

ارزیابی بافت شناسی انواع سلول های ماستوسیت در فلاپ پوستی به کمک سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از طریق فاکتور رشد بیولوژیکی

فرزانه چهل چراغی (PhD)*، خاطره عنبری (MD)^۲

۱- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۲- گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

دریافت: ۹۶/۷/۴، اصلاح: ۹۶/۹/۱۸، پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: فلاپ پوستی از روش های شایع در جراحی پلاستیک است. از عوارض فلاپ های پوستی، نکروز فلاپ، پس از جراحی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سلول های مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs) و عصاره جنین جوجه (CEE) بر ماست سل ها در فلاپ پوستی تصادفی در موش صحرایی می باشد. **مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد آلبینو ویستار به وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم، به چهار گروه ۱۰ تایی (کنترل، CEE / BM-MSCs، CEE، BM-MSCs) تقسیم شدند. فلاپ پوستی (۳۰×۸۰ mm) در پشت حیوانات ایجاد شد. روز جراحی روز صفر و مداخله درمانی در همین روز انجام شد. سلول های بنیادی مزانکیمال از مغز استخوان موش صحرایی استحصال و تزریق شد. CEE از جنین ۹ روزه جوجه مرغ نژاد مرنردی تهیه شد. روز هفتم بعد از عمل جراحی، نمونه ها جهت ارزیابی انواع و تعداد کل ماست سل (نوع ۱ تا ۳) در خط انتقالی برداشته شد. **یافته ها:** تفاوت بین میانگین تعداد ماست سل های نوع ۱ (۳/۶۷±۱/۹۱) (p=۰/۰۹۹)، نوع ۳ (۱/۹±۱/۴۷) (p=۰/۳۸۴) در گروه های مختلف مطالعه معنی دار نبود، اما در نوع ۲ (۲/۲۷±۱/۴۲)، در گروه های مختلف مطالعه به لحاظ آماری معنی دار بود (p=۰/۰۰۵). همچنین تفاوت معنی دار آماری بین میانگین تعداد کل ماست سل ها (۲/۳۲±۰/۸۴) در گروه دریافت کننده BM-MSCs با سایر گروه ها تجربی دیده شد (p=۰/۰۰۱). **نتیجه گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه افزایش ماست سل نوع ۲، بهبود عروق کوچک و کاهش نوع ۳ موجب کاهش اسکار و فیبروز می شود. **واژه های کلیدی:** فاکتور رشد بیولوژیکی، ماست سل ها، جراحی فلاپ، CEE.

مقدمه

یکی از انواع جراحی پلاستیک، فلاپ پوستی (Random Skin =RSF) است، فلاپ شایعترین عمل جراحی به منظور ترمیم زخم های ناشی از سوختگی، تروما و نواقص مادرزادی است (۱و۲). اما نکروز ناکامل یا کامل فلاپ های پوستی یکی از مشکلات شایع این نوع جراحی است. در واقع، نکروز به علت آسیب های ایسکمی، پس از عمل ایجاد می شود (۳). مدیریت درمان نکروز معمولاً وقت گیر و نیازمند تغییر مجدد پانسمان زخم، و یا جراحی های متعدد است (۳). فرآیند ترمیم زخم پیچیده بوده و همه مراحل ترمیم به صورت آشناسازی قرار می گیرند. فرآیند التهاب نیز یکی از این مراحل است، که در آن لکوسیت ها، اجزای سیستم کمپلمان، ماست سل ها و کمپلکس های ایمنی در گیر می شود (۴). استراتژی های متعددی در جهت کاهش فرآیند التیام زخم وجود دارد، از جمله این استراتژی ها حضور سلول های بنیادی و فاکتور های رشد است که روند التیام زخم را تقویت می کند، فاکتور های رشد قابل توجه در فرآیند ترمیم شامل transforming growth factor (TGF)، vessels endothelial، growth factor (VEGF)، platelet-derived growth

Factor (PDGF)، basic fibroblast growth factor (b FGF) و endothelial growth factor (EGF) می باشد (۵). سلول ها بنیادی که از مغز استخوان مشتق می شود Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) به طور مشخصی فرآیند ترمیم زخم های پوستی را بهبود می بخشد، و به دلیل شکل پذیری فوق العاده و توانایی ترشح فاکتور های رشد، به عنوان یک منبع مناسب سلول درمانی در اغلب مدل های کلینیکی استفاده می شود (۶). پیوند BM-MSC ها سبب بهتر شدن فرآیند ترمیم زخم- های دیابتی در موش های صحرایی می شود (۷). به نظر می رسد علیرغم تاثیر مثبت فاکتورهای رشد مترشحه از سلول های مزانکیمال، و ایجاد پاسخ مناسب در محیط میکروکنترلر زخم، حضور فاکتورهای رشد آگزوژن، بتواند این اثر را بیشتر کند. یکی از منابع بیولوژیکی غنی از فاکتورهای رشد، عصاره جنین جوجه (CEE) Chicken Embryo Extract است (۸). CEE شامل فاکتور های رشد متعددی است، که بعد از لقاح، تخم، تنها در بیست و یک روز تبدیل به جوجه کامل می شود. با اضافه کردن CEE به محیط کشت سلول، میزان رشد

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۶۱۴-۲-۱۰-۱۰-۱۰ دانشگاه علوم پزشکی لرستان می باشد.

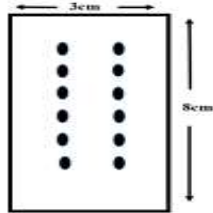
* مسئول مقاله، دکتر فرزانه چهل چراغی

آدرس: لرستان، خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۳۳

روز جراحی (روز صفر) پیوند سلول ها، در گروه های تجربی به تعداد 10×10^6 ، در ۱۲ نقطه مساوی در سمت چپ و راست بستر فلاپ، تزریق شد.
روش تهیه و آماده سازی CEE: CEE از جنین ۹-۱۲ روزه از تخم مرغ های نژاد مرندی از موسسه علوم زیستی تهیه شد، تا زمان انجام کار تخم مرغ ها در انکوباتور با دمای 37°C و میزان اکسیژن ۲۱٪ نگهداری شد. پس از حصول شرایط استریل، جنین ابتدا با قیچی به قطعات کوچک تقسیم شده و سپس به ازای هر ۱ mg از وزن جنین 1ccDMEM اضافه شد. سپس در فالكون ریخته و بروی دستگاه همزن به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس فالكون ها به فریزر 80°C - در مدت زمان ۲۴ ساعت منتقل و در روز بعد فالكون ها در دمای اتاق ذوب و چندین بار سانتریفوژ (با دور ۲۴۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه) شد تا زمانی که محتویات داخل فالكون کاملا شفاف شود. سپس محتویات، از سرنگ 50cc عبور و پس از هموژن شدن در فریزر با دمای 20°C - تا زمان مصرف ذخیره شد. CEE قبل از استفاده در دمای اتاق ذوب و از فیلتر با منافذ $45\ \mu\text{m}$ عبور داده شد، این کار جهت استریل شدن عصاره بود و در روز جراحی (روز صفر) روی بستر فلاپ به میزان ۱ cc در ۱۲ نقطه از ناحیه دیستال به سمت پروگزیمال فلاپ تزریق شد.

محیط درون تنی

طراحی تجربی: تعداد ۴۰ سر موش نر نژاد Albino Wistar Rat با وزن ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم، در ۴ گروه ۱۰ تایی: کنترل، BM-MSCs، CEE، و BM-MSCs/CEE تقسیم شدند. موش ها با کتامین (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند.
ایجاد مدل فلاپ پوستی تصادفی: پوست منطقه پشت موش ها تراشیده و با محلول بتادین ضد عفونی و برای ایجاد RSF، آماده شد. در این مدل تمام ضخامت پوست و عضله پوستی (Panniculus carnosus) برداشته می شود. برای اندازه گیری ابعاد فلاپ، استخوان ایلپاک و اسکاپولا معیار اندازه گیری و، فلاپی به اندازه $80 \times 30\text{ mm}$ ایجاد، سپس با استفاده از مدل sepreate و نخ نایلون $0/4$ بخیه زده شد. روز عمل جراحی به عنوان روز صفر و مداخلات درمانی نیز در همین روز صورت گرفت (۱۸). تزریق سلول، عصاره و یا سالین از منطقه دیستال به سمت پروگزیمال فلاپ یعنی پایه فلاپ صورت گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. طرح شماتیکی از ۱۲ نقطه تزریق، نقاط تیره رنگ، محل تزریق BM-MSC ها، CEE و یا saline می باشد.

ارزیابی کلینیکی: در مشاهده ظاهری در مدت زمان ۷ روز، بافت فلاپ از نظر رنگ، آسسه و التهاب مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۱۹).
ارزیابی بافت شناسی: نمونه گیری از Transitional Line (منطقه آغاز نکرورس) صورت گرفت. نمونه ها جهت فیکساسیون در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. سپس به منظور تشخیص انواع ماست سل ها و دگرانولیشن آنها با ۱۰٪ Toluidine Blue رنگ آمیزی شد. تشخیص انواع ماست سل ها به این

انواع رده های سلولی افزایش می یابد. همچنین، فاکتورهای رشد خاصی در CEE مشخص شده است که به طور ثابتی افزایش پیدا می کنند و نیاز های ترکیبی رشد سلولی را در محیط کشت فراهم می کنند (۱۰ و ۹). حضور CEE، می تواند رشد خودبه خود سلول و تغییرات مورفولوژیکی سلول را افزایش دهد و سبب تغییر بیان ژن سلول شود (۹). آنژیوژنیز به عنوان یک مکانیسم تاخیری در فرآیند التیام زخم، سبب بهبودی همراه با افزایش تعداد عروق خونی می شود که خود سبب افزایش پرفیوژن در فلاپ می شود (۱۱).

چندین مولکول و سلول وجود دارند، که در فرآیند ترمیم زخم نقش مهمی را ایفا می کنند. در مطالعات قبلی به نقش پر اهمیت ماست سل ها در فرآیند های ترمیمی اشاره شده است (۱۲). ماست سل ها در بافت پوست مقیم هستند. ماست سل ها به عنوان یک عامل کلیدی موثر در التهاب و ترمیم زخم شناخته شده اند. این سلول ها حاوی انواعی از فاکتور های رشد و سیتوکین ها هستند، که افزایش در تعداد و دگرانولیشن این سلول ها، همراه با بیان بالای VEGF و نهایتاً آنژیوژنیز همراه است (۱۳). ماست سل ها در سه فاز اصلی ترمیم زخم، شامل: فاز واکنش التهابی، آنژیوژنیز، جذب ماتریکس خارج سلولی و بازسازی آن شرکت دارند. بسیاری از شواهد حاکی از آن است که ماست سل ها، در فرآیند آنژیوژنیز، تحریک و تنظیم رشد و مهاجرت سلول های اندوتلیال و مهاجرت فیبروبلاست ها نقش مهمی دارند (۱۴). هدف از این مطالعه بررسی اثر BM-MSCs و CEE به تنهایی و در ترکیب باهم، بر روی ماست سل ها، دگرانولیشن ماست سل ها و انواع ماست سل های ۱، ۲ و ۳ در یک مدل RSF در موش های صحرایی گروه تجربی نسبت به گروه های کنترل می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان با کد LUMS.REC.۲۰۱۶.۱۴۷-۲۳/۸/۲۰۱۶ مجاز و در دو بخش Invivo و Invitro انجام شد.

محیط برون تنی

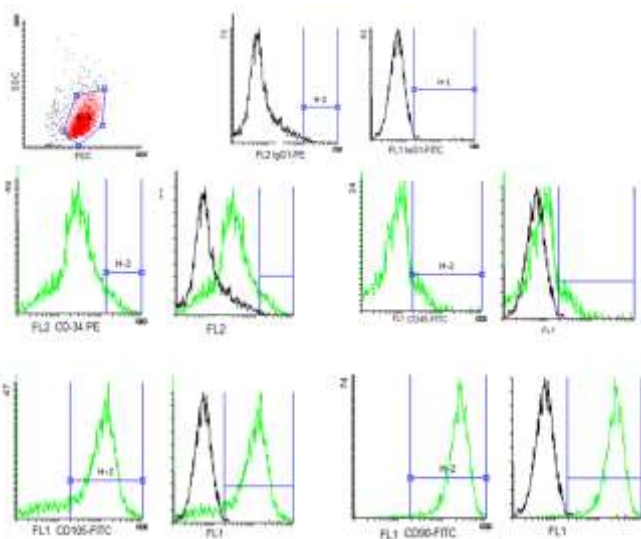
استحصال و نشاندار کردن سلول: جهت استخراج BM-MSCs از استخوان ران موش صحرایی به وزن $300-250\text{g}$ استفاده شد. حیوانات توسط مخلوط کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از ضد عفونی کردن محل با استفاده از وسایل جراحی از حفره مغز استخوان با کمک سرنگ ۵ cc، سر سوزن G۱۸ محتویات مغز استخوان با روش آسپراسیون جمع آوری شد. محتویات سانتریفوژ و سلولهای مشتق از مغز استخوان در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) معلق شد و با استفاده از BM-Ficoll-Paque Density gradient جدا شد (۱۵). به منظور ارزیابی و تایید مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانکیمال، به فلوسایتومتری واقع در مرکز ذخایر ژنتیک ایران ارسال شد. جهت آشکار شدن سلول ها پس از پیوند در بافت مانند تحقیقات قبلی اقدام و قبل از پیوند سلول ها با ماده فلورسنتی $1'-\text{Diocetyl-3,3,3',3'}$ (Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate Molecular Probes) در 37°C برای ۱۵ دقیقه جهت نشاندار شدن انکوبه شد (۱۷ و ۱۶). سپس سلول های نشاندار شده در $5\text{cc}/\text{DMEM}$ برای انتقال نگهداری و در

CD105 به همراه کنترل ایزوتیپی، مزانکیمال و بنیادی بودن سلول‌ها مورد تایید قرار گرفت (شکل ۵).

ردیابی سلول‌ها پیوند شده در بافت؛ در روز هفتم پس از جراحی، سلول‌های مشخص شده توسط CM-DiI در کنار عروق خونی مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۴. مشاهده ماکروسکوپی بخش بقا یافته فلاپ در روز هفتم پس از جراحی، Transitional Line (خط قرمز) مشخص شد.

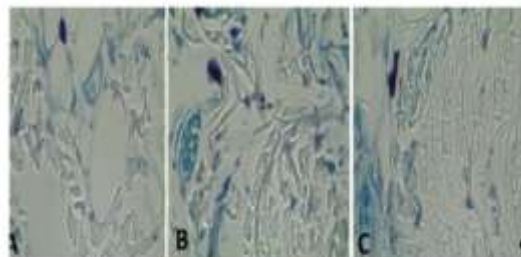


شکل ۵. مقایسه کانال تابشی جانبی (SSC) و کانال تابشی مستقیم (FCS)، میزان تراکم سلول BM-MSCها و دو فرم ایزوتیپ کنترلی را در نمونه هتروژن نشان می‌دهد (نمودار سمت بالا). خصوصیات نشانگر سطح مختلف از جمله CD34، CD45 (نمودارهای میانه)، CD90 و CD105 (نمودارهای پایین) نمایش داده می‌شود.

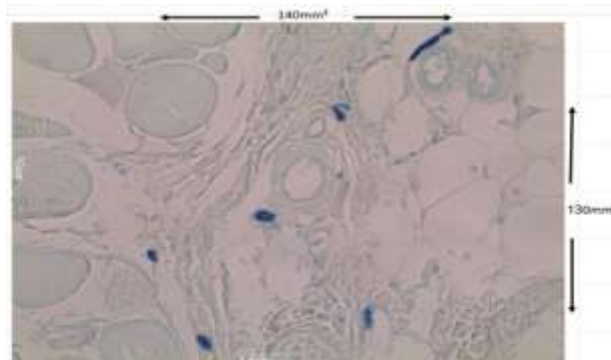


شکل ۶. DiI مثبت در بافت فلاپ.

شرح بود: غشا سلول به طور یکپارچه، کاملاً سالم و محتویات سلولی با رنگ آبی تیره، به عنوان ماست سل‌های نوع ۱، سلولی که در آن گرانول‌ها در حال بیرون ریخته شدن، اما نیمی از غشا سلول حفظ شده بود، عمدتاً به عنوان نوع ۲ ماست سل و سلولی که با آسیب کامل یا ناقص از غشا سلولی همراه بود به عنوان نوع ۳ ماست سل‌ها پیشنهاد شد (شکل ۲) (۱۴). ارزیابی تعداد کل ماست سل‌ها در خط انتقالی فلاپ به کمک تکنیک هیستومورفومتری بر روی فوکوس خطی mm^2 100×100 با بزرگنمایی $\times 100$ انجام شد. بررسی و شمارش ماست سل‌ها در صفحه مشبک ($130 \times 140 mm^2$)، متصل به مانیتور محاسبه شد (شکل ۳).



شکل ۲. سه مرحله از دگرانولاسیون ماست سل در خط انتقالی از فلاپ، روز هفتم پس از جراحی. A، ماست سل نوع ۱؛ B، ماست سل نوع ۲؛ C، ماست سل نوع ۳؛ (رنگ آمیزی Toluidine Blue، بزرگنمایی ایجاد شده $100 \times (10 \mu m)$).



شکل ۳. شمارش سلول‌ها در صفحه مشبک

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نرم افزار SPSS21 استفاده شد. بر اساس ANOVA، تفاوت بین میانگین تعداد کل ماست سل‌ها و انواع ماست سل‌ها در گروه‌های مطالعه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین Post Hoc Test، محل اختلاف بین گروه‌های مطالعه را نشان داد و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

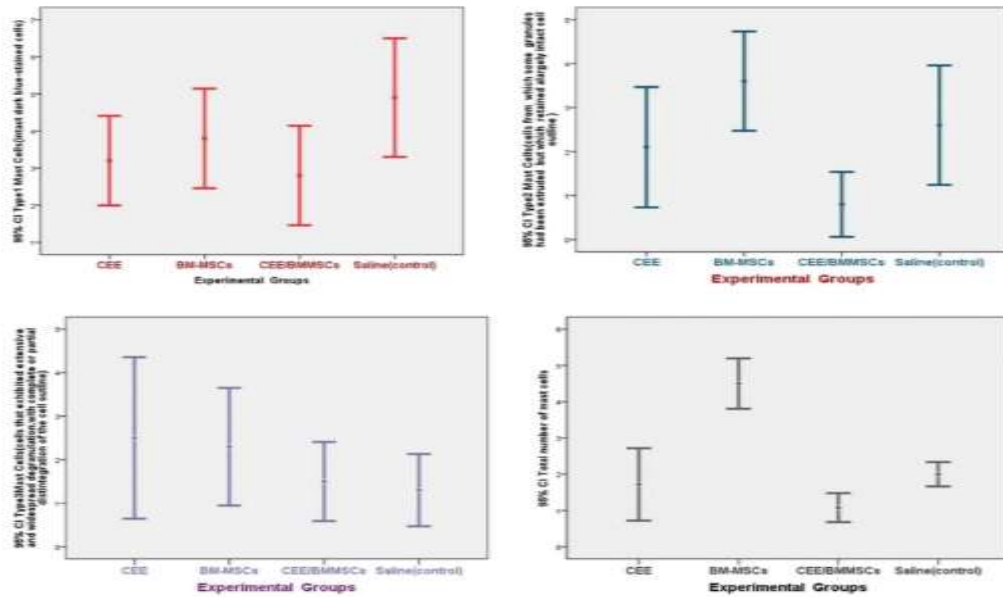
یافته‌ها

مشاهده کلینیکی: در طی گذشت یک هفته از جراحی، در محل RSF التهاب، آبسه و ترشحات دیده نشد و در روز هفتم پس از جراحی، دو منطقه قابل تشخیص بود. منطقه نکروز در بخش دیستال فلاپ، منطقه بقا یافته در بخش پروگزیمال و Transitional Line در گرو‌های مطالعه مشاهده شد (شکل ۴) (۲۱).
 تایید هویت و بنیادی بودن BM-MSCs: به کمک فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌ها بایبان پایین CD45 و CD34 و بیان بالا از، CD90 و

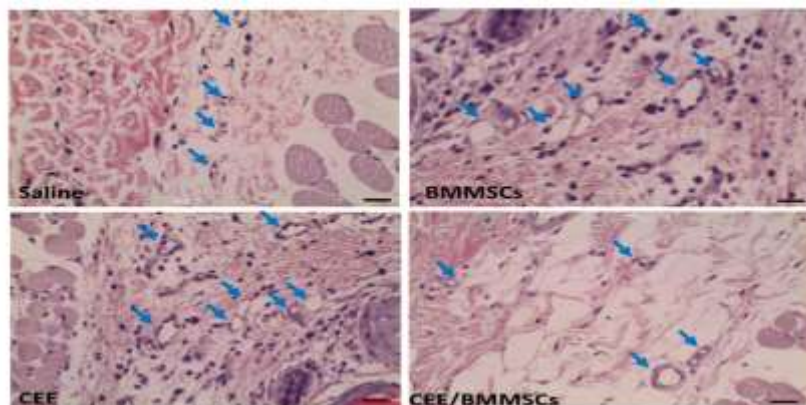
۰/۰۳۲) و گروه دریافت کننده CEE/BMMSCs و گروه سالین (۲/۲±۰/۹۵، $p=۰/۱۱ \pm ۱/۷$) دیده شد. همچنین تفاوت معنی دار آماری بین میانگین تعداد ماست سل ها در گروه دریافت کننده BM-MSCs با گروه دریافت کننده سالین دیده شد ($p=۰/۰۰۱$) (۳/۲۵±۰/۷۲، شکل ۷).

مشاهده عروق کوچک: در مشاهده کیفی عروق کوچک در منطقه خط انتقالی فلاپ های گروه های تجربی، توزیع عروق بیشتر و توسعه یافته تر نسبت به گروه کنترل بود (شکل ۸).

تعداد و دگرانولیشن ماست سل ها: تفاوت بین میانگین تعداد ماست سل های نوع ۱ ($p=۰/۰۹۹$)، نوع ۲ ($p=۰/۳۸۴$) و نوع ۳ ($p=۰/۹۷ \pm ۱/۹$) در گروه های مختلف مطالعه به لحاظ آماری معنی دار نبود. همچنین، تفاوت بین میانگین تعداد ماست سل های نوع ۲ در گروه های مختلف مطالعه به لحاظ آماری معنی دار بود ($p=۰/۰۰۵$)، در آنالیز Post Hoc Test، اختلاف معنی دار بین گروه دریافت کننده CEE با گروه BM-MSCs ($p=۰/۰۰۱$) و $p=۰/۰۰۱$) BM-MSCs و CEE/BMMSCs و نیز بین گروه CEE/BMMSCs و گروه



شکل ۷. بر اساس نتایج ANOVA، نتایج زیر حاصل شد: تفاوت بین میانگین تعداد ماست سل های نوع ۱ در گروه های مختلف مطالعه به لحاظ آماری معنی دار نبود ($p=۰/۰۹۹$) (بالا و چپ). تفاوت بین میانگین تعداد ماست سل های نوع ۲ در گروه های مختلف مطالعه به لحاظ آماری معنی دار بود ($p=۰/۰۰۱$) (بالا و راست). تفاوت بین میانگین تعداد ماست سل های نوع ۳ در گروه های مختلف مطالعه به لحاظ آماری معنی دار نبود ($p=۰/۳۸۴$) (پایین و چپ)، تفاوت معنی دار آماری بین میانگین تعداد ماست سل ها در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل دیده شد ($p=۰/۰۰۱$) (پایین و راست).



شکل ۸. توزیع عروق خونی در خط انتقالی گروه های تجربی و کنترل با بزرگنمایی $\times 400$ (رنگ آمیزی H & E) ($100 \mu\text{m}$).

بود. نتایج شمارش تعداد و نوع ۳ ماست سل در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که در گروه CEE/ BMMSCs تعداد نوع ۳ ماست سل از دیگر گروه های تجربی پایین تر است. به نظر می رسد که حضور دو عامل سلول و فاکتور رشد بیولوژیکی، سبب به تاخیر افتادن تبدیل نوع ۲ به نوع ۳ ماست سل شده است. فلاپ های پوستی یکی از پر کاربردترین روش هادر جراحی پلاستیک

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر تعداد کل ماست سل ها در گروه BM-MSCs افزایش نشان دادو در بین انواع ماست سل ها، تنها در نوع ۲ ماست سل ها بین گروه ها اختلاف وجود داشت. نوع ۲ ماست سل در روز ۷ پس از جراحی در گروه BM-MSCs، بالاترین عدد و سپس در گروه CEE از دیگر گروه های تجربی بیشتر

به طور مستقیم بر روی تکثیر فیبروبلاست موثر باشد (۳۳ و ۳۲ و ۲۷). ماست سل ها حاوی آنزیم های اختصاصی هستند که قادرند پروکلاژن را وارد مراحل تبدیل به کلاژن کنند و این وضعیت در موارد غیرنرمال موجب فیبروز می شود (۳۴ و ۲۴). چندین مطالعه گزارش کرده اند که در فرآیند التیام زخم پوست نرمال انسان، میزان میانجی های شیمیایی - نوع ۱ مونوسیت، مرتبط و موازی با بکارگیری و دگرانولیشن ماست سل است (۳۵ و ۳۳). به نظر می رسد مطالعات بیشتری جهت مشخص کردن مکانیسم اثر گذاری BM-MSCs و CEE در حضور ماست سل ها در موقعیت التهابی، مورد نیاز است. نتایج حاصل از این تحقیق تاکید می کند افزایش تعداد کل ماست سل ها و افزایش تعداد نوع ۲ ماست سل ها سبب افزایش توزیع عروق خونی در Transitional Line در گروه های تجربی می شود که در نهایت افزایش سطح بقا یافته فلاپ را بدنبال دارد.

تضاد منافع: نویسندگان این طرح هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی لرستان جهت حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

است. ایسکمی وبه دنبال آن نکرروز از مشکلات شایع پس از جراحی فلاپ است (۲۳ و ۲۲ و ۱۳). مطالعات اخیر پیشنهاد می کنند کاهش اجزای التهابی از قبیل دگرانولیشن ماست سل می تواند تاثیر مثبتی برروی فرآیند التیام زخم داشته باشد (۲۵ و ۲۴ و ۳).

وضعیت ایسکمی در زخم های پوستی با کاهش پرولیفراسیون سلولی و اثر گذاری بر روی کلاژن است، که نهایتا به ترمیم زخم صدمه می زند (۸). تشکیل بافت گرانوله زخم، تکثیر سلولی، جوانه زدن عروقی و رشد کلاژن در سراسر فازهای تکثیری و بازسازی ترمیم زخم، وابسته به حضور ماست سل ها است نتایج این مطالعه نیز تاکید می کند که افزایش تعداد کل ماست سل ها همراه با افزایش توزیع عروق کوچک در گروه های تجربی بوده است (۲۷ و ۲۶). فرآیند ترمیم زخم با افزایش فاکتور رشد از BM-MSCs ترشح و در حضور فاکتور رشد بیولوژیکی، سرعت می گیرد. در حقیقت فقدان یا کاهش فاکتور رشد در انواع زخم ها مانند زخم های دیابتی، زخم های ایسکمی از عوامل اصلی و مهم در ایجاد اختلال در ترمیم هستند (۳۰-۲۸). در یک مطالعه گزارش شده است، ماست سل ها به تشکیل اسکار در طول فرآیند زخم کمک می کنند (۳۱) که از این رو کاهش حضور ماست سل نوع ۳، در گروه دریافت کننده CEE/BMMSCs در طول فرآیند ترمیم زخم، می تواند از تشکیل اسکار جلوگیری کند و بدین طریق

Histological Evaluation of Different Types of Mastocytes in the Skin Flap Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Biological Growth Factor

F. Chehelcheraghi (PhD)^{1*}, Kh. Anbari (MD)²

1. Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R Iran.
2. Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(3); Mar 2018; PP: 21-8

Received: Sep 26th 2017, Revised: Dec 9th 2017, Accepted: Jan 9th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Skin flap is one of the most commonly used methods in plastic surgery. Postoperative skin flap necrosis is one of the complications of flap skin. The aim of this study was to evaluate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and chick embryo extract (CEE) on mast cells in a randomized skin flap in rats.

METHODS: In this experimental study, 40 male albino Wistar rats weighing 250 – 300 g were divided into four groups of 10 (control, CEE/BM-MSCs, CEE and BM-MSCs). Skin flap (30 × 80 mm) was created behind the animals. Surgery was performed on day zero and therapeutic intervention was done on the same day. Mesenchymal stem cells were extracted from rat bone marrow and were injected. CEE was prepared from a 9-day-old embryo of Marandi chicken. On the seventh day after the surgery, samples were assessed in term of type, and the total number of mast cells (type 1 to 3) in the transfer line.

FINDINGS: The difference between the mean number of mast cells type 1 (3.67 ± 1.91) ($p=0.99$), and type 3 (1.9 ± 1.47) ($p=0.384$) was not significant in the study groups, but was statistically significant in type 2 (2.27 ± 1.42) in different study groups ($p=0.005$). There was also a statistically significant difference between the mean total number of mast cells (2.32 ± 0.84) in the BM-MSCs group and other experimental groups ($p=0.001$).

CONCLUSION: Based on the results of this study, increase in mast cell type 2, the improvement of small vessels and decrease in mast cell type 3 lead to the reduction of scarring and fibrosis.

KEY WORDS: *Biological Growth Factor, Mast Cells, Flap Surgery, CEE.*

Please cite this article as follows:

Chehelcheraghi F, Anbari Kh. Histological Evaluation of Different Types of Mastocytes in the Skin Flap Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Biological Growth Factor. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(3):21-8.

*Corresponding Author; F. Chehelcheraghi (PhD)

Address: Address: Anatomy Department, Faculty of Medicine, Medical Sciences University, Khorramabad, Lorestan, I.R Iran.

Tel: +98 66 33120133

E-mail: fr.chehelcheraghi@gmail.com.

References

1. Memarzadeh K, Sheikh R, Blohmé J, Torbrand C, Malmjö M. Perfusion and oxygenation of random advancement skin flaps depend more on the length and thickness of the flap than on the width to length ratio. *Eplasty*. 2016;16.
2. Leng X, Fan Y, Wang Y, Sun J, Cai X, Hu C, et al. Treatment of ischemia-reperfusion injury of the skin flap using human umbilical cord mesenchymal stem cells (huc-mscs) transfected with "f-5" gene. *Med Sci Monit*. 2017;23:2751-64.
3. Rah DK, Min HJ, Kim YW, Cheon YW. Effect of platelet-rich plasma on ischemia-reperfusion injury in a skin flap mouse model. *Int J Med Sci*. 2017;14(9):829.
4. Kim HJ, Xu L, Chang KC, Shin SC, Chung JI, Kang D, et al. Anti-inflammatory effects of anthocyanins from black soybean seed coat on the keratinocytes and ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Microsurgery*. 2012;32(7):563-70.
5. Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, et al. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *Journal of surgical research*. 2006;136(2):336-41.
6. Piłkuła M, Langa P, Kosikowska P, Trzonkowski P. Stem cells and growth factors in wound healing. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*. 2014;69:874-85.
7. Kwon DS, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Danyluk AL, Bansal M, et al. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *International wound journal*. 2008;5(3):453-63.
8. Chehelcheraghi F, Eimani H, Sadraie SH, Torkaman G, Amini A, Shemshadi H, et al. Improved viability of random pattern skin flaps with the use of bone marrow mesenchymal-derived stem cells and chicken embryo extract. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015;18(8):764.
9. Christman S, Kong B, Landry M, Foster D. Chicken embryo extract mitigates growth and morphological changes in a spontaneously immortalized chicken embryo fibroblast cell line. *Poultry science*. 2005;84(9):1423-31.
10. Maxwell GD, Reid K, Elefanty A, Bartlett PF, Murphy M. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the development of adrenergic neurons in mouse neural crest cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(23):13274-9.
11. Hallock GG, Rice DC. Evidence for the efficacy of TRAM flap delay in a rat model. *Plastic Reconstruct surg*. 1995;96(6):1351-7.
12. Cimini M, Fazel S, Zhuo S, Xaymardan M, Fujii H, Weisel RD, et al. c-Kit dysfunction impairs myocardial healing after infarction. *Circulation*. 2007;116(11):I-77.
13. Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, Arias VE, Gomes HC, Ferreira LM. LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. *Laser Med Sci*. 2012;27(5):1045-50.
14. Saeid B, Mohammad B. Effect of pentoxifylline administration on mast cell numbers and degranulation in a diabetic and normoglycemic rat model wound healing. *Iran Red Crescent Med J*. 2012;14(8):483-7.
15. Khorsandi L, Nejad-Dehbashi F, Ahangarpour A, Hashemitabar M. Three-dimensional differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Tissue Cell*. 2015;47(1):66-72.
16. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyacı AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(5):533-46.
17. Chehelcheraghi F, Eimani H, Homayoonsadraie S, Torkaman G, Amini A, Majd HA, et al. Effects of acellular amniotic membrane matrix and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in improving random skin flap survival in rats. *Iran Red Crescent Med J*. 2016;18(6):25588.
18. Im MJ, Kim YS, Edwards RJ, Hoopes JE, Fenselau A. The effect of bovine basic fibroblast growth factor on skin flap survival in rats. *Ann Plas Surg*. 1992;28(3):242-5.

19. Nishikori Y, Shiota N, Okunishi H. The role of mast cells in cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(9):823-35.
20. Yang M, Sheng L, Li H, Weng R, Li QF. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model. *Microsurgery.* 2010;30(4):275-81.
21. Rodríguez-Lorenzo A, Arufe MC, de la Fuente A, Fernandez F, Blanco F. Influence of flap prefabrication on seeding of subcutaneously injected mesenchymal stem cells in microvascular beds in rats. *Ann Plastic Surg.* 2014;73(2):234-8.
22. Abla LEF, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2005;20(2):121-3.
23. Harder Y, Amon M, Erni D, Menger M. Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J Surg Res.* 2004;121(2):197-205.
24. Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2003;5(2):147-53.
25. Beukelman C, Van Den Berg A, Hoekstra M, Uhl R, Reimer K, Mueller S. Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel®) for wound healing in vitro. *Burns.* 2008;34(6):845-55.
26. Younan GJ, Heit YI, Dastouri P, Kekhia H, Xing W, Gurish MF, et al. Mast cells are required in the proliferation and remodeling phases of microdeformational wound therapy. *Plastic Reconstruct Surg.* 2011;128(6):649-58.
27. Yan W, Liu H, Deng X, Jin Y, Sun H, Li C, et al. Raman spectroscopy enables noninvasive biochemical identification of the collagen regeneration in cutaneous wound healing of diabetic mice treated with MSCs. *Lasers Med Sci.* 2017;32(5):1131-41.
28. Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg.* 1998;25(3):397-405.
29. Bennett S, Griffiths G, Schor A, Leese G, Schor S. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Brit J Surg.* 2003;90(2):133-46.
30. de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, Sossa CL, Galvis V, Arango-Rodríguez ML. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. *PLoS One.* 2017;12(6):0177533.
31. Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2012;132(2):458-65.
32. Trautmann A, Feuerstein B, Ernst N, Bröcker E-B, Klein CE. Heterotypic cell-cell adhesion of human mast cells to fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 1997;289(4):194-203.
33. Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, Bröcker EB, Gillitzer R. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol.* 2000;190(1):100-6.
34. LeRoy EC. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J pathol.* 2000;51(2):286.
35. Sullivan G, Carper H, Novick W, Mandell G. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infection Immunit.* 1988;56(7):1722-9.