ایجاد ماتریکس خارج سلولی و کلاژن‌سازی نقش موثری دارند و از این رو می‌توانند در ترمیم زخم نقش موثری ایفا کنند (۳). از سویی، Deb و همکاران در سال ۲۰۱٤ به وضوح مشخص کردند که فیبروبلاست‌های موجود در بافت قلبی دارای توانایی ویژه در التیام زخم‌ها و ترمیم آسیب‌های بافت قلب می‌باشند (۷). در تحقیق حاضر نتایج بافت شناسی نشان دادند که در هفته اول با توجه به افزایش نوتروفیل‌ها در بافت پوست پدیده التهابی در محل زخم رخ داده، اما پس از یک هفته این پدیده از بین رفت و در هفته دوم تکثیر سلول‌های درم و اپیدرم مشاهده گردید و در هفته سوم مدل زخم تا حد قابل توجهی به وضعیت طبیعی خود بازگشت و این امر در گروه تیمار با سلول‌های فیبروبلاست، با سرعت بیشتری انجام گرفت. در واقع التیام زخم در سه مرحله‌ی التهابی شدن، تکثیر و بازگشت زخم به وضعیت طبیعی اتفاق می‌افتد و جالب توجه است که فیبروبلاستها با تاثیرگذاری بر هر سه مرحله‌ی التیام زخم، نقش بی بدیلی در ترمیم زخم ایفا می‌نمایند. این یافته موافق با نتایج حاص از پژوهش Desjardins-Park و همکاران در این زمینه بود (۸). از سویی فیبروبلاست‌ها نقش مهمی در هماهنگی پاسخ‌های فیزیولوژیک بدن در مقابل زخم‌های پوستی دارند و بدین ترتیب از طریق تحریک پاسخهای فیزیولوژیک نیز در ترمیم زخم‌های پوستی موثر می‌باشند (٦). به کارگیری سلول‌های بنیادی در التیام زخم نشانگر آن است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی خود اثر مستقیم قابل توجهی بر التیام زخم ندارند بلکه اثر تسریعی خود بر التیام زخم را از طریق تحریک سلول های فیبروبلاست انجام می دهند (۲٦) و بنابراین طبیعی است که استفاده از سلول‌های فیبروبلاست در التیام زخم دارای ارجحیت ویژه‌ای نسبت به سایر سلول‌های بنیادی باشد.

شایان ذکر است که این مطالعه در محدوده بررسی اثرات تزریق فیبروبلاست بر ترمیم زخم در حیطه بررسی بافت‌شناسی انجام گرفته و از نظر بررسی‌های

ترمیم زخم در حیطه سلولی و مولکولی دارای محدویتهایی می‌باشد.محققین این طرح امیدوارند در ادامه این پژوهش امکان مطالعه در خصوص اثر سلول‌های فیبروبلاست بر زخم دیابتی در حوزه میکروسکوپ الکترونی، بیان ژن‌های موثر در التیام زخم و اندازه گیری فاکتورهای رشد و میزان کلاژن در ناحیه زخم فراهم آید.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داده‌اند که تزریق سلول‌های فیبروبلاست مشتق شده از پوست ختنه‌گاه می‌تواند سبب تسریع بهبود زخم دیابتی در موش‌های صحرایی نر گردد. در این راستا مساحت زخم دیابتی دو هفته پس از تیمار با سلول‌های فیبروبلاست به صورت چشمگیری دچار کاهش می‌گردد حال آنکه در نمونه هایی که مورد تیمار با سلول‌های فیبروبلاست قرار نگرفته اند زمان ترمیم به صورت معناداری با سرعت کمتری رخ می دهد. از سویی به کارگیری فیبروبلاست ها در التیام زخم از نظر بافتی عوارض مورفولوژیک قابل تشخیص معناداری همراه ندارد و به عنوان یک روش ایمن حداقل در مدل حیوانی قابل طرح است. یافته های این پژوهش می‌توانند در حوزه التیام زخم‌های مزمن پوستی حاصل از ابتلا به دیابت دارای کاربرد باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته و بدین‌وسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت‌های مالی این مرکز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Afessa B., Peters S.G. 2006. Major complications following hematopoietic stem cell transplantation. *In seminars in respiratory and critical care medicine*, 27(3): 297.

2- Arnaout K., Patel N., Jain M., El-Amm J., Amro F., Tabbara I.A. 2014. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer investigation*, 32(7): 349-62.

3- Bainbridge P. 2013. Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of wound care*, 22(8): 407-11.

4- Belvedere R., Pessolano E., Porta A., Tosco A., Parente L, Petrella F., Perretti M., Petrella A. 2020. Mesoglycan induces the secretion of microvesicles by keratinocytes able to activate human fibroblasts and endothelial cells: A novel mechanism in skin wound healing. *European Journal of Pharmacology*, 869: 172894.

5- Blair M. Diabetes Mellitus Review.2016. *Urologic nursing*, 36(1): 27-36.

6- Bus S.A., Lavery L.A., Monteiro- Soares M., Rasmussen A., Raspovic A., Sacco I.C., van Netten J.J. 2020. International Working Group on the Diabetic Foot. Guidelines on the prevention of foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). *Diabetes/metabolism research and reviews*, 36: e3269.

7- Deb A., Ubil E. 2014.Cardiac fibroblast in development and wound healing. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 70: 47-55.

8- Desjardins-Park HE, Foster DS, Longaker MT. 2018. Fibroblasts and wound healing: an update, 13(5):491– 95.

9- Esteghamati A., Larijani B., Aghajani M.H., Ghaemi F., Kermanchi J, Shahrami A., Saadat M., Esfahani E.N., Ganji M., Noshad S., Khajeh E. 2017. Diabetes in Iran: prospective analysis from first nationwide diabetes report of National Program for Prevention and Control of

18- McDougall S., Dallon J., Sherratt J., Maini P. 2006. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 364(1843): 1385-1405.

19- Momeni Moghaddam M, Vatandoost J. 2017. Mouse skin wound healing using Lucilia sericata maggot extract. *Journal of Cellular and Molecular Research* (*Iranian Journal of Biology*, 30(1): 26-39.

20- Monfared GS, Ertl P, Rothbauer M. 2020. An on-chip wound healing assay fabricated by xurography for evaluation of dermal fibroblast cell migration and wound closure. *Scientific reports*, 10(1): 1-4.

21- Nilforoushzadeh MA, Jaffary F, Siavash M, Heidari A, Ansari N, Hossein Siadat A. 2015. Treatment of recalcitrant diabetic ulcers with trichloroacetic acid and fibroblasts: Case report. *Journal of Isfahan Medical School*, 32(315): 2252-2259.

22- Oh EJ, Gangadaran P, Rajendran RL, Kim HM, Oh JM, Choi KY, Chung HY, Ahn BC. 2020. Extracellular vesicles derived from fibroblasts promote wound healing by optimizing fibroblast and endothelial cellular functions. *Stem Cells*, 39(3): 266-279.

23- Rajendran NK, Houreld NN, Abrahamse H. 2020. Photobiomodulation reduces oxidative stress in diabetic wounded fibroblast cells by inhibiting the FOXO1 signaling pathway. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 14:1-2.

24- Ray J.A., Valentine W.J., Secnik K., Oglesby A.K., Cordony A., Gordois A., Davey P., Palmer A.J. 2005. Review of the cost of diabetes complications in Australia, Canada, France, Germany, Italy and Spain. *Current medical research and opinion*, 21(10): 1617-1629.

25- Saha J.K., Xia J., Grondin J.M., Engle S.K., Jakubowski J.A. 2005. Acute hyperglycemia induced by Diabetes (NPPCD-2016). *Scientific Reports*,7(1):1-0.

10- Hanson S.E., Bentz M.L., Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. 2010. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(2): 510.

11- Hocking A.M. 2012. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous wounds. *Advances in wound care*, 1(4): 166-171.

12- Harding J.L., Pavkov M.E., Magliano D.J., Shaw J.E., Gregg E.W. 2019. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*, 62(1): 3-16.

13- Hu X., Zhang H., Li X., Li Y., Chen Z. 2020. Activation of mTORC1 in fibroblasts accelerates wound healing and induces fibrosis in mice. *Wound Repair and Regeneration*, 28(1): 6-15.

14- Katz M.H., Alvarez A.F., Kirsner R.S., Eaglstein W.H., Falanga V. 1991. Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(6): 1054-8.

15- León C., García-García F., Llames S., García-Pérez E., Carretero M., Arriba M.D., Dopazo J., Del Río M., Escámez M.J., Martínez-Santamaría L. 2021. Transcriptomic Analysis of a Diabetic Skin-Humanized Mouse Model Dissects Molecular Pathways Underlying the Delayed Wound Healing Response. *Genes*, 12(1): 47.

16- Li Y., Xia W.D., Van der Merwe L., Dai W.T., Lin C. 2020. Efficacy of stem cell therapy for burn wounds: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem cell research and therapy*, 11(1): 1-2.

17- Lotfy M., Adeghate J., Kalasz H., Singh J., Adeghate E. 2017. Chronic complications of diabetes mellitus: a mini review. *Current diabetes reviews*, 13(1): 3-10.

ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Experimental Biology and Medicine*, 230(10): 777-784.

26- Saheli M, M, Ganji R, Hendudari F, Kheirjou R, Pakzad M, Najar B, Piryaei A. 2020. Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Archives of dermatological research*, 312(5): 325-336.

27- Suhaeri M., Noh M.H., Moon J.H., Kim I.G., Oh S.J., Ha S.S., Lee J.H., Park K. 2018. Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. *Theranostics*, (18): 5025.

28- Wu Y., Chen L, Scott P.G., Tredget E.E. 2007. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells*, 25(10): 2648-2659.

29- Xu J., Wu W., Zhang L., Dorset-Martin W., Morris M.W., Mitchell M.E., Liechty K.W. 2012. The role of microRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment: correction with mesenchymal stem cell treatment. *Diabetes*, 61(11): 2906-2912.

30- Yin J., Jurkunas U. 2018. Limbal stem cell transplantation and complications. *InSeminars in ophthalmology*. 33(1): 134-141.