

The effect of chitosan hydrogel containing the adipose derived mesenchymal stem cells on burn wound healing in rats

Mahsa Kookayian¹, Rahim Ahmadi^{1*}, Mohammad Ali Nilforoushzadeh², Sona Zare²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran
2. Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: drarahmadi@yahoo.com

Citation: Kookayian M, Ahmadi R, Nilforouszadeh MA, Zare S. The effect of chitosan hydrogel containing the adipose derived mesenchymal stem cells on burn wound healing in rats. Daneshvar Medicine 2021; 29(5):71-82.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14644.1093

Abstract

Background and Objective: Cell therapy is one of the most challenging methods in the world in repairing burn wounds. The aim of this study was to determine the effect of chitosan hydrogel containing adipose-derived mesenchymal stem cells on burn wound healing in an animal model.

Materials and Methods: This study was performed experimentally using 24 Wistar rats. Burn wounds were created on the skin of rats and the animals were divided into two groups (control treated with normal saline) and the group treated with Chitosan hydrogel containing adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. The healing process of burn wounds was evaluated quantitatively and qualitatively after treatment on days 7, 14 and 21 compared to the day 0. The data were analyzed using one-way analysis of variance.

Results: Concentration of 10% chitosan had no significant cytotoxic effect on mesenchymal stem cells and had proper consistency and clarity and SEM microscopy showed suitable porosity in chitosan. The expression of specific markers in mesenchymal stem cells and their potential for differentiation into adipocytes and bone cells confirmed the mesenchymal nature of the cells. Wound area on days 7, 14 and 21 in the chitosan-treated group containing mesenchymal cells was significantly smaller than the control group.

Conclusion: Mesenchymal stem cells transferred by chitosan to the wound site cause accelerated healing of burn wound and therefore, it is important to evaluate the use of this dressing in the healing of burn wounds in patients.

Keywords: Chitosan hydrogel, Adipose-derived mesenchymal stem cells, Burn wound

Received: 05 Jul 2021
Last revised: 30 Oct 2021
Accepted: 23 Nov 2021

بررسی اثر پیوند هیدروژل کیتوسان حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر ترمیم زخم سوختگی موش‌های صحرایی

نویسندگان: مهسا کواکبان^۱، رحیم احمدی^{۱*}، محمدعلی نیل‌فروش‌زاده^۲، سونا زارع^۲

- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران
- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: drrahmadi@yahoo.com

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی

چکیده

مقدمه و هدف: روش سلول درمانی در ترمیم زخم‌های سوختگی از چالش برانگیزترین روش‌های درمانی در دنیا محسوب می‌شود. هدف از این تحقیق تعیین اثر هیدروژل کیتوسان حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم سوختگی در مدل حیوانی بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت تجربی با استفاده از ۲۴ سر موش صحرایی نژاد ویستار انجام شد. زخم سوختگی در پوست موش‌ها ایجاد و موش‌ها به دو گروه کنترل (تحت تیمار با نرمال سالین) و گروه تیمار با هیدروژل کیتوسان حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی تقسیم شدند. روند بهبود زخم سوختگی به صورت کمی و کیفی در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم نسبت به روز صفر مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: غلظت ۱۰ درصد کیتوسان اثر سیتوتوکسیک معناداری بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نداشت و دارای قوام و شفافیت مناسب بوده و بررسی با میکروسکوپ SEM نشانگر تخریب مناسب در کیتوسان تهیه شده بود. بررسی بیان مارکرهای تخصصی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پتانسیل تمایز آنها به سلول‌های چربی و استخوان موید ماهیت مزانشیمی سلول‌ها بود. مساحت زخم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در گروه تیمار شده با کیتوسان حاوی سلول‌های مزانشیمی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کمتر بود.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی انتقال یافته توسط کیتوسان به محل زخم، باعث ترمیم سریع‌تر زخم سوختگی شده و بر این اساس، ارزیابی استفاده از این پانسمان در ترمیم زخم‌های سوختگی در بیماران حایز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: هیدروژل کیتوسان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، زخم سوختگی

مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۸/۱۸

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۲

مقدمه

اساساً زخم، به عنوان یک ضایعه و ناهنجاری ناشی از صدمات فیزیکی یا حرارتی در سطح پوست تعریف می‌گردد که نیازمند درمان بالینی است (۱). پس از یک سوختگی شدید، سطح آسیب‌دیده نسبت به باکتری‌ها آسیب‌پذیر می‌شود که این امر از تضعیف سد محافظتی پوست ناشی می‌شود. پوست نقش مهمی در هموستاز و پیشگیری از تهاجم میکرو ارگانیسم‌ها ایفا می‌کند. در صورت آسیب پوستی، پوشاندن سریع زخم با پانسمان امری ضروری است. حفظ رطوبت محیط در محل زخم، ایجاد تهویه هوا، ممانعت از انتقال میکروارگانیسم‌ها و حذف ترشحات زخم از جمله ویژگی‌های پانسمان ایده‌ال است (۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، گروهی از سلول‌های بنیادی بالغ هستند که به صورت طبیعی در بدن وجود داشته و حضور این سلول‌ها در بافتهای مختلف گزارش شده است. از مهمترین ویژگی‌های این سلول‌ها تعدیل سیستم ایمنی و چند توان بودن آنهاست. بر این اساس، حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در موضع جراحت از شدت واکنش ایمنی بدن کاسته و آن را تعدیل می‌کند (۳) و این امر می‌تواند تأثیر بسزایی در التیام زخم‌ها داشته باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع متعددی مانند مغز استخوان و بافت چربی به دست می‌آیند. بافت چربی نوعی بافت همبند شل است که اغلب سلول‌های آن از نوع چربی می‌باشند، اما در عین حال دارای مخزن قابل توجهی از سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی است (۴).

یافته‌های پژوهش‌های انجام شده درخصوص تأثیر سلول‌های بنیادی بر ترمیم زخم‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی می‌توانند تأثیرات مثبتی در ترمیم آسیب‌های پوستی و زخم‌ها داشته باشد (۵،۶). تحقیقات آزمایشگاهی در رابطه با اثر سلول‌های مزانشیمی بر التیام زخم‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادرند سبب تسریع در ترمیم زخم شوند (۷). یافته‌های تحقیقاتی بیانگر اثرات قابل ملاحظه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم آسیب‌های گوناگون پوستی بوده است. همچنین بررسی‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های

بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر ترمیم زخم نیز اثر قابل توجهی دارند (۸،۹).

هیدروژل، شبکه سه بعدی از پلیمرهای آبدوستی است که ۹۵ درصد قابلیت نگهداری آب را در خود دارد. هیدروژل یک پانسمان جاذب با ساختار پلیمری و نجسب است. این زخم‌پوش‌ها معمولاً از ژلاتین یا پلی‌ساکارید ساخته می‌شود که به وسیله عوامل شبکه‌کننده، شبکه یا به اصطلاح کراس‌لینک شده است. در میان زخم‌پوش‌ها، هیدروژل‌ها که از مواد پلیمری آبدوست تشکیل شده‌اند قابلیت تورم دارند و می‌توانند سطحی سرد را روی زخم ایجاد کنند و در نتیجه درد بیمار را کاهش دهند. شبکه سه بعدی هیدروژل‌ها با قابلیت جذب حجم زیاد آب، در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته و در سیستم‌های رهایش دارو بکار گرفته می‌شود. بهبود زخم‌های سوختگی دربرگیرنده مراحل احیاء، روپوست‌سازی، تکثیر فیبروبلاستی، سنتز و پیدایش رگ‌های خونی می‌باشد. کیتوسان کاندیدایی امیدبخش برای بیمار سوختگی است که می‌تواند لایه جاذب آب و سازگار با محیط زیست را تشکیل دهد که این لایه‌ها می‌توانند مستقیماً روی سوختگی را بپوشانند. همچنین کیتوسان به علت گردش خوب، عدم ایجاد درد، تأثیرات ضد باکتریایی به عنوان یک داروی موضعی مناسب شناخته می‌شود. مزیت دیگر کیتوسان این است که امکان نفوذ اکسیژن را به شکل مناسب ایجاد کرده و بطور طبیعی توسط آنزیم‌های بدن تجزیه می‌شوند (۳).

باتوجه به شیوع زخم‌های سوختگی در جوامع انسانی، به ویژه در جوامع صنعتی که احتمال ایجاد سوختگی و زخم‌های حاصل از سوختگی بالاتر است؛ و عوارض حاصل از زخم سوختگی شامل عوارض بالینی و متعاقباً صرف هزینه‌های قابل توجه درمانی، و نیز با توجه به پیامدهای حاصل از آسیب‌های اجتماعی و روانی حاصل از عوارض زخم‌های سوختگی و همچنین با در نظر گرفتن نقصان‌های موجود در کمیت و کیفیت مطالعات پژوهشی در حوزه کاربرد سلول‌های بنیادی به‌ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در التیام زخم‌ها و نیز کاربرد هیدروژل‌ها جهت پانسمان زخم‌ها، لزوم پرداختن به اثرگذاری این سلول‌ها

مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی تحت بررسی تست‌های ویروسی HCV, HTLV I/II, HIV 1/2, HBV, CMV, EBV Treponema pallidum (Syphilis), Treponema cruzi, West Nile Virus قرار گرفتند تا از سلامتی دهنده‌های سلول‌های بنیادی اطمینان حاصل شود. پس از انجام لپوساکشن، نمونه بافت چربی به آزمایشگاه منتقل شد (شکل ۱). عمل جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی بر مبنای مطالعات پیشین انجام گرفت (۱۵). به طور خلاصه، بافت چربی پس از ریز ریز شدن، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه تحت اثر کلاژناز نوع ۱ قرار گرفته و بعد از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰ RPM، لایه آبی و لایه چربی از هم جدا شدند. پلت حاصل در PBS شستشو داده و از صافی ۱۰۰ میکرومتری عبور داده شد. سلول‌های خونی لیز شده به مدت ۲ دقیقه با بافر حاوی آمونیوم کلراید، پتاسیم بی‌کربنات و EDTA انکوبه شده و متعاقباً مورد سانتریفوژ قرار گرفته و از طریق شستشو با PBS از نمونه حذف شدند و بدین ترتیب پلت حاصل که حاوی فراکشن عروقی استرومایی بود در محیط کشت کامل، شامل MEM- α , HEPES، سدیم پیرووات و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین و گلوتامین تکمیل شده و در نهایت با PBS دوباره به حالت سوسپانسیون درآمد. به منظور تعیین تعداد سلول‌ها، شمارش با لام نئوبار پس از رنگ آمیزی با کریستال و یوله انجام گرفت. به طور معمول از هر ۱ گرم بافت چربی حدود ۱۰۵ × ۱ سلول بدست آمد. سلول‌های بدست آمده، با غلظت ۲ × ۱۰^۳ سلول در هر سانتی متر مربع، بر روی ظرف مناسب کشت شده و پاساژ سلول‌ها تا رسیدن به حد یکنواختی مناسب انجام شد. این سلول‌ها پس از پاساژ سوم از نظر آلودگی‌های ویروسی، مایکوپلازما و اندوتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی ماهیت و پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

نمونه‌های سلولی از نظر بیان سلول‌ها مارکرهای CD90 و CD105 مورد بررسی قرار گرفتند. این کار به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی بودن سلول‌های کشت شده و تکثیر یافته با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و همچنین جهت بررسی پتانسیل تمایزی، قابلیت تمایز سلول‌ها به رده

بر التیام زخمها بیش از پیش احساس می‌شود. بر این اساس مطالعه حاضر به بررسی اثر پانسمان زخم به وسیله هیدروژل کیتوسان حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر سرعت التیام زخم سوختگی در مدل حیوانی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه تهران اجرا گردیده است. در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 و نیز از طرف سازمان پزشکی قانونی کشور با شناسه IR.LMO.REC.1397.021 دریافت شد.

ساخت هیدروژل

بر مبنای تجربیات پیشین (۱۳)، در یک بشر، ۱۰۰ سی سی آب مقطر و ۱۰ سی سی اسید استیک خالص ریخته شد (اسید استیک ۰/۱۷ مولار حاصل می‌شود). ۱ گرم کیتوسان به آن اضافه شد. یک مگنت به داخل بشر انداخته شد و بر روی هیتر قرار داده شد تا در ضمن دریافت گرما، اختلاط تا حل کامل کیتوسان انجام شود. محلول سود غلیظ، با افزودن مقداری پودر NaOH به آب مقطر در داخل بشر تهیه شد. بشر حاوی محلول کیتوسان در زیر هود بر روی هیتر قرار و تحت سنجش با PH متر قرار گرفت. سود، آرام آرام به ترکیب اضافه شد تا PH آن به بازه ۸/۵ تا ۹ برسد. محتویات بشر درون دو لوله فالكون ریخته و سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm انجام شد. با بکارگیری استون، آب از هیدروژل جدا و به زیر هود انتقال یافت.

بررسی ساختار هیدروژل

به جهت بررسی خواص فیزیکی سطحی هیدروژل از جمله تخلخل سنجی، هیدروژل، تحت تصویربرداری با دستگاه SEM قرار گرفت (۱۴).

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، با رعایت اصول اخلاق در پزشکی و دریافت رضایت نامه کتبی، ۱۰ بیمار متقاضی لپوساکشن

شاهد (تحت تیمار با نرمال سالین) و گروه تست (تحت تیمار با هیدروژل کیتوسان حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی) تقسیم بندی شدند. در گروه شاهد محل زخم با نرمال سالین تیمار گردید. در گروه تجربی، ابتدا هیدروژل کیتوسان حاوی سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی قرار داده شد و سپس لایه سیلیکونی محافظ زخم بر روی زخم قرار گرفته و با چسب شفاف پوشانده شد.

بررسی میزان ترمیم زخم

در این مرحله، ظاهر زخم، میزان ترمیم و بسته شدن آن در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. عکسبرداری از حیوان‌ها در شرایط یکسان و استاندارد اتاق عمل در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistic 23 صورت گرفت. جهت مقایسه‌ی مساحت سطح زخم بین گروه‌های کنترل و تیمار شده با "هیدروژل+سلول‌های بنیادی مزانشیمی" در روزهای مختلف به صورت جداگانه از آزمون تی-تست مستقل و جهت مقایسه‌ی تغییرات مساحت سطح زخم در گروه‌ها طی روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی بنفرونی (Bonferroni) استفاده شد. سطح معنی داری با ارزش $P < 0.05$ مشخص گردید. جهت توصیف داده‌ها از $Mean \pm SEM$ استفاده شد.

یافته‌ها

ارزیابی ساختار هیدروژل کیتوسان

نتایج بدست آمده، نشان داده‌اند که غلظت ۱۰ درصد کیتوسان تهیه شده از قوام خوبی برخوردار بوده است. رنگ نمونه‌ها شیری و از شفافیت نسبی برخوردار بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپ SEM مشخص شد هیدروژل‌های ساخته شده با استفاده از روش‌های آنزیمی و شیمیایی در مقایسه با روش فیزیکی دارای منافذ کوچکتری بودند. این امر نشان دهنده ایجاد پیوندهای عرضی بیشتر و کوالانسی قوی‌تر در این

سلولی استخوان و چربی انجام شد (۱۶). بدین منظور نمونه‌های سلولی در پلیت شش خانه قرار داده شدند و سپس با استفاده از محیط‌های تمایزی و فاکتورهای رشد اختصاصی مورد نیاز کشت شدند. بعد از ۲۱ روز سلول‌های تمایز یافته به استخوان با استفاده از رنگ آلزارین رد و سلول‌های تمایز یافته به چربی با استفاده از رنگ اوایل رد رنگ آمیزی شدند و تحت تصویربرداری قرار گرفتند.

کشت سلول‌ها بر روی هیدروژل و بررسی میکروسکوپی

رشد و چسبندگی سلول‌ها

جهت کشت سلول‌ها بر روی هیدروژل مطابق مطالعات پیشین (۱۷)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تریپسینه شده و بر روی هیدروژل منتقل شدند. هیدروژل حاوی سلول در انکوباتور قرار داده شد و هر روز تعویض محیط انجام گرفت و رشد و چسبندگی سلول‌ها توسط میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفت.

بررسی سایتوتوکسیسیته هیدروژل

برای بررسی میزان سمیت هیدروژل برای سلول‌ها، از تست MTT استفاده شد (۱۸). جهت این کار هیدروژل در پلیت ۹۶ خانه تهیه و سلول‌های مزانشیمی با تراکم ۱۰۵ در هر چاهک کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت رویی تخلیه و بر روی هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ریخته و برای ۵ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس DMSO تخلیه و محلول MTT به مدت ۱۰ دقیقه بر روی سلول‌ها ریخته و توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانش شد و نتایج به صورت درصد زنده مانده نسبی سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شد.

ایجاد مدل سوختگی

موش‌ها بیهوش و ناحیه پشتی آن‌ها با مایع آب و مایع دستشویی، خیس و توسط تیغ کاملاً موزدایی شد. سپس ناحیه با الکل و بتادین ضدعفونی و پس از آن با قرار دادن پانچ 8/0 mm 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.

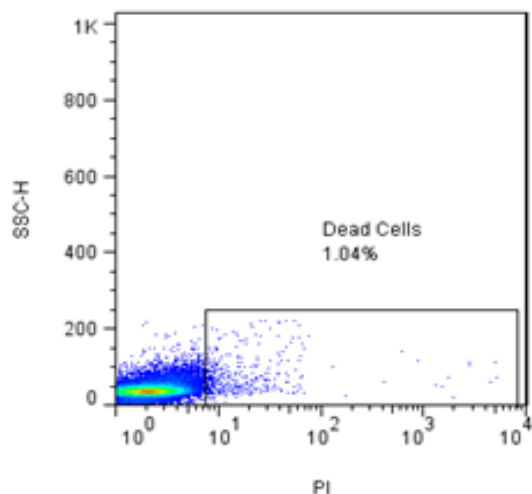
تیمار زخم در موش‌ها

موش‌های دارای زخم به دو گروه ۱۲ سری شامل گروه

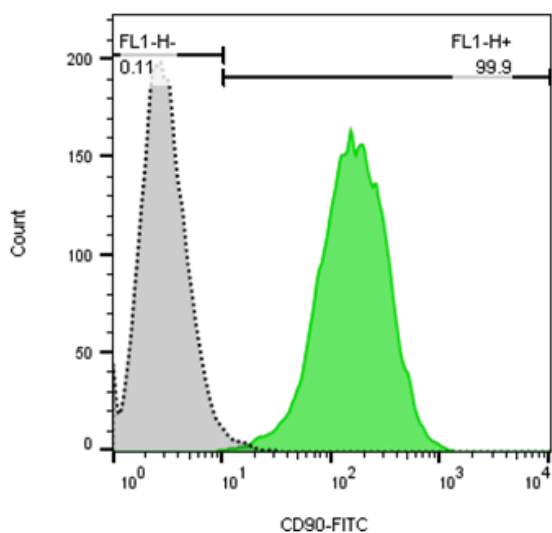
هیدروژل‌ها بود.



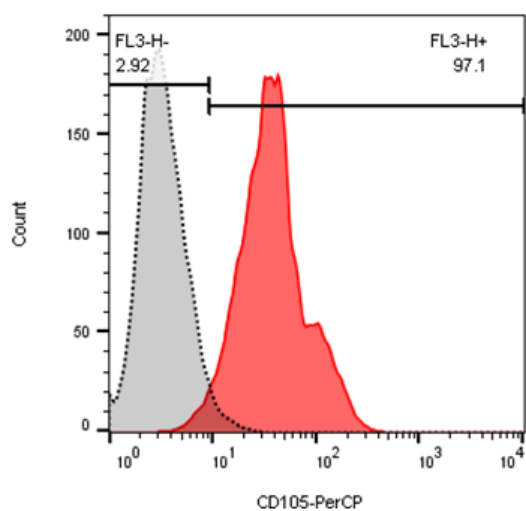
شکل ۱. مورفولوژی پلیمر کیتوسان



شکل ۲. نمودار زنده‌مانی سلول‌های مزانشیمی چربی در روز جداسازی



شکل ۳. بیان مارکر CD90 در سلول‌ها



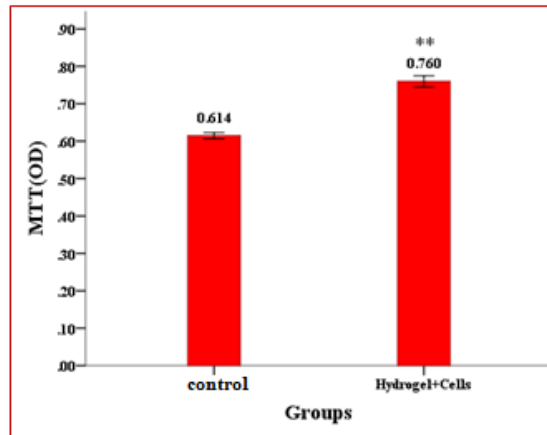
شکل ۴. بیان مارکر CD105 در سلول‌ها

ارزیابی ماهیت سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی نتایج نشان دادند که سلول‌های جداسازی شده از بافت چربی به روش آنزیمی مورد استفاده در این پژوهش، از زنده ماننی بالایی برخوردار بود. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های جدا شده از بافت چربی انسان نشان دادند که میزان زنده ماننی این سلول‌ها در روز جداسازی برابر ۹۸/۹۶٪ و میزان آپتوز آنها برابر ۱/۰۴٪ بوده است. همچنین بررسی بیان مارکرهای تخصصی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی با فلوسایتومتری نشان دادند که این سلول‌ها مارکرهای CD44، CD73، CD90 و CD105 را بیان می‌کنند و مارکرهای CD34 و CD45 را به میزان بسیار کم بیان می‌کنند. از سویی، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی به سلول‌های چربی و استخوان نشان داد که این سلول‌ها، دارای ویژگی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده‌اند.

معنادر درصد زنده مانی سلولها گردید ($P < 0.01$) (شکل ۵).

بررسی سمیت هیدروژل کیتوسان بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمی

بر اساس نتایج تست MTT، هیدروژل تهیه شده نه تنها سمیتی برای سلولهای بنیادی نداشته، بلکه سبب افزایش

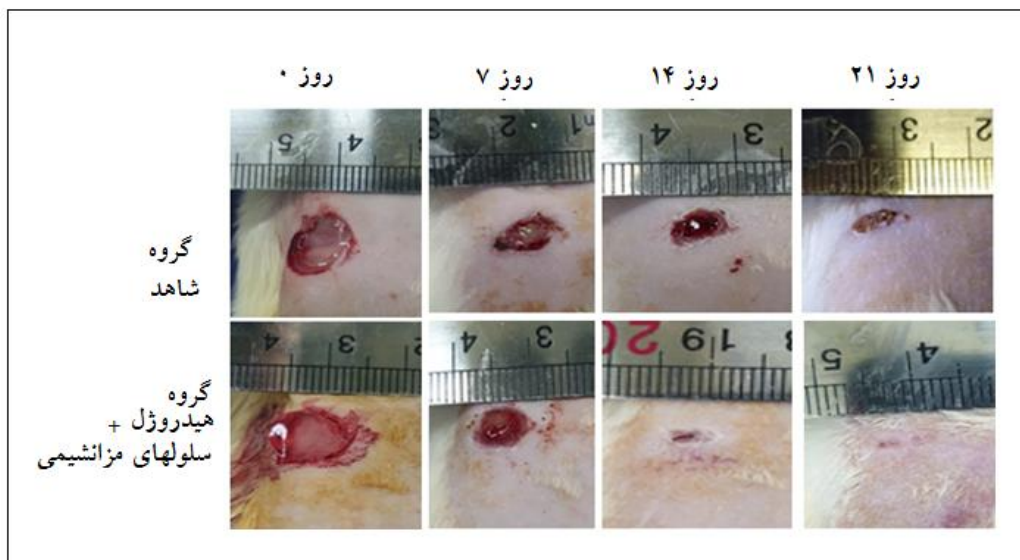


شکل ۵. بررسی سمیت هیدروژل کیتوسان بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمی. OD (چگالی نوری) بیانگر میزان زنده مانی سلولها بوده و ** نشانگر تفاوت معنادر در حد $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

با سرعت بیشتری نسبت به گروه شاهد انجام می گیرد (شکل ۶).

ارزیابی ترمیم زخم

بررسی کیفی ترمیم زخم در گروه تحت تیمار با هیدروژل و سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی نشان داد که ترمیم زخم و جوش خوردن مکانیکی زخم در گروه تیمار



شکل ۶. تغییرات سطح زخم در روزهای ۰ (روز ایجاد زخم)، ۷، ۱۴ و ۲۱ در موش ها

دارای کاهش معناداری بود. از سویی گرچه مساحت سطح زخم در روز ۱۴ نسبت به روز ۷ تفاوت معناداری نداشت اما در روز ۲۱ نسبت به روز ۱۴ کاهش معناداری در سطح

نتایج حاصل از بررسی مساحت سطح زخم با استفاده نرم افزار Image J نشانگر آن بودند که در گروه شاهد مساحت زخم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز ۰

مهم در خصوص ترمیم زخم در گروهها مربوط به تفاوت سطح زخم میان گروه های شاهد و تیمار در روزهای مختلف می باشد. در این راستا نتایج تجزیه و تحلیل تصویرها نشان دادند که مساحت زخم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد به طور معناداری کمتر بوده، این امر نشانگر سرعت بیشتر ترمیم زخم در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد بود.

زخم مشاهده گردید. مساحت سطح زخم در گروه تیمار با "هیدروژل+سلولهای بنیادی مزانشیمی" نیز کاهش معناداری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز ۰ از خود نشان داد. از طرفی بر خلاف گروه شاهد مساحت سطح زخم در روز ۱۴ نسبت به روز ۷ نیز دچار کاهش معناداری گردید. همچنین این کاهش معنادار در روز ۲۱ نسبت به روز ۱۴ نیز مشاهده شد (جدول ۱). اما یافته های

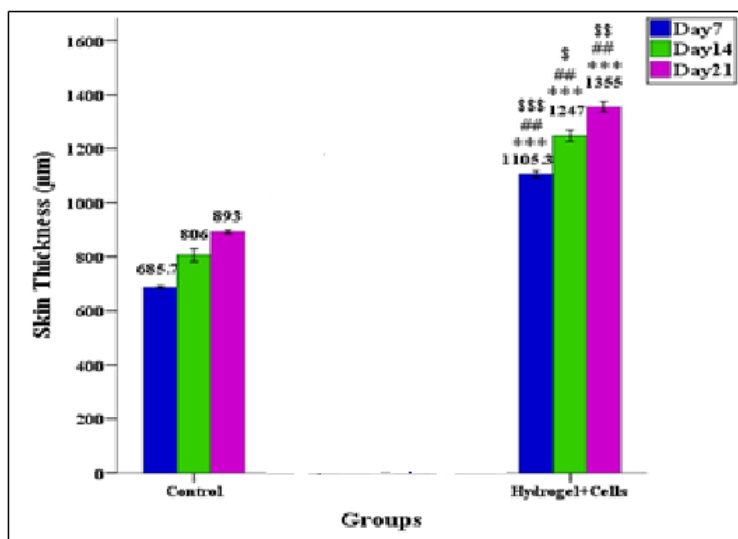
جدول ۱. بررسی مساحت زخم در گروه‌های شاهد و تیمار شده با "هیدروژل+سلولهای بنیادی مزانشیمی" بین روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ در موش‌های صحرایی نر

روز	Mean±SEM	P1 (شاهد)	P2 (شاهد)	P3 (شاهد)	Mean±SEM	P1 (تیمار)	P2 (تیمار)	P3 (تیمار)
روز ۰	۰/۵۹۹±۰/۰۲۹	-	-	-	۰/۵۹۹±۰/۰۲۹	-	-	-
روز ۷	۰/۲۹۴±۰/۰۰۷	P<۰/۰۱	-	-	۰/۲۲۳±۰/۰۱۶	P<۰/۰۱	-	-
روز ۱۴	۰/۲۳۲±۰/۰۲۴	P<۰/۰۱	N.S	-	۰/۰۵۳±۰/۰۰۴	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۵	-
روز ۲۱	۰/۰۵۹±۰/۰۰۵	P<۰/۰۱	P<۰/۰۱	P<۰/۰۰۵	۰/۰۱۷±۰/۰۰۲	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۵

N.S بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار می‌باشد. مقادیر P1 در مقایسه با روز ۰، مقادیر P2 در مقایسه با روز ۷ و مقادیر P3 در مقایسه با روز ۱۴ بیان شده است.

کیتوسان + سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به گروه کنترل نیز در روز هفتم افزایش معناداری پیدا کرده است.

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد میزان ضخامت پوست ناحیه زخم در گروه دریافت کننده‌ی هیدروژل



شکل ۷. مقایسه ضخامت پوست ناحیه زخم بین گروه‌های کنترل، و هیدروژل کیتوسان + سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در مدل حیوانی. * بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل، (P<۰/۰۱، **P<۰/۰۰۱، ***P<۰/۰۰۰۱) و (P<۰/۰۰۵، #P<۰/۰۰۱، ##P<۰/۰۰۰۱، ###P<۰/۰۰۰۰۱) بیانگر

مختلف آسیب‌پذیر می‌شود و بدین ترتیب نیازمند پانسمان سریع می باشد. حفظ رطوبت محیط در محل زخم، ایجاد تهویه هوا، ممانعت از انتقال میکروارگانیسم ها و حذف ترشحات زخم از جمله ویژگی های پانسمان ایده‌آل است (۲). در این راستا، کیتوسان کاندیدایی امیدبخش برای

بحث

زخم، به‌عنوان یک ضایعه و ناهنجاری ناشی از صدمات فیزیکی یا حرارتی در سطح پوست تعریف می‌گردد که نیازمند درمان بالینی است (۱). پس از یک سوختگی شدید، سطح آسیب‌دیده نسبت به میکروارگانیسم‌های

پانسما سوختگی است که می‌تواند لایه جاذب آب و سازگار با محیط زیست را تشکیل دهد و به دلیل زیست سازگاری و قدرت تجزیه پذیری بالا پانسما بسیار مطلوبی در نظر گرفته می‌شود (۳). از سویی، از دیرباز روشهای متعددی جهت التیام زخمهای سوختگی به کار رفته است اما اخیراً استفاده از سلول‌های بنیادی در التیام زخمها مورد توجه محققین قرار گرفته است. اگرچه استفاده از سلول‌های بنیادی در ترمیم زخمها به دلیل پتانسیل سلول‌های بنیادی در القای تکثیر غیرقابل تنظیم مخالفانی جدی نیز دارد، اما با توجه به نتایج شگفت آور بهبودی بخش سلول‌های بنیادی در حوزه ترمیم زخمها به نظر می‌آید اخیراً به کارگیری سلول‌های بنیادی همراه با پانسما این سلولها توسط داربست‌هایی همچون کیتوزان در ترمیم زخمها مورد توجه محققین بالینی قرار گرفته است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی که بر روی هیدروژل کیتوسان سوار شده و به ناحیه زخم انتقال داده می‌شوند، می‌توانند به طور معناداری سبب تسریع التیام زخم سوختگی در مدل حیوانی شوند. در واقع و همراستا با نتایج پژوهش حاضر، تحقیقات دیگری نیز نشان داده اند که هیدروژل‌ها می‌توانند به عنوان یک داربست مناسب جهت انتقال سلول‌ها به بافتهای هدف مورد استفاده قرار گیرند (۱۰). این نوع از هیدروژل‌ها به سلول‌ها آسیب وارد نمی‌آورند و می‌توانند سلول‌ها را به سلامتی به بافت هدف انتقال دهند (۱۱). از طرفی سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافتهای مختلف از جمله بافتهای پوست، بند ناف و مغز استخوان می‌توانند در بهبود زخمهای حاصل از سوختگی، صدمات مکانیکی و بیماری‌ها به ویژه دیابت چه در مدل‌های حیوانی و چه در نمونه‌های انسانی نقش بسیار برجسته ای ایفا نمایند (۲۵-۲۳). پژوهشهای انجام یافته در خصوص اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی بر زخمهای دیابتی نیز نشان دادند که این سلول‌ها می‌توانند با القای تکثیر سلول‌های بافتی و تحریک ترشح عوامل رشد و تکثیر در بافت هدف سبب تسریع التیام زخم شوند (۲۶). همچنین پیوند سلول‌های بنیادی در بافت پوست آسیب دیده نشانگر آن است که سلولهای بنیادی مزانشیمی

می‌توانند اثر بهبودی بخشی بر طیف قابل توجهی از آسیبهای پوستی اعمال نمایند (۲۷،۲۸). طی مطالعات متعددی که در خصوص اثر سلولهای بنیادی مزانشیمی بر فرآیند التیام زخمهای پوستی انجام گرفته است نتایج به وضوح نشان داده‌اند که این سلولها نقش مهمی در التیام زخمهای پوستی ایفا می‌نمایند (۳۱-۲۹). در مقابل، برخی یافته‌های پژوهشی نشان داده اند که استفاده از سلولهای بنیادی به طور کلی نه تنها دارای اثر قابل توجهی بر ترمیم زخم نیستند بلکه می‌توانند خصلت تومورزایی نیز داشته باشند (۳۲). از نظر مکانیسم عمل اثر سلول‌های بنیادی بر ترمیم زخم می‌توان گفت، با توجه به توانایی سلول‌های بنیادی در القای سلول‌های سالم جهت تکثیر و نیز القای رگزایی در بافتهای هدف و از طرفی القای کلاژن سازی و نیز سایر پروتئین‌های درگیر در ترمیم زخم (۳-۵، ۳۲)، این سلول‌ها با تأثیری همه جانبه در مسیر ترمیم زخم قادرند سبب تسریع التیام زخم شوند. تحقیق حاضر در محدوده بررسی اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی بر ترمیم زخم سوختگی و ارزیابی ظاهری ترمیم زخم انجام گرفته و تفسیر نتایج در این حیطه قابل تبیین می‌باشد. با توجه به محدودیت پشتیبانی مالی و تسهیلات در دسترس محققین این پژوهش، امکان بررسی موضوع در سطح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه مطالعات میکروسکوپ الکترونی و بررسی بیان پروتئین‌های موثر بر ترمیم در ناحیه زخم فراهم نگردید؛ امید است در آینده امکان بررسی این موضوع در سطوح ریزتر سلولی و مولکولی فراهم آید. همچنین عدم دنبال کردن وضعیت حیوانات در ادامه زندگی از دیگر محدودیت‌های پیش روی این کار تحقیقاتی محسوب می‌شود.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که هیدروژل کیتوسان ضمن افزایش قابلیت زنده مانی سلولها می‌تواند با انتقال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به محل زخم، باعث ترمیم سریع تر زخم سوختگی شده و بر این اساس بررسی استفاده از این

بدین وسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت های مالی این مرکز تقدیر و تشکر به عمل می آید.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

پانسمان در ترمیم زخم های سوختگی و احتمالاً سایر زخمها در بیماران می تواند مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات پوست و سلول های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است و

منابع

- Lateef H, Abatan OI, Aslam MN, Stevens MJ, Varani J. Topical pretreatment of diabetic rats with all-trans retinoic acid improves healing of subsequently induced abrasion wounds. *American Diabetes Association* 2005;54(3):855-61.
- Moura LI, Dias AM, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—a review. *Acta Biomaterialia* 2013;9(7):7093-114.
- Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells Research* 2014;32(6):1408-19.
- Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, Delbono O. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem Cells and Development* 2013;22(16):2298-314.
- Lim KH, Itinteang T, Davis PF, Tan ST. Stem Cells in Keloid Lesions: A Review. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* 2019;7(5):e2228.
- Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Engineering* 2007;13(6):1299–312.
- Mansilla E, Marin GH, Sturla F, et al. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplantation Proceeding* 2005;37(1):292-294.
- Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjou Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011;93(2):228-234.
- Kim WS, Park BS, Sung JH. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin on Biological Therapy* 2009;9(7):879–887.
- Thakur S, Govender PP, Mamo MA, Tamulevicius S, Thakur VK. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond. *Vacuum* 2017;146:396-408.
- Ishida K, Kuroda R, Miwa M, Tabata Y, Hokugo A, Kawamoto

- T, Sasaki K, Doita M, Kurosaka M. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Engineering*. 2007;13(5):1103-1112.
12. Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, Sugimoto K, Mushimoto K, Morita S, Tabata Y. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Engineering* 2005;11(7-8):1224-1233.
 13. Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports* 2018 25;8(1):1-3.
 14. Sisakht MM, Nilforoushzadeh MA, Verdi J, Banafshe HR, Naraghi ZS, Mortazavi-Tabatabaei SA. Fibrin-collagen hydrogel as a scaffold for dermoepidermal skin substitute, preparation and characterization. *Journal of Contemporary Journal of Contemporary Medical Sciences* 2019;5(1).
 15. Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplantation* 2011;20(2):205-16.
 16. Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, Ran R, Chen Q. Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord. *Scientific Reports* 2018 22;8(1):1-9.
 17. Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports* 2018 25;8(1):1-3.
 18. Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports* 2018 25;8(1):1-3.
 19. Kouhbananinejad SM, Derakhshani A, Vahidi R, Dabiri S, Fatemi A, Armin F, Farsinejad A. A fibrinous and allogeneic fibroblast-enriched membrane as a biocompatible material can improve diabetic wound healing. *Biomaterials Science* 2019;7(5):1949-61.
 20. Kouhbananinejad SM, Derakhshani A, Vahidi R, Dabiri S, Fatemi A, Armin F, Farsinejad A. A fibrinous and allogeneic fibroblast-enriched membrane as a biocompatible material can improve diabetic wound healing. *Biomaterials Science* 2019;7(5):1949-61.
 21. Amiel SA, Aschner P, Childs B, Cryer PE, de Galan BE, Frier BM, Gonder-Frederick L, Heller SR, Jones T, Khunti K, Leiter LA. Hypoglycaemia, cardiovascular disease, and mortality in diabetes: epidemiology, pathogenesis, and management. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019;7(5):385-96.

22. Esteghamati A, Larijani B, Aghajani MH, Ghaemi F, Kermanchi J, Shahrami A, Saadat M, Esfahani EN, Ganji M, Noshad S, Khajeh E. Diabetes in Iran: prospective analysis from first nationwide diabetes report of National Program for Prevention and Control of Diabetes (NPPCD-2016). *Scientific Reports* 2017;7(1):1-0.
23. Cao Y, Gang X, Sun C, Wang G. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *Journal of Diabetes Research* 2017;2017:9328347.
24. Roşca AM, Țuțuianu R, Titorencu ID. Mesenchymal stromal cells derived exosomes as tools for chronic wound healing therapy. *Romanian Journal of morphology and Embryology* 2018;59(3):655-662.
25. Guo J, Hu H, Gorecka J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing in a similar fashion as bone marrow-derived cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2018;315(6):C885-C896.
26. Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Moein Jahromi B, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011;93(2):228-234.
27. Liu R, Chang W, Li J, et al. Mesenchymal stem cells in psoriatic lesions affect the skin microenvironment through circular RNA. *Experimental Dermatology* 2019;28(3):292-299.
28. Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner GC. Stem cell therapies for wound healing. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2019;19(6):575-585.
29. Badillo Andrea T, Redden Robert A, Zhang Liping, Doolin Edward J, Liechty Kenneth W. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. *Cell and Tissue Research* 2007; 329: 301-311.
30. Saheli M, Hosseini A, Piryaei A, Fadaei Fathabadi F, Bandehpour M, Salehi M, Norouzian M. Evaluation of the differentiation process of human bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells: An in vitro study. *Journal of Iranian Anatomical Sciences* 2011; 9: 179-90.
31. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007;25(10):2648-59.
32. Gomez – Guillen M.C, Girmenez B, Lopez – Caballero M.E, Montero M.P. Functional and bioactive properties of Collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 2011;25(8):1813-27.