بررسی اثرات تزریق زیر جلدی سلول‌های فیبروبلاست بر سنتز کلاژن و التیام زخم پوستی در رت دیابتی

عباس ذبیحی[1]، مینو محمودی[2*]

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

یافته / دوره ۲۳ / شماره ۱ / ویژه نامه ۱۴۰۰

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۸

مقدمه: در سال‌های اخیر تعداد بیمارانی که از زخم‌های دیابتی رنج می‌برند رو به افزایش است و مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی می‌توانند در التیام زخم‌های پوستی مؤثر باشند. روش‌های مرسوم درمانی زخم‌های دیابتی با نارسایی‌های جدی رو به رو هستند. هدف از این تحقیق بررسی التیام زخم دیابتی و تغییرات کلاژن متعاقب تزریق سلول‌های فیبروبلاست در موش‌های صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: طی این تحقیق تجربی ۱۶ سر موش صحرایی نر دیابتی شده با استرپتوزوسین به دو گروه کنترل و تیمار شده با فیبروبلاست مشتق از پوست ختنه گاه تقسیم‌بندی گردیدند. زخم‌هایی به قطر ۰/۸ سانتیمتر درپشت موش‌ها ایجاد شدند و پس از تزریق ساب‌درمال فیبروبلاست، التیام زخم به روش فتوگرافی و رنگ آمیزی ماسون تری‌کروم در روزهای ۷ و ۲۱ ارزیابی شد. داده ها با استفاده از آزمون تی- تست و آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: سرعت التیام و میزان تولید کلاژن در گروه تیمار شده با سلول‌های فیبروبلاستی در روزهای ۷ و ۲۱ پس از تیمار نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشت ($P<0/01$) .

بحث و نتیجه‌گیری: تزریق ساب‌درمال سلول‌های فیبروبلاستی مشتق شده از پوست ختنه گاه سبب تولید کلاژن بیشتر و التیام سریعتر زخم دیابتی می‌شوند و بر این اساس می‌توانند در حوزه سلول درمانی کاربرد داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: پوست ختنه‌گاه، رنگ آمیزی ماسون تری‌کروم، زخم دیابتی، فیبروبلاست، موش صحرایی نر.

*آدرس مکاتبه: همدان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان.

پست الکترونیک : minoomahmoodi@yahoo.com

مقدمه

دیابت نوعی بیماری مزمن می‌باشد که بر اثر تاثیرات ژنتیکی یا تغذیه‌ای که باعث نقص در تولید هورمون انسولین می‌شود، بروز می نماید (۱). این بیماری باعث بروز عوارضی چون تاری دید، تشنگی، تکرر ادرار و زخم‌های پوستی می‌گردد (۲). زخم دیابتی یکی از عوارض قابل توجه دیابت می‌باشد که بر اثر فقدان حس درد، کاهش سیستم ایمنی و آسیب عروق ریز و انتهایی ایجاد می‌شود. زخم دیابتی بیشتر در پا باعث ایجاد ضایعات پوستی همراه با عفونت می‌شود. درمان زخم‌های دیابتی یکی از چالش برانگیزترین موضوعات درمانی در تحقیقات پزشکی است. در سرتا سر جهان درمان‌های گوناگونی جهت التیام زخم ها به ویژه زخم‌های دیابتی تحت بررسی است و اخیرا" استفاده از سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های فیبروبلاست در التیام زخم دیابتی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۳). فیبروبلاست ها سلول‌هایی هستند که دارای شبکه سیتوپلاسمی شاخه‌ای همراه با یک یا چند هسته می‌باشند واز فراوانترین سلول‌های بافت همبند محسوب می‌شوند. این سلول‌ها از مزانشیم مشتق شده‌اند و در ساخت کلاژن، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، فیبرهای مشبک و ارتجاعی و گلیکوپروتئین‌های موجود در ماتریکس برون سلولی نقش مستقیم دارند (۴،۵). بررسی‌ها حاکی از اثرات مثبت سلول‌های بنیادی بر التیام زخم های پوستی است (۶،۷). نتایج تحقیقات، عملکرد موثر سلول‌های بنیادی بر زخم‌های دیابتی را نشان می‌دهند (۸). شواهد بدست آمده از تحقیقات گواه بر اثر مثبت سلول‌های کراتینوسیت، اندوتلیال و فیبروبلاست بر زخم‌ها می‌باشد (۹). یافته های اخیر دید جدیدی از رفتار سلول‌های فیبروبلاست در روند بهبود زخم‌های پوستی را نمایان کرده‌اند (۱۰). نتایج آزمایشگاهی مشخص کرده‌اند سلول‌های فیبروبلاست در ترمیم زخم‌های دیابتی می توانند مؤثر می‌باشند (۱۱)، گرچه نوع تیمار زخم‌ها با سلول‌های فیبروبلاست می‌تواند بر سرعت التیام زخم تاثیر گذار باشد. همچنین، بررسی مکانیسم اثر سلول‌های فیبروبلاست بر ترمیم زخم‌های دیابتی به ویژه از نظر تولید کلاژن نیز در شناخت مسیر درمانی بسیار مهم می باشد. مطالعات قبلی عمدتا" به بررسی اثرات تیمار موضعی با سلول‌های فیبروبلاست بر التیام زخمها معطوف بوده و اثرات تزریق ساب‌درمال سلولهای فیبروبلاست بر التیام زخم دیابتی کمتر مورد تحقیق قرار گرفته است.

با توجه به شیوع و گستردگی قابل ملاحظه‌ی اختلالات ناشی از دیابت بخصوص زخم‌های دیابتی در جهان (۱۲) و نیز با توجه به عوارض مهم بالینی، روانی، اجتماعی و اقتصادی حاصل از زخم های دیابتی در مبتلایان (۴) و همچنین با توجه به محدودیت مطالعات قبلی در خصوص موضوع مورد و نیز محدودیت درمان‌های دارویی در التیام زخم‌های دیابتی، این پژوهش به بررسی التیام زخم دیابتی و تغییرات کلاژن متعاقب تزریق سلول‌های فیبروبلاست در موش‌های صحرایی نر می‌پردازد و یافته‌های این پژوهش می‌تواند در حوزه‌ی سلول درمانی رخم‌های دیابتی دارای کاربرد باشد.

روش تحقیق

در این پژوهش رضایت نامه کتبی از بیمار دهنده بافت قبل از نمونه گیری دریافت گردید. در طول پژوهش، تمامی قوانین بین‌المللی حقوق حیوانات، بر اساس استانداردهای بین‌المللی رعایت گردید.

جمع آوری نمونه

در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی نمونه پوست ختنه‌گاه از ۳۰ اهداکننده با رعایت اخلاق در پژوهش و کسب رضایت والدین پس از زایمان در بیمارستان اکبرآبادی در تهران از نوزادان تازه متولدشده دریافت شد. ظرف‌های نمونه به روش استریل به آزمایشگاه منتقل شد.

تهیه بافت پوست ختنه‌گاه و استریلیزاسیون بافت پوست

ابتدا پوست ختنه‌گاه (مربوط به نوزاد) مورد استریلیزاسیون قرار گرفت. بدین منظور پوست ختنه‌گاه به لوله فالکون حاوی ۵ سی‌سی بافر HBSS که در ۴ درجه قرار داشت منتقل شد. لوله فالکون حاوی نمونه در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه کشت سلول انتقال یافت و تا زمان جداسازی در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار (کلاس ۲) (پارس آزما)، نمونه پوست به کمک قیچی و پنس جراحی استریل، در پتری دیش باکتریولوژیک ۶۰ میلی‌متری حاوی PBS بریده و باز شد. نمونه پوست به مدت ۳۰ ثانیه در فالکون حاوی ۱۰ سی سی الکل۷۰ درصد غوطه‌ور شد تا از آلودگی احتمالی میکروبی جلوگیری شود. نمونه پوست، سه بار در فالکون حاوی PBS شستشو داده شد (۱۳،۱۴).

جداسازی درم از اپیدرم

پوست ختنه‌گاه در پتری دیش جدید حاوی PBS قرار داده شد و بافت چربی، رگ‌ها و قسمتی از درم توسط قیچی برداشته شد. پوست توسط قیچی به قطعاتی برش داده شد. قطعات پوست به لوله فالکون حاوی آنزیم دیسپاز و بافر HBSS منتقل شد. لوله فالکون حاوی بافت برای ۱۶-۱۸ ساعت به طور افقی در یخچال قرار داده شد. آنزیم دیسپاز یک پروتئاز قوی است که سبب جدایی لایه اپیدرم از درم می گردد. روز بعد اپیدرم به دقت بررسی شد. وقتی که اولین جداسازی اپیدرم در لبه‌های پوست قابل مشاهده شد، محتویات داخل فالکون به یک پتری دیش جدید منتقل شد و با استفاده از پنس نوک باریک، درم جدا و به یک پتری دیش منتقل شد (۱۵).

جداسازی سلول‌ها از درم و کشت سلول‌ها

درم در داخل پتری دیش با استفاده از اسکالپل کاملا خرد شد. سپس آنزیم کلاژناز (BioTec, USA) به دیش اضافه و چند بار به آهستگی محتویات دیش مخلوط شد تا آنزیم به طور یکنواخت داخل ظرف پخش شود. دیش به مدت ۲ ساعت در انکوباتور (BioTec, USA) قرار داده شد. در طی این مدت، دیش چند بار تکان داده شد تا همه بافت در معرض آنزیم قرار گیرد. محتویات داخل دیش به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ سی‌سی محیط کشت DMEM-HG دارای ۱۰ درصد FBS منتقل شده و حدود ۳۰-۲۰ بار پیپتاژ شد. محتوای فالکون از فیلتر با منافذی به اندازه ۷۰ میکرومتر عبور داده شد تا سلول‌ها از قطعات بافتی جدا شوند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰ در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. محیط رویی تخلیه شد و بر روی ته نشست سلولی، ۵ سی سی محیط کشت DMEM-HG فاقد سرم ریخته شد. مجددا" سلولها به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰ در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند (۱۶). 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 ۳۷ درجه با فشار ۵ درصد CO^2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. یک روز بعد از جداسازی، تعویض محیط انجام شد تا سلول‌های مرده حذف شوند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲-۳ روز تعویض گردید. پس از کشت اولیه و نیز طی روزهای بعد که تکثیر سلول ها ادامه داشت، فرایند رشد سلول‌ها مورد کنترل قرار گرفت و در روزهای مختلف پس از کشت و نیز پس از پر شدن فلاسک، از سلول‌های تکثیر یافته به وسیله میکروسکوپ اینورت (BioTec, USA) ، تصاویر میکروسکوپی تهیه شد (۱۷).

تعیین هویت سلول‌های فیبروبلاست

ابتدا سلول‌های جدا شده از بافت بر روی لام سیالینیزه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت لام را با استون-متانول فیکس کرده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در

مایکروویو و درون بافر با PH =۹ قرار داده شد. پس از سرد شدن لام در دمای محیط، 5 دقیقه شستشو با بافر تریس بورات (TBE) صورت گرفت. سپس آب اکسیژنه بر روی لام ریخته شد و پس از 5 دقیقه دوباره شستشو انجام گرفت. اطراف ناحیه سلولی مورد نظر با ماژیک مخصوص ICC مشخص و ۱۰۰ میلی‌لیتر آنتی بادی ضد ویمنتین (Sigma-Aldrich) بر روی آن ریخته شد. سپس لام در محیط مربوط و سر بسته به مدت ۱ ساعت قرار گرفت و سپس آنتی بادی ثانویه بر روی لام ریخته شد و پس از ۳۰ دقیقه، شستشو انجام گرفت. در ادامه دی‌آمینوپراکسیداز (کروموژن) اضافه شده و پس از ۱۰ دقیقه، شستشو با آب شیر انجام گرفت. جهت رنگ آمیزی هسته‌ها، لام به مدت ۱ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین قرار گرفت و پس از آن شستشو با آب شیر صورت گرفت. آبگیری و شفاف کردن با قرار دادن لام به ترتیب در الکل‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۶ هر کدام سه ضربه، الکل ۱۰۰ یک دقیقه، الکل گزیلل ۳ ضربه و گزیلل ۵ دقیقه صورت گرفت و لام با چسب مخصوص مونته شد (۱۸).

بررسی میزان مرگ سلولی در فیبروبلاست

جهت بررسی سلامت و کیفیت سلول‌ها قبل از پیوند، از کیت انکسین استفاده شد. نمونه در فلاسک ۲۵ (پاساژ ۳، تراکم ۸۰ درصد و ۱۰۶ سلول) جهت بررسی میزان مرگ سلولی و نکروز به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال شد. روند آماده‌سازی نمونه به این صورت بود که سلول‌ها ابتدا با PBS یک بار شستشو و سانتریفوژ شدند (۵ دقیقه و ۳۰۰ دور در دقیقه). مایع رویی دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال انکسین به سلول‌ها اضافه شد. سپس انکسین V و یدید پروپیدیوم (PI) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شدند. در نهایت به لوله‌ها ۴۰۰ میکرولیتر بافر اتصال اضافه شد و خوانش انجام شد (۱۹).

القای دیابت در حیوان آزمایشگاهی

۱۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از مؤسسه پاستور خریداری گردیده و در قفس‌های مخصوص نگه‌داری شدند. دمای اتاق حدود ۲±۲۲ درجه سانتیگراد بود که با برنامه نوری شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی که با شروع روشنایی صبحگاهی در ساعت حدود ۸ همراه بوده است و آب و غذا به صورت نامحدود در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت. هر روز آب حیوانات تعویض و آب تازه در اختیار آن‌ها قرار می‌گرفت. به منظور ایجاد مدل دیابت، مطابق با مطالعات پیشین (۳۰) با استفاده از تزریق یک دوز ۵۰ میلی‌گرم استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت داخل صفاقی، دیابت در رت‌ها القا گردید. پس از گذشت سه روز از تزریق، علایم دیابت مانند پرنوشی و پر ادراری در رت‌ها ظاهر گردید. ۴ روز پس از تزریق STZ سطح گلوکز در نمونه خون گرفته شده از دم با استفاده از گلوکومتر اندازه‌گیری شد. رت‌هایی که میزان گلوکز خون آن‌ها بیش از ۲۴۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود، به عنوان رت‌های دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۰). درصد مرگ و میر حیوانات حدود ۲۰ درصد بود.

مدل زخم در حیوان دیابتی

با هدف ایجاد زخم در پشت حیوان مطابق مطالعات پیشین، پس از ایجاد دیابت و اندازه گیری میزان قند خون، موش‌ها بیهوش و ناحیه پشتی آنها با آب و مایع دستشویی خیس و توسط تیغ کاملا موزدایی شد. سپس این ناحیه با الکل و بتادین ضدعفونی گردید و پس از آن با قرار دادن پانچ ۰/۸ میلی‌متر استریل در ناحیه پشتی موش‌ها، زخمی مشابه قالب با برداشتن تمام ضخامت پوست شامل اپیدرم و درم ایجاد شد. آنگاه ناحیه زخم با گاز استریل و نرمال سالین تمیز گردید (۲۱).

تزریق سلولهای فیبروبلاست

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 (۲۲).

آنالیز بسته شدن زخم

با هدف بررسی میزان ترمیم و بسته شدن زخم، ظاهر زخم، میزان ترمیم و بسته شدن آن در روزهای ۷ و ۲۱ پس از تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. با هدف ثبت تصاویر ناحیه زخم در روزهای مختلف، پانسمان‌ها پس از بیهوش شدن حیوانات برداشته شدند و عکس‌برداری از حیوانات در شرایط یکسان و استاندارد در اتاق عمل انجام شد. جهت بررسی سطح زخم در روزهای مختلف، عکسهای گرفته شده از سطح زخم با استفاده از نرم افزار Image J (Any (Java-based)) ارزیابی شد.

رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم

جهت بررسی میزان کلاژن، نمونه‌های بافت پوست در گروههای کنترل و تیمار در روزهای ۷ و ۲۱ از محل ترمیم زخم برداشته شد و مورد رنگ آمیزی ماسون تری کروم (Mason's trichrome) انجام گرفت. در این راستا، پس از پارافینه کردن بافت و تهیه برشهای بافتی، مقاطع بافتی توسط گزیلول و درجات مختلفی از الکل از درجات بالا به پایین دهیدراته شدند. سپس لامها در محلول بوئن به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد. آنگاه آب‌کشی با آب دیونیزه جهت شستشو و اطمینان از اینکه تمام اسید پیکریک خارج شده باشد، انجام گرفت. سپس رنگ آمیزی در هماتوکسیلین ویگرت به مدت ۵ دقیقه و آبکشی در آب دیونیزه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. همچنین رنگ آمیزی در محلول اسید فوشین به مدت۵ دقیقه و دوباره آب‌کشی در آب دیونیزه انجام شد. لامها در محلول فسفوتنگستیک اسید و فسفومولیبدیک اسید به مدت ۵دقیقه و سپس در محلول آنیلین بلو به مدت 5 دقیقه و اسید استیک ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد. سپس دهیدراته کردن لامها توسط درجات مختلفی از الکل (درجات پایین به بالا) و همچنین شفاف کردن و الکل‌گیری توسط گزیلول انجام شد و لامها مونته گردیدند.

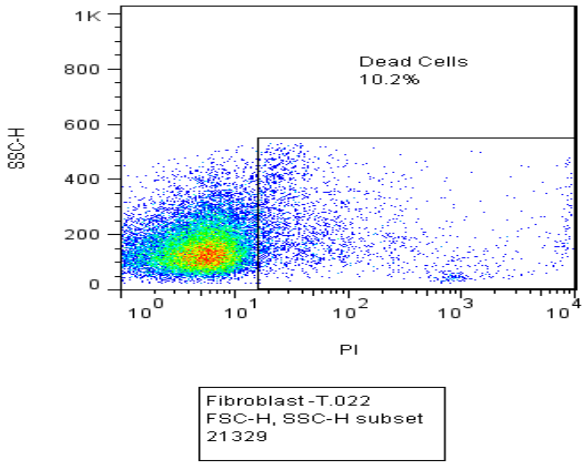
آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزارIBM SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف وضعیت نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. در نهایت داده ها با استفاده از آزمون تی– تست و آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف بین گروهها در سطح $\alpha<۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

زنده مانی سلول ها در روز جداسازی

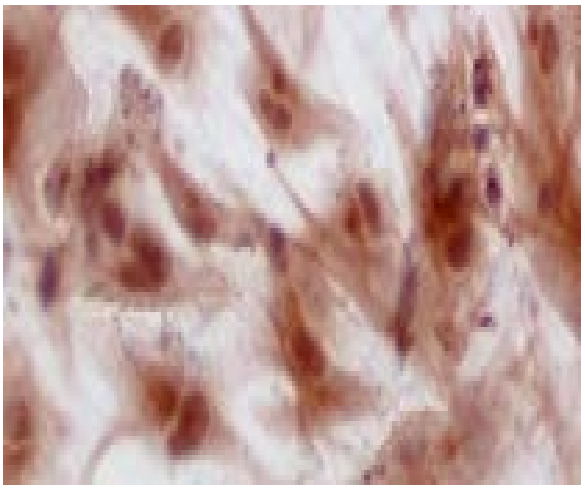
نتایج فلوسایتومتری نشان دادند که درصد بالایی از سلول‌های فیبروبلاست (۸۹/۲ درصد) در روز جداسازی زنده هستند و تعداد کمی از آنها دچار مرگ سلولی (آپوپتوز) گردیده اند (شکل۱).



شکل۱. نتایج فلوسایتومتری مربوط به درصد آپوپتوز در فیبروبلاست ها

تعیین هویت سلولهای فیبروبلاست

در بررسی میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از بافت و رنگ آمیزی 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).



شکل ۲. رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی فیبروبلاست‌ها برای مارکر ویمنتین (بزرگ نمایی400 ×)

ترمیم زخم

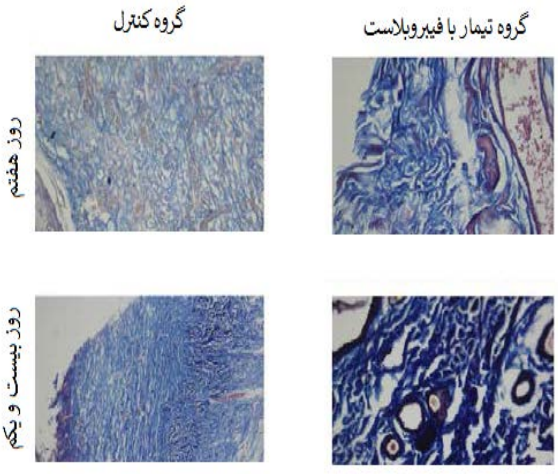
مشاهدات مورفولوژیک زخم نشان دادند که میزان بسته شدن زخم در گروه تزریق فیبروبلاست نسبت به گروه کنترل با سرعت بالاتری انجام شد. در روز هفتم در گروه تزریق، زخم درحال بسته شدن و اسکار در حال محو شدن بود، در حالی که در گروه کنترل میزان بسته شدن زخم کمتر بود. روز ۲۱ و در گروه تیمار زخم کاملا" بسته شده و رشد مو در ناحیه زخم کاملا مشهود بود، حال آنکه ترمیم زخم در گروه کنترل به میزان کمتری بود (شکل۳).



شکل۳. بررسی مورفولوژیک بسته شدن مکانیکی زخم در گروه‌های کنترل و تزریق سلول‌های فیبروبلاست در روزهای ۰،۷،۲۱

رنگ آمیزی ماسون تری کروم

مشاهدات کیفی بافتی توسط پاتولوژیست نشان دادند که میزان تولید کلاژن در گروه تزریق فیبروبلاست در روزهای ۷ و به ویژه روز ۲۱ نسبت به گروه کنترل دارای میزان بیشتری بود (شکل۴).



شکل۴. بررسی تشکیل کلاژن در رنگ آمیزی ماسون تری کروم در گروه های کنترل و تزریق فیبروبلاست در روزهای ۷ و ۲۱.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی فیبروبلاست دارای اهمیت قابل توجه‌ای در حوزه ترمیم

زخم‌های دیابتی می‌باشند (۲۴،۲۳). در این راستا، نتایج این مطالعه نیز نشان دادند که سلول‌های بنیادی فیبروبلاست مشتق از پوست ختنه‌گاه می‌توانند سبب تسریع ترمیم زخم‌های دیابتی در موش‌های صحرایی نر گردند. موافق با این یافته پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی در ترمیم زخم‌ها به ویژه زخم‌های دیابتی تأثیرگذار می‌باشند. نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته در خصوص تاثیر ترشحات سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی انسان بر التیام زخم‌های دیابتی بیانگر آن است که استفاده از ترشحات سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی انسان موجب افزایش استحکام زخم دیابتی می‌شود (۲۵).

همچنین نتایج آزمایشات انجام شده در خصوص توانایی درمانی سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی کاشته شده بر داربست کلاژنی برای بازسازی پوست مبین توانایی سلول‌های بنیادی جداسازی شده از بافت درم در ترمیم زخم در شرایط درون‌تنی می‌باشد (۲۶). از سویی تجربیات آزمایشگاهی در خصوص تاثیر سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی بر فاکتورهای التهابی مؤثر در ترمیم زخم دیابتی در مدل حیوانی مؤید آن است که سلول‌های بنیادی می‌توانند شاخص‌های التیام زخم را بهبود بخشند (۲۷).

همچنین نتایج مطالعات اخیر در خصوص بکارگیری فیبروبلاست در ترمیم به شیوه ثانویه در زخم‌های جلدی حاکی از آن است که این سلول‌ها از طریق اپی‌تلیالیزاسیون سریع و انقباض مؤثر در ناحیه زخم، تأثیر مفیدی در ترمیم زخم‌های پوستی دارند (۲۸). همچنین نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در خصوص تاثیرسلول‌های بنیادی فیبروبلاستی بر بهبودی زخم‌های پوستی در موش‌های دیابتی بیانگر آن هستند که این سلول‌ها می‌توانند از طریق بازسازی فنوتیپ‌های ماکروفاژ، ترمیم عملکردی سلول‌های اندوتلیال عروقی را تحریک کنند که ممکن است در تسریع قابل توجه ترمیم زخم در موش‌های دیابتی نقش داشته باشد (۲۹).

در مقابل برخی یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی فیبروبلاست دارای اثر قابل توجه‌ای بر ترمیم زخم‌ها نیستند. در این خصوص نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته در باره اثرات سلول‌های بنیادی در ترمیم زخم در رت بیانگر آن است که سلول‌های بنیادی چه به تنهایی و یا همراه با داربست نمی‌توانند ترمیم زخم را بهبود بخشند (۲۱). همچنین اعتقاد بر این است که پیوند ضعیف سلول‌های بنیادی پیوند شده از موانع مهم در کارآیی درمانی آن‌ها در بازسازی زخم‌هاست (۲۴).

درباره مکانیسم اثرات تزریق سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی مشتق شده از پوست ختنه گاه بر ترمیم زخم دیابتی احتمالا باید گفت که این سلول‌ها با مهاجرت به بافت‌های آسیب‌دیده باعث بازسازی بافت‌های آسیب دیده می‌شوند (۲۶). چرا که این سلول‌ها ، فاکتورهای رشد مختلفی را تولید و ترشح می‌کنند که در ترمیم و بازسازی بافتی نقش دارند. سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی به واسطه تولید فاکتورهای ضد فیبروتیک و آنژیوژنیک به ترتیب باعث مهار فیبروز بافتی و تحریک آنژیوژنز می‌شوند.

به علاوه این سلول‌ها قابلیت ترمیم سیستم ایمنی و سرکوب سیستم ایمنی را نیز دارند. همچنین از آپوپتوز سلولی جلوگیری می‌کنند. اکثر موادی که توسط سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی ترشح می‌شوند شامل فاکتورهای مختلف رشد، سایتو کاین‌ها، کموکاین‌ها، میکروRNAها و وزیکول‌های خارج سلولی (میکرووزیکول‌ها و اگزوزوم‌ها) می‌باشند (۱۱).

همچنین وظیفه اصلی سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی، رهایش مولکول‌های زیست فعال است که خاصیت ضدآپوپتوزی و عدم تولید اسکار، افزایش رگ‌زایی و تسریع فرآیند ترمیم را دارند (۲۱،۲۰). از سویی مطالعات قبلی بیانگر قدرت بالای سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی در

القای سنتز کلاژن بوده، می‌توانند به طور اثربخشی بیان ژن‌های تولید کننده کلاژن را به مقدار زیادی افزایش بدهند و بدین ترتیب در التیام زخم تاثیر گذار باشند (۸).

تحقیق حاضر در محدوده بررسی التیام زخم دیابتی و تغییرات کلاژن متعاقب تزریق سلول‌های فیبروبلاست در موش‌های صحرایی نرانجام گرفته و از نظر تمرکز بر اثرات تزریق زیرپوستی سلول‌های فیبروبلاست بر التیام زخم دیابتی دارای یافته های قابل توجهی است، اما با توجه به محدودیت پشتیبانی مالی و تسهیلات در دسترس محققین این پژوهش، امکان بررسی موضوع در سطح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه بیان ژن‌ها و پروتیین‌های موثر در ترمیم زخم دیابتی و نیز مطالعات میکروسکوپ الکترونی فراهم نگردید، امید است در آینده امکان بررسی این موضوع در سطوح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه از نظر تاثیر تزریق سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی بر بیان ژن‌ها و پروتیین‌های مرتبط با کلاژن و ترمیم زخم دیابتی فراهم آید.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که تزریق ساب‌درمال سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی مشتق شده از پوست ختنه گاه در ناحیه زخم دیابتی می‌تواند به طور موثری سبب افزایش میزان کلاژن در ناحیه زخم و تسریع التیام زخم دیابتی گردد. بر این مبنا استفاده از سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی جدا شده از پوست ختنه گاه می‌تواند در سلول درمانی به ویژه در حیطه التیام زخم‌های مزمن پوستی حاصل از دیابت مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با مجوز کمیته اخلاق در پژوهش های زیست‌پزشکی از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 اجرا گردید. این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته و بدین وسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت‌های مالی این مرکز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. Physiological reviews. 2013;93(1):137-88.
2. Armstrong DG, Boulton AJ, Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence. New England Journal of Medicine. 2017;376(24):2367-75.
3. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. The Journal of clinical investigation. 2018;128(1):26-35.
4. Li M, Liang Y, He J, Zhang H, Guo B. Two-Pronged Strategy of Biomechanically Active and Biochemically Multifunctional Hydrogel Wound Dressing to Accelerate Wound Closure and Wound Healing. Chemistry of Materials. 2020;32(23):9937-53.
5. Kucharzewski M, Rojczyk E, Wilemska-Kucharzewska K, Wilk R, Hudecki J, Los MJ. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. European Journal of Pharmacology. 2019; 843:307-15.
6. Li P, Guo X. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. Stem cell research & therapy. 2018;9(1):1-7.
7. Bertozzi N, Simonacci F, Grieco MP, Grignaffini E, Raposio E. The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing. Annals of Medicine and Surgery. 2017; 20:41-8.
8. Muhamma G, Xu J, Bulte JW, Jablonska A, Walczak P, Janowski M. Transplanted adipose-derived stem cells can be short-lived yet accelerate healing of acid-burn skin wounds: a multimodal imaging study. Scientific reports. 2017;7(1):1-1.
9. Mirzaei-parsa MJ, Ghanbari H, Alipoor B, Tavakoli A, Najafabadi MR, Faridi-Majidi R. Nanofiber-acellular dermal matrix as a bilayer scaffold containing mesenchymal stem cell for healing of full-thickness skin wounds. Cell and tissue research. 2019;375(3):709-21.
10. Yu J, Wang MY, Tai HC, Cheng NC. Cell sheet composed of adipose-derived stem cells demonstrates enhanced skin wound healing with reduced scar formation. Acta biomaterialia. 2018; 77:191-200.
11. L Maranda E, Rodriguez-Menocal L, V Badiavas E. Role of mesenchymal stem cells in dermal repair in burns and diabetic wounds. Current stem cell research & therapy. 2017;12(1):61-2.
12. Zhang S, Chen L, Zhang G, Zhang B. Umbilical cord-matrix stem cells induce the functional restoration of vascular endothelial cells and enhance skin wound healing in diabetic mice via the polarized macrophages. Stem cell research & therapy. 2020;11(1):1-5.
13. Oh EJ, Gangadaran P, Rajendran RL, Kim HM, Oh JM, Choi KY, Chung HY, Ahn BC. Extracellular vesicles derived from fibroblasts promote wound healing by optimizing fibroblast and endothelial cellular functions. Stem Cells. 2021;39(3):266-79.
14. Monfared GS, Ertl P, Rothbauer M. An on-chip wound healing assay fabricated by

xurography for evaluation of dermal fibroblast cell migration and wound closure. Scientific reports. 2020;10(1):1-4.
15. Hu X, Zhang H, Li X, Li Y, Chen Z. Activation of mTORC1 in fibroblasts accelerates wound healing and induces fibrosis in mice. Wound Repair and Regeneration. 2020;28(1):6-15.
16. Saheli M, M, Ganji R, Hendudari F, Kheirjou R, Pakzad M, Najar B, Piryaei A. Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. Archives of dermatological research. 2020;312(5):325-36.
17. Belvedere R, Pessolano E, Porta A, Tosco A, Parente L, Petrella F, Perretti M, Petrella A. 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. 2020;869:172894.
18. Suhaeri M, Noh MH, Moon JH, Kim IG, Oh SJ, Ha SS, Lee JH, Park K. Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. Theranostics. 2018;8(18):5025.
19. Rajendran NK, Houreld NN, Abrahamse H. Photobiomodulation reduces oxidative stress in diabetic wounded fibroblast cells by inhibiting the FOXO1 signaling pathway. Journal of cell communication and signaling. 2021;15(2):195-206.
20. León C, García-García F, Llames S, García-Pérez E, Carretero M, Arriba MD, Dopazo J, Del Río M, Escámez MJ, Martínez-Santamaría L. Transcriptomic Analysis of a Diabetic Skin-Humanized Mouse Model Dissects Molecular Pathways Underlying the Delayed Wound Healing Response. Genes. 2021;12(1):47.
21. Xin Y, Xu P, Wang X, Chen Y, Zhang Z, Zhang Y. Human foreskin-derived dermal stem/progenitor cell-conditioned medium combined with hyaluronic acid promotes extracellular matrix regeneration in diabetic wounds. Stem Cell Research & Therapy. 2021;12(1):1-8.
22. Li Q, Zhao H, Chen W, Huang P, Bi J. Human keratinocyte-derived microvesicle miRNA-21 promotes skin wound healing in diabetic rats through facilitating fibroblast function and angiogenesis. The international journal of biochemistry & cell biology. 2019;114:105570.
23. Sinha M, Sen CK, Singh K, Das A, Ghatak S, Rhea B, Blackstone B, Powell HM, Khanna S, Roy S. Direct conversion of injury-site myeloid cells to fibroblast-like cells of granulation tissue. Nature communications. 2018;9(1):1-9.
24. Ananian CE, Dhillon YS, Van Gils CC, Lindsey DC, Otto RJ, Dove CR, Pierce JT, Saunders MC. A multicenter, randomized, single-blind trial comparing the efficacy of viable cryopreserved placental membrane to human fibroblast-derived dermal substitute for the treatment of chronic diabetic foot ulcers. Wound Repair and Regeneration. 2018;26(3):274-83.
25. Houreld NN, Ayuk SM, Abrahamse H. Cell adhesion molecules are mediated by

photobiomodulation at 660 nm in diabetic wounded fibroblast cells. Cells. 2018;7(4):30.

26. Zeng T, Wang X, Wang W, Feng Q, Lao G, Liang Y, Wang C, Zhou J, Chen Y, Liu J, Gao H. Endothelial cell-derived small extracellular vesicles suppress cutaneous wound healing through regulating fibroblasts autophagy. Clinical Science. 2019;133(9).
27. Sabolinski ML, Capotorto JV. Comparative effectiveness of a human fibroblast-derived dermal substitute and a viable cryopreserved placental membrane for the treatment of diabetic foot ulcers. Journal of comparative effectiveness research. 2019;8(14):1229-38.
28. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling. Frontiers in physiology. 2019;10:270.
29. Zhang HF, Cheng J, Lv Y, Li FS, He GY, Wang B, Cai L, Guo WY. Repeated whole-body exposure to low-dose radiation combined with topical application of basic fibroblast growth factor and zinc accelerates wound healing in diabetic rats. Dose-Response. 2018;16(3):1559325818789845.

The Effects of Subdermal Injection of Fibroblast Cells on Collagen Synthesis and Wound Healing in Diabetic Rat

Zabihi A[1], Mahmoodi M[2]*

1. MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
2. Assistant Prof, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran, minoomahmoodi@yahoo.com

Abstract

***Background*:** In recent years, the number of patients suffering from diabetic ulcers has increased and many studies have shown that stem cells can be effective in healing of skin wounds. Common diabetic wound therapies face serious failures. The aim of this study was to evaluate the healing of diabetic wounds and collagen synthesis following injection of fibroblast cells in male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, streptozotocin induced diabetic male Wistar rats (n=16) were divided into two groups: control and foreskin derived fibroblast treated group. Wounds with a diameter of 0.8 cm were created in the back of rats and after subdermal injection fibroblast cells, the wound was evaluated by photographic method and Mason's trichrome staining on days 7 and 21. Data were analyzed using t-test and one-way analysis of variance.

Results: The healing and collagen synthesis rate significantly increased in fibroblast cells treated group on days 7 and 21 after treatment compared with control group ($P<0.01$).

***Conclusion*:** Subdermal injection of foreskin derived fibroblast cells causes more collagen synthesis and fast healing of diabetic wound, therefore, can be applied in cell therapy.

Keywords: Diabetic wound, Fibroblasts, Foreskin, Masson's trichrome staining, Male rat.

Citation: Zabihi A, Mahmoodi M. The Effects of Subdermal Injection of Fibroblast Cells on Collagen Synthesis and Wound Healing in Diabetic Rat. Yafte. 2021; 23(1):149-160.