

Human Amniotic Membrane Extracellular Matrix-Derived Scaffold Modulates the Number of Mast Cells in the Granulation Tissue and Accelerates Skin Wound Healing in Diabetic Rats

Mehdi Mehdinezhad Roshan¹
 Farshad Moharrami Kasmaie²
 Mohammad Kazemi Ashtiani³
 Mohammad Amin AbdollahiFar⁴
 Saeideh Erfanian⁵
 Ibrahim Zarkesh⁵
 Davood Nasiry⁶
 Abbas Piryaee⁷

¹MSc Student in Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Ph.D. Candidate in Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Assistant Professor, Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Ph.D. Candidate in Tissue Engineering, Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Paramedicine, Amol School of Paramedical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Professor, Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received October 21, 2023; Accepted November 6, 2023)

Abstract

Background and purpose: One of the most complications of diabetes are chronic skin wounds. Recently Human Amniotic Membrane Scaffold (HAMS) used as a wound dressing. In this study, the impact of HAMS on the rate of wound closure and the number of mast cells in the granulation tissue of diabetic rats was evaluated.

Materials and methods: 45 diabetic rats were divided into 3 groups: healthy wound, diabetic wound, and diabetic wound transplanted with HAMS. 30 days after diabetes induction via injecting 55mg/kg of Streptozotocin, a circular wound with a diameter of 15mm was created. HAMS was transplanted to the wound and the percentage of wound closure and the density of type 1, 2 and 3 mast cells in the granulation tissue were evaluated on days 7, 14 and 21.

Results: HAMS transplantation significantly enhanced the wound closure compared to diabetic group ($P<0.05$). Comparing to healthy group, the number of all types of mast cells and their total number in diabetic group was significantly decreased on day 7 ($P<0.001$) and significantly increased on days 14 and 21 ($P<0.001$). However, these changes modulated in HAMS transplanted group, in which in all cases except for type 3 mast cell on day 7 there were significant differences compared to diabetic group ($P<0.01$). Moreover, in HAMS transplant group, the number of type 1 and 3 mast cells on day 14 reached the level of healthy group.

Conclusion: These results suggested that HAMS improves the diabetic wound healing via modulating inflammatory reactions by affecting the mast cells density in the granulation tissue.

Keywords: Diabetic wound, Human amniotic membrane scaffold, Inflammation, Mast cell

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 1):11-24 (Persian).

Corresponding Author: Abbas Piryaee- School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
 (E-mail: piryaee@sbmu.ac.ir)

داربست حاصل از ماتریکس برون سلولی پرده آمنیون انسانی، موجب تعدیل تعداد ماست سل های بافت گرانوله و تسریع التیام زخم پوستی موش صحرایی دیابتی می شود

مهدی مهدی نژاد روشن¹
فرشاد محرمی کسمائی²
محمد کاظمی آشتیانی³
محمد امین عبدالهی فر⁴
سعیده عرفانیان⁵
ابراهیم زرکش⁵
داوود نصیری⁶
عباس پیریایی⁷

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مهم ترین عوارض شایع بیماری دیابت، زخم های پوستی مزمن است. به تازگی داربست حاصل از پرده آمنیون انسانی (Human Amniotic Membrane Scaffold, HAMS) به عنوان یک پانسمان مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعه حاضر اثر پیوند HAMS بر میزان بسته شدن زخم و تعداد انواع ماست سل های نوع 1، 2 و 3 در بافت گرانوله موش صحرایی دیابتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: 45 سر موش صحرایی دیابتی به سه گروه 15 عددی تقسیم شدند: زخم سالم، زخم دیابتی و زخم دیابتی تیمار شده با HAMS. 30 روز پس از القای دیابت در موش ها با تزریق 55mg/kg استریتوزوسین، زخم تمام ضخامت پوستی حلقوی به قطر 51 میلی متر ایجاد شد. سپس HAMS به ناحیه زخم پیوند شده و درصد بسته شدن زخم و تراکم انواع ماست سل ها در بافت گرانوله در روزهای 7، 14 و 21 ارزیابی شد.

یافته ها: پیوند HAMS باعث تسریع بسته شدن زخم در گروه تیمار نسبت به گروه دیابتی شد ($P<0/05$). تعداد انواع ماست سل ها و هم چنین تعداد کلی آن ها در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم در روز 7 کاهش معنادار ($P<0/001$) و در روزهای 14 و 21 افزایش معنادار یافته بود ($P<0/001$). در حالی که با پیوند HAMS این تغییرات تعدیل شد؛ به نحوی که در همه موارد بجز تعداد ماست سل های نوع 3 در روز 7، تفاوت های معناداری با گروه دیابتی مشاهده شد ($P<0/01$). علاوه بر آن در گروه پیوند HAMS تعداد ماست سل های نوع 1 و 3 در روز 14 به سطح گروه سالم رسیده بود.

استنتاج: این نتایج نشان می دهد، HAMS باعث تعدیل واکنش های التهابی از طریق اثر بر تعداد ماست سل های بافت گرانوله و به دنبال آن موجب بهبود روند ترمیم زخم می شود.

واژه های کلیدی: زخم دیابتی، داربست پرده آمنیون انسانی، ماست سل، التهاب

E-mail: piriyaee@sbmu.ac.ir

مؤلف مسئول: عباس پیریایی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2. دانشجوی دکتری علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

3. استادیار، گروه مهندسی سلول، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

4. استادیار، گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

5. دانشجوی دکتری مهندسی بافت، گروه مهندسی سلول، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

6. استادیار، گروه پیراپزشکی، دانشکده پیراپزشکی آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

7. استاد، گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1402/7/29 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/8/6 تاریخ تصویب: 1402/8/15

مقدمه

دیابت شیرین (Diabetes Mellitus, DM) یکی از بیماری‌های رایج و چالش‌برانگیز در جهان است و از عوارض رایج آن نقص در ترمیم زخم‌های پوستی به‌خصوص در اندام تحتانی است. طبق آمارهای منتشر شده توسط فدراسیون بین‌المللی دیابت حدود 10/5 درصد از جمعیت بزرگ‌سالان جهان (معادل تقریباً 537 میلیون نفر) از بیماری دیابت رنج می‌برند (1). طبق جدیدترین تحقیقات، تعداد افراد دیابتی در ایران حدود 16/3 درصد است (2) که حدود 6/2 درصد از این افراد از زخم پای دیابتی رنج می‌برند (3). عدم ترمیم چنین زخم‌هایی منجر به گسترش آن به تمام ضخامت پوست شده و حتی ممکن است بافت‌های زیر جلدی همچون چربی، عضله، تاندون و استخوان را نیز درگیر نماید (4). طی فرایند ترمیم زخم رخدادهایی شامل فعال‌سازی سلول‌های ماکروفاژ، نوتروفیل و فیبروبلاست‌ها و هم‌چنین ترشح فاکتورهای رشد متعدد و سایتوکاین‌هایی که روند بهبودی را هماهنگ و تقویت می‌کنند، به وقوع می‌پیوندد (5،6). در زخم‌های دیابتی، بروز التهاب طولانی مدت موجب کاهش تولید فاکتورهای رشد، کاهش تکثیر سلولی و نقصان جبران ماتریکس ازدست‌رفته شده، روند بهبود و ترمیم زخم با اختلال مواجه می‌شود (7).

یکی از انواع سلول‌هایی که در بافت درم پوست یافت می‌شود ماست‌سل‌ها هستند که در فرایند التهاب نقش مهمی دارند (8). این سلول‌ها انواعی از واسطه‌های التهابی را در گرانول‌های خویش ذخیره می‌نمایند و در هنگام فعال شدن، با رهاسازی آن‌ها موجب بروز واکنش‌های التهابی می‌شوند. ماست‌سل‌ها براساس میزان رهاسازی گرانول‌ها (درجه دگرانوله‌شدن) به سه نوع تقسیم می‌شوند: ماست‌سل نوع یک هیچ گرانولی آزاد نکرده و غشای سلولی منظمی دارد، ماست‌سل نوع دو مقداری گرانول آزاد کرده، با این وجود هنوز یک غشای منظم وجود دارد و ماست‌سل نوع سه با میزان شدیدی از

دگرانوله شدن و شکستگی ناقص یا کامل غشای سلولی مشخص می‌شود (9). عملکرد ماست‌سل‌ها در روند ترمیم طبیعی زخم‌ها باعث بروز التهاب حاد و به دنبال آن (ضمن فروکش کردن واکنش‌های التهابی) به راه‌اندازی فرایندهای ترمیمی، از جمله تکثیر فیبروبلاست‌ها و ساخت کلاژن، بازآرایی رشته‌های کلاژن و بهبود بافت جوشگاهی، تشکیل عروق خونی جدید و ترمیم اپیدرم از طریق اپی‌تلیال‌زایی مجدد می‌پردازد. درحالی‌که در زخم‌های دیابتی، فعالیت طولانی مدت سلول‌های التهابی از جمله ماست‌سل‌ها موجب تداوم و گسترش واکنش‌های التهابی و عدم فروکش نمودن آن در زمان مناسب می‌گردد که موجب اختلال در فعالیت فیبروبلاست‌ها و در نتیجه تولید و بازآرایی ناقص کلاژن شده هم‌چنین با عدم رگ‌زایی مناسب و اپی‌تلیال‌زایی مجدد مطلوب موجب ترمیم ناقص و تشکیل پوستی ضعیف و غیر عملکردی می‌شود، که همواره ملتهب و مستعد آسیب‌های مجدد است (10). همان‌طور که اشاره شد، یکی از عوامل مختل‌کننده ترمیم زخم‌های مزمن و از جمله دیابتی عدم جایگزینی مناسب و به‌موقع ماتریکس برون‌سلولی (Extracellular matrix: ECM) تحلیل‌رفته است. از این رو، استفاده از داربست مناسب باهدف جبران ECM تحلیل‌رفته یک عامل کلیدی در روند بهبود زخم‌های دیابتی است (11-13). در میان داربست‌های طبیعی، استفاده از پرده آمینون جنین انسان بسیار امیدوارکننده بوده است (14). پرده آمینون حاوی مقدار زیادی سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد دخیل در ترمیم زخم مانند (Transforming growth factor beta, TGF- β) و (basic fibroblast growth factor, bFGF) است که حتی پس از سلول‌زدایی، مقدار قابل توجهی از آن‌ها در ماتریکس حاصل باقی می‌ماند (15). مجموع این سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد دارای فعالیت‌های گسترده‌ای از جمله اثرگذاری بر رفتار بسیاری از سلول‌ها مانند فیبروبلاست و کراتینوسیت، تحریک تکثیر و مهاجرت سلولی و تولید ماتریکس درمی‌جدید

مواد و روش‌ها

سلول زدایی پرده آمنیون و ارزیابی‌های آن

پرده آمنیون از بخش سزارین بیمارستان طالقانی با رضایت کامل والدین نوزادان سالم دریافت شد. پس از شستشو و جداسازی سایر بافت‌ها، پرده آمنیون به قطعات یک سانتی متری بریده شد. جهت فرایند سلول زدایی از روش Ryzhuk و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد (18). برای این منظور، قطعات پرده آمنیون به ترتیب به مدت دو ساعت در محلول 0/02 درصد EDTA و 0/05 درصد تریپسین، به مدت 18 ساعت در محلول 0/5 درصد SDS، به مدت 18 ساعت در محلول سه درصد Triton X-100 و به مدت 48 ساعت در آب مقطر دو بار تقطیر در دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده شد. جهت بررسی حضور سلول‌ها در پرده آمنیون سلول زدایی شده (Decellularized Human Amniotic Membrane, dHAM) تعدادی از قطعات در محلول فرمالین تثبیت شده و پس از پردازش بافتی و تهیه برش‌هایی با ضخامت پنج میکرومتر، توسط روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و هم چنین استفاده از رنگ DAPI برای تشخیص سلول‌ها و هسته‌ها رنگ آمیزی شدند. هم چنین برای بررسی حفظ کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها به دنبال سلول زدایی، تعدادی از برش‌های بافتی به ترتیب با روش تری کروم ماسون و آلسیان بلو رنگ آمیزی شدند. جهت بررسی محتوای DNA باقیمانده در dHAM با استفاده از روش فنل - کلروفرم DNAی تام استخراج شده و میزان جذب نوری آن در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج 260 نانومتر خوانده و با پرده آمنیون طبیعی (HAM) مقایسه شد (18).

ساخت داربست سه بعدی متخلخل از ماتریکس پرده آمنیون به منظور ایجاد محلول امولسیون از ماتریکس پرده آمنیون جهت ساخت داربست، قطعات dHAM با دستگاه لایوفیلایزر خشک شده و به طور کامل آسیاب شدند تا پودری یکنواخت حاصل شود. پودر به دست آمده در

هستند (15، 16). علاوه بر آن ماتریکس پرده آمنیون انسانی دارای دو مهارکننده الاستاز با جرم مولکولی کم، الافین و مهارکننده پروتئیناز لکوسیت ترشحی است که دارای خواص ضدالتهابی و ضد میکروبی هستند و می‌توانند به طور قابل توجهی بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)، اینترلوکین یک آلفا و یک بتا (Interleukin-1 α and 1 β , IL-1 α , -1 β) را سرکوب کنند (17). با وجود آن که به نظر می‌رسد استفاده از پرده آمنیون انسانی یا ماتریکس آن در مداخلات بالینی سودمند باشد، اما به منظور استفاده مطلوب از آن مسائلی وجود دارد که باید برطرف شوند. به عنوان مثال، به دنبال پیوند پرده آمنیون (به دلیل تراکم بالای ماتریکس آن) فرایند مهاجرت و نفوذ سلول‌ها و هم چنین رگ‌زایی به درون آن محدود است. از این رو ایجاد یک داربست سه بعدی مهندسی شده متخلخل از ماتریکس پرده آمنیون، برای مهاجرت و نفوذ سلول‌ها و هم چنین گسترش رگ‌زایی به درون آن مناسب تر خواهد بود و به طور مؤثرتری عملکرد سلول‌ها و مشارکت آن‌ها را در بازسازی بافت بهبود می‌بخشد (18، 19). داربست حاصل از ماتریکس پرده آمنیون انسان (Human Amniotic Membrane Scaffold, HAMS) یک داربست زیستی طبیعی با ساختاری متخلخل است که دارای خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد درد و ضد اسکار بوده و می‌تواند ماتریکس از دست رفته ناشی از زخم را جبران نموده و بدون هیچ گونه عوارض جانبی شناخته شده‌ای در فرایند ترمیم مشارکت نماید (20، 21). مطالعات پیشین نشان داد که استفاده از HAMS باعث کاهش سلول‌های التهابی موضعی زخم از جمله نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها می‌شود (14، 22). بنابراین در مطالعه حاضر، به منظور درک بهتر تأثیر پیوند HAMS بر فرایند ترمیم زخم دیابتی، اثر این نوع تیمار را بر تعداد و انواع ماست سل‌های موجود در بافت گرانوله در حال ترمیم زخم موش صحرایی دیابتی مورد مطالعه قرار دادیم.

اسیداستیک 0/1 مولار و آنزیم پپسین یک درصد برای مدت 48 ساعت در دمای چهار درجه سانتی گراد و pH حدود سه تا چهار روی همزن مغناطیسی حل شد. سپس با اضافه کردن محلول سود یک نرمال و بافر فسفات pH محلول به 7/4 افزایش یافت تا محلول پیش‌ژل تشکیل شود. سپس 500 میکرولیتر از این محلول به درون هر چاهک پلیت 24 چاهکی ریخته و با استفاده از دستگاه لایوفیلایزر خشک شد تا داربست‌های سه بعدی متخلخل با قطر 15 میلی مترو ضخامت دو میلی متر که از پایداری لازم برخوردار نبودند ایجاد شود. به منظور ایجاد پایداری مناسب و تشکیل پیوندهای عرضی کوالانسی قوی برای دستیابی به یک داربست پایدار از (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) EDC استفاده شد. نمونه‌ها به مدت یک شبانه‌روز روی همزن و در دمای 25 درجه سانتی گراد در محلول الکل 70 درصد حاوی 30 میلی مولار EDC، 30 میلی مولار NHS (N-Hydroxysuccinimide) و 50 میلی مولار MES (2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid) قرار داده شده، سپس خشک شدند تا داربست متخلخل پایدار حاصل شود (14).

حیوانات مورد استفاده و گروه‌های مطالعه

در مطالعه تجربی حاضر با کد اخلاق (IR.SBMU.AEC.1401.011)، 45 سر موش صحرایی نر بالغ، نژاد Sprague-Dawley با وزن حدود 200 تا 250 گرم و سن هشت هفته استفاده شد. موش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه رویان تهیه شده و در شرایط استاندارد حیوان خانگی نگهداری شدند. موش‌ها به سه گروه 15 سری تقسیم شدند: زخم غیردیابتی (گروه Healthy)، زخم دیابتی (گروه Diabetic) و زخم دیابتی تیمار شده با داربست (گروه D-HAMS). موش‌های گروه‌های دیابتی با تزریق درون صفاقی داروی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin, STZ) با دوز 55 میلی گرم بر کیلوگرم دیابتی شده و به منظور

تثبیت دیابت به مدت 30 روز نگهداری شدند (23). موش‌های گروه زخم سالم نیز بدون هیچ گونه مداخله‌ای به عنوان گروه کنترل به صورت مشابه 30 روز نگهداری شدند.

روش ایجاد زخم، تیمار و نمونه برداری

برای ایجاد زخم، موش‌ها به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین (50 میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (5 میلی گرم بر کیلوگرم)، بی‌هوش شدند. سپس موی قسمت پشت قفسه سینه آن‌ها تراشیده شد و یک زخم مدور به طول 15 میلی متر با ضخامت کامل پوست ایجاد شد. جهت حذف اثر انقباض عضله پوستی و جمع شدگی زخم (که مهم ترین عامل ترمیم زخم در جوندگان است) و بارز نمودن فرآیند بازسازی زخم از طریق اپی تلیالزایی مجدد و تشکیل بافت گرانوله (همچون روند ترمیم زخم پوستی در انسان) یک مهارکننده سیلیکونی مدور که قطر فضای داخلی آن 18 میلی متر بود به پیرامون زخم بخیه زده شد. هم چنین برای ایجاد شرایط ایسکمیک، دو عدد برش طولی در طرفین زخم حلقوی با فاصله 8 میلی متر از لبه زخم و مجموعاً فاصله 3/1 سانتی متر از یکدیگر با طول 10 سانتی متر از ناحیه کتف تا ستیغ ایلیاک ایجاد شد تا از خون‌رسانی جانبی به موضع زخم جلوگیری شود (14). پس از ایجاد مدل زخم، در گروه تیمار با داربست، به ناحیه زخم هر موش یک عدد HAMS پیوند زده شد. همه موش‌ها در شرایط یکسان نگهداری شدند و در روزهای هفت، 14 و 21 پس از ایجاد زخم و تیمار، از محل زخم تصویربرداری شده و از هر گروه پنج سر حیوان آسان‌کشی شده و نمونه‌ها برای بررسی‌های بافت‌شناسی جمع‌آوری شدند.

قند خون و وزن

بدین منظور پس از القای دیابت با STZ مقدار قند و وزن موش‌ها توسط دستگاه گلوکومتر و ترازو در روزهای (۰، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰) مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی روند بهبود ظاهری زخم

به منظور بررسی ترمیم ظاهری و اندازه گیری درصد میزان بسته شدن زخم (Wound closure rate) در روزهای 7، 14 و 21 پس از ایجاد زخم، ناحیه زخم توسط دوربین دیجیتال از فاصله مشخص تصویربرداری شده و سپس مساحت زخم توسط نرم افزار Image J تعیین و با فرمول زیر محاسبه شد (24).

$$100 \times \frac{\text{مساحت زخم در روز مورد بررسی} - \text{مساحت زخم در روز صفر}}{\text{مساحت زخم در روز صفر}} = \text{درصد بسته شدن زخم}$$

روش بررسی تراکم انواع ماست سل ها

به منظور بررسی بافت شناسی تراکم انواع ماست سل ها در بافت گرانوله در حال ترمیم در بازه های زمانی مورد نظر، نمونه های بافتی به مدت 24 ساعت در محلول بوئن و سپس به مدت هفت روز در محلول فرمالین 10 درصد نگه داری شدند. در ادامه پس از پردازش بافتی، نمونه ها در پارافین قالب گیری شده و توسط دستگاه میکروتوم برش های سریالی با ضخامت پنج میکرومتر تهیه شد. تعداد هشت برش بافتی با فواصل 250 میکرومتر از هر موش جهت ارزیابی انتخاب شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری در چهار گوشه درم ترمیم شده و یک فیلد در مرکز (مساحت هر فیلد 0/01 میلی متر مربع) از ناحیه بافت گرانوله در حال ترمیم هر برش بافتی عکسبرداری شده و شمارش هریک از انواع ماست سل ها انجام شد (25).

بررسی آماری

تمامی داده های کمی توسط نرم افزار Prism نسخه 9 آنالیز شد. ابتدا توزیع نرمال داده ها با تست Kolmogorov-Smirnov One sample مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به توزیع نرمال داده ها، برای مقایسه دو گروه از Independent sample t test و برای مقایسه بیش از دو گروه از روش One way ANOVA و تست تعقیبی Dunn's استفاده شد. داده ها برای

ماست سل ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ارائه شد و برای سایر پارامترها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد؛ و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری تفاوت ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

ارزیابی فرایند سلول زدایی پرده آمینون و ساخت داربست حاصل

بررسی برش های بافتی با رنگ آمیزی H&E نشان داد که پس از فرایند سلول زدایی، هسته یا سلولی در پرده آمینون وجود ندارد (تصویر شماره 1- الف). هم چنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI حاکی از نبود هسته در ماتریکس حاصل از سلول زدایی پرده آمینون بود (تصویر شماره 1- ب). علاوه بر آن، رنگ آمیزی های تری کروم ماسون و آلسیان بلو به ترتیب نشان دهنده ماندگاری کلاژن ها و پروتئو گلیکان ها در ماتریکس سلول زدایی شده بود (تصویر شماره 1- ج و د).

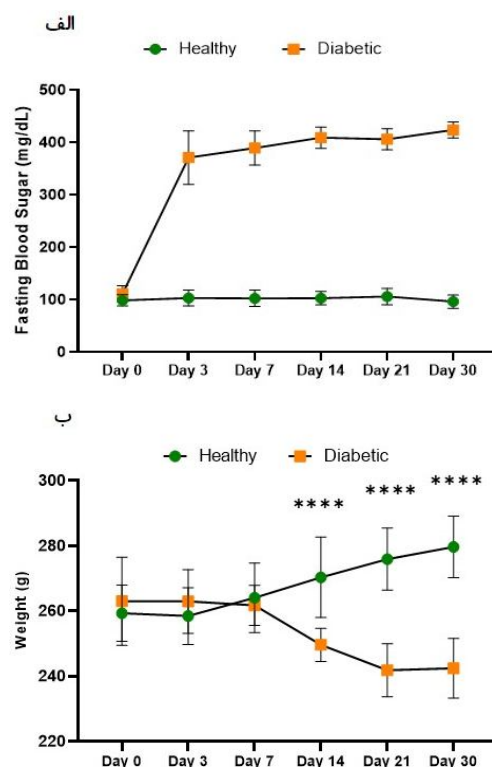
بررسی مولکولی ماتریکس سلول زدایی شده نیز نشان داد که مقدار DNA موجود در آن به کم تر از 2/8 درصد پرده آمینون طبیعی رسیده که علاوه بر وجود تفاوت معنادار با پرده آمینون طبیعی ($P < 0/0001$)، براساس منابع معتبر (26) در بازه مورد قبول می باشد (تصویر شماره 1- ه). داربست متخلخل سه بعدی حاصله نیز دارای قطر 15 میلی متر و ضخامت 1 میلی متر بود (تصویر شماره 1- و).

ارزیابی قند خون و وزن موش ها طی مطالعه

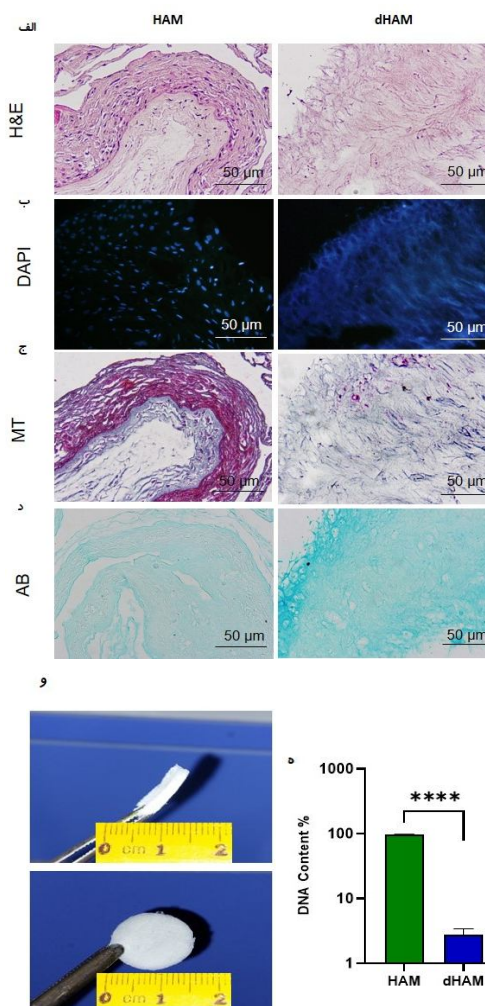
جهت تأیید دیابتی بودن موش ها، قند خون آن ها در روزهای 3، 7، 14، 21 و 30 چک شد. نتایج حاکی از آن بود که از روز سوم به بعد میزان قند خون موش های گروه های دیابتی و تیمار افزایش چشمگیری یافته و به بازه 350 تا 400 میلی گرم بر دسی لیتر رسیده؛ این مقدار تا روز 30 حفظ شده است. در حالی که در گروه سالم مقدار قند خون طی همین بازه زمانی ثابت و بدون تغییر

بود (نمودار شماره 1-الف). وزن تمامی موش‌ها نیز پیش و پس از تجویز STZ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌داد میانگین وزن در گروه دیابتی و تیمار سیر کاهش یافته، درحالی‌که در گروه سالم این روند افزایشی بود. به‌نحوی که وزن موش‌های سالم و دیابتی از روز 14 به بعد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0/0001$) داشتند (نمودار شماره 1-ب).

سلول کامل یا هسته‌ای در ماتریکس حاصله وجود ندارد. (ج و د) میکروگراف‌های حاصل از برش‌های بافتی رنگ‌آمیزی شده با روش تریکروم ماسون (Trichrome Mason) و آلسیان‌بلو (Alcian Blue) حاکی از آن است که به ترتیب حضور کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها در بافت سلول‌زدایی شده نسبت به پرده آمنیون تفاوت آشکاری ندارد. (ه) مقدار DNA موجود در ماتریکس حاصل از سلول‌زدایی پرده آمنیون (dHAM) و مقایسه آن با پرده آمنیون طبیعی (HAM) نشان می‌دهد که این مقدار به‌طور قابل توجهی نسبت به نمونه‌های طبیعی کاهش یافته است ($p < 0/0001$ ****). (و) تصویر میکروسکوپی داربست حاصل از ماتریکس برون‌سلولی پرده آمنیون انسانی (HAMS) که برای پیوند به محل زخم موش‌های دیابتی استفاده شد.



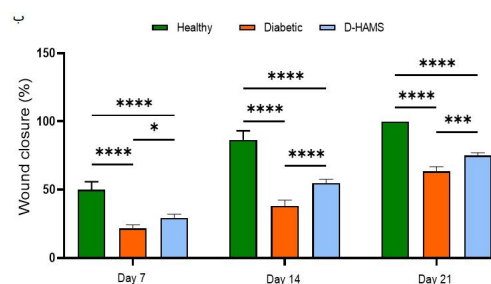
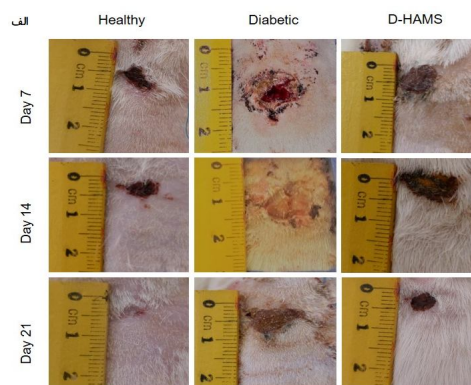
نمودار شماره 1: ارزیابی قند و وزن موش‌ها طی مطالعه. (الف) همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان قند خون در گروه دیابتی (Diabetic) سه روز پس از تزریق استریتوزوتوسین به‌طور معنی داری افزایش داشته و به سطح قند خون دیابتی رسید و این افزایش به‌صورت ثابت ادامه یافته است. (ب) هم‌چنین وزن موش‌ها در گروه دیابتی از روز 14 به بعد نسبت به گروه سالم (Healthy) کاهش معنادار داشته است. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار گزارش شده است. ($P < 0/0001$ ****).



تصویر شماره 1: سلول‌زدایی پرده آمنیون، ارزیابی‌های مربوطه و ساخت داربست متخلخل حاصل از ماتریکس برون‌سلولی آن. (الف و ب) میکروگراف‌های حاصل از برش‌های بافتی پرده آمنیون طبیعی (HAM) و سلول‌زدایی شده (dHAM) با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین (H&E) و DAPI برای بررسی حضور سلول‌ها. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پس از سلول‌زدایی هیچ

ارزیابی فرایند بسته شدن زخم‌ها

بررسی تغییرات ماکروسکوپی زخم‌ها در هر سه بازه زمانی 7، 14 و 21 روز نشان داد که فرایند بسته شدن زخم‌های هر دو گروه دیابتی (تیمار نشده و تیمار شده) نسبت به گروه زخم غیر دیابتی به طور معنی داری ($P < 0/0001$)، کاهش یافته است. با این وجود درصد مساحت بسته شدن زخم در گروه دیابتی تیمار شده با HAMS به ترتیب در روزهای 7، 14 و 21 نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده افزایش معناداری (به ترتیب: $P < 0/05$ ، $P < 0/0001$ و $P < 0/001$) را نشان می‌داد (تصویر شماره 2-الف و ب).



تصویر شماره 2: فرایند ترمیم ظاهری و بسته شدن زخم در گروه‌های مختلف طی مراحل مطالعه. (الف) تصاویر ماکروسکوپی روند بسته شدن زخم موش‌ها در روزهای 7، 14 و 21. (ب) ارزیابی کمی فرایند ترمیم زخم‌ها با محاسبه درصد بسته شدن آن‌ها نسبت به سطح زخم اولیه در روزهای مورد مطالعه. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. ($P < 0/05$), ($P < 0/001$) و ($P < 0/0001$).

Healthy: زخم غیر دیابتی،

Diabetic: زخم دیابتی تیمار نشده و

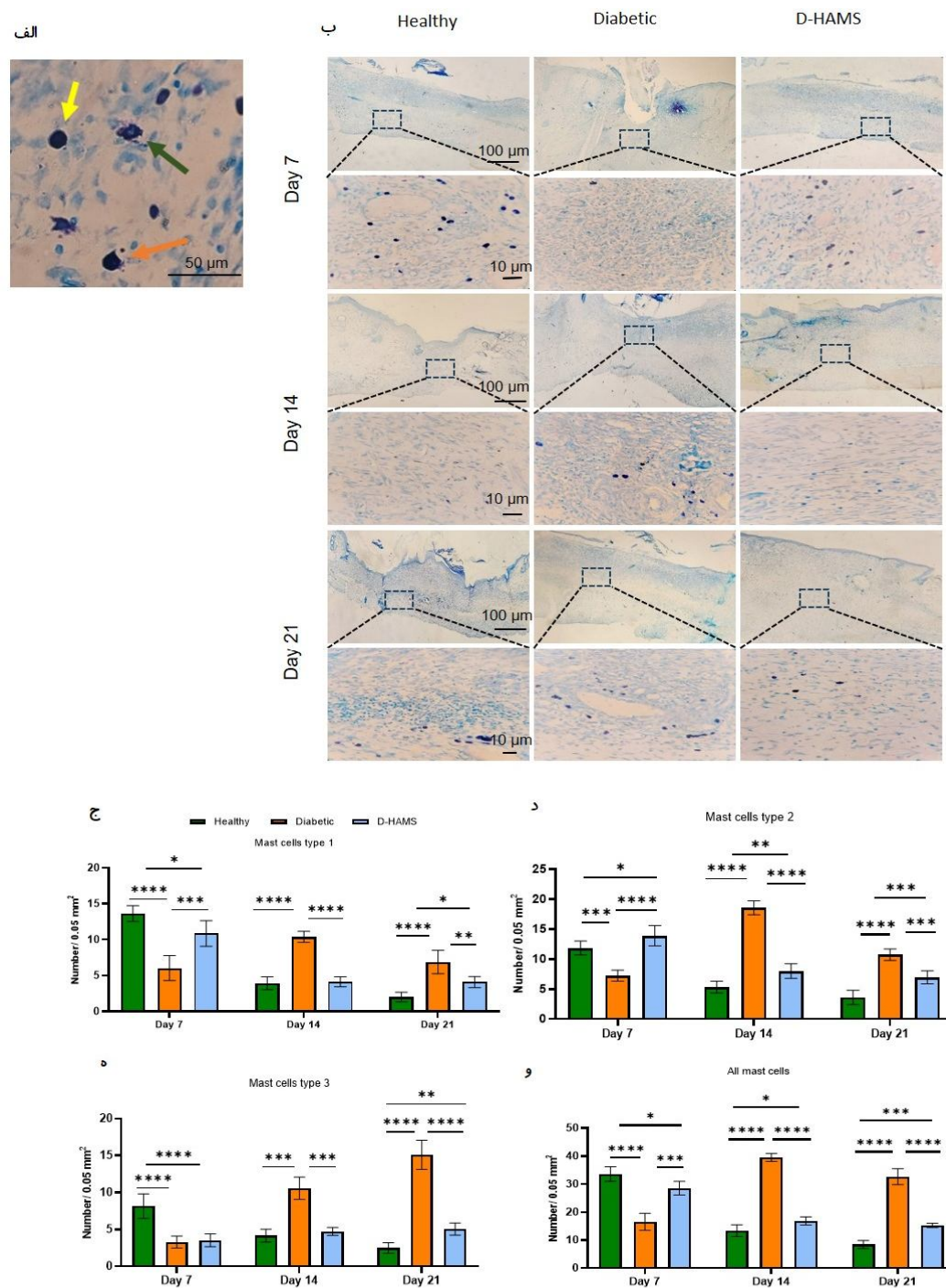
D-HAMS: زخم دیابتی تیمار شده با داربست.

ارزیابی تراکم ماست سل‌ها در بافت گرانوله در حال ترمیم

در این مطالعه به منظور ارزیابی اثر پیوند HAMS بر پدیده التهاب ناحیه زخم، تراکم انواع ماست سل‌ها و هم چنین جمع کل آن‌ها در بافت گرانوله در حال ترمیم (به عنوان یکی از شاخص‌های فرایند التهاب) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور برش‌های بافتی نمونه‌های پوستی روزهای 7، 14 و 21 توسط تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شده و انواع ماست سل‌ها به تفکیک مشخص و شمارش شدند (تصویر شماره 3-الف و ب). بررسی ماست سل‌های نوع یک نشان داد که تراکم این سلول‌ها در روز هفتم در هر دو گروه دیابتی تیمار نشده و تیمار شده نسبت به گروه غیر دیابتی کاهش معنی داری (به ترتیب، $P < 0/0001$) و ($P < 0/05$)، یافته است. با این حال تراکم این سلول‌ها در گروه دیابتی تیمار شده نسبت به دیابتی تیمار نشده افزایش معنی داری ($P < 0/001$)، را نشان داد.

در روز 14 تعداد ماست سل‌های نوع یک در گروه دیابتی تیمار نشده به طور معنی داری ($P < 0/0001$)، بالاتر از هر دو گروه زخم غیر دیابتی و دیابتی تیمار شده بود. هم چنین تراکم ماست سل‌های نوع یک در روز 21 در گروه دیابتی تیمار نشده افزایش معنی داری را نسبت به گروه‌های زخم غیر دیابتی و دیابتی تیمار شده (به ترتیب، $P < 0/0001$) و ($P < 0/01$)، نشان داد. در این روز افزایش تعداد ماست سل‌های نوع یک در گروه دیابتی تیمار شده نیز به طور معنی داری ($P < 0/05$)، بالاتر از گروه زخم غیر دیابتی بود (تصویر شماره 3-ج).

مقایسه ماست سل‌های نوع دو در گروه‌ها حاکی از آن بود که در روز 14 نسبت به گروه زخم غیر دیابتی، تراکم این سلول‌ها در گروه دیابتی تیمار نشده کاهش معنی دار ($P < 0/001$)، و در گروه دیابتی تیمار شده افزایش معنی دار ($P < 0/05$)، یافته است. ضمن آنکه تراکم این سلول‌ها در گروه دیابتی تیمار شده نسبت به دیابتی تیمار نشده افزایش معنی داری ($P < 0/0001$)، را نشان داد. تعداد ماست سل‌های نوع دو در روز 14 در



تصویر شماره 3: ارزیابی تعداد ماست سل های موجود در بافت گرانوله درحال ترمیم زخم های گروه های مطالعه. (الف) تشخیص سه نوع مختلف ماست سل در برش های بافتی رنگ آمیزی شده با روش تولوئیدین بلو، براساس شاخص های ذکر شده در منابع. ماست سل نوع 1: پیکان زرد، ماست سل نوع 2: پیکان نارنجی و ماست سل نوع 3: پیکان سبز. (ب) میکروگراف های برش های بافتی رنگ آمیزی شده با روش تولوئیدین بلو از ناحیه بافت گرانوله و حاشیه پوست سالم با دو بزرگنمایی پایین و بالا (ناحیه داخل کادر). (ج تا و) یافته های کمی حاصل از شمارش انواع ماست سل ها و تعیین تراکم آن ها در بافت گرانوله درحال ترمیم زخم های گروه های مختلف در روزهای 7، 14 و 21. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین گزارش شده است. (* $P < 0/05$), (* $P < 0/01$), (** $P < 0/001$) و (**** $P < 0/0001$).

Healthy: زخم غیر دیابتی، Diabetic: زخم دیابتی تیمار نشده و D-HAMS: زخم دیابتی تیمار شده با داربست

گروه دیابتی تیمار نشده به طور معنی داری ($P<0/0001$)، بالاتر از هر دو گروه زخم غیردیابتی و دیابتی تیمار شده بود. هم چنین تراکم این ماست سل ها در گروه دیابتی تیمار شده نسبت به گروه غیردیابتی افزایش معنی داری ($P<0/01$)، را نشان داد. در روز 21 نیز تعداد این سلول ها در هر دو گروه دیابتی تیمار نشده و تیمار شده نسبت به گروه غیردیابتی افزایش معنی داری (به ترتیب: $P<0/0001$ و $P<0/001$)، یافته بود. با این وجود تعداد ماست سل های گروه دیابتی تیمار شده کاهش معنی داری ($P<0/001$)، را نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده نشان داد (تصویر شماره 3-د). ارزیابی ماست سل های نوع سه حاکی از آن بود که تراکم این سلول ها در روز هفتم در هر دو گروه دیابتی تیمار نشده و تیمار شده نسبت به گروه غیردیابتی کاهش معنی داری ($P<0/0001$)، یافته است. در روز 14 تعداد این سلول ها در گروه دیابتی تیمار نشده به طور معنی داری ($P<0/001$)، بالاتر از هر دو گروه زخم غیردیابتی و دیابتی تیمار شده بود. هم چنین تراکم ماست سل های نوع سه در روز 21 در گروه دیابتی تیمار نشده افزایش معنی داری ($P<0/0001$)، را نسبت به گروه های زخم غیردیابتی و دیابتی تیمار شده نشان داد. ضمن آن که در این روز افزایش تعداد این سلول ها در گروه دیابتی تیمار شده نیز به طور معنی داری ($P<0/01$)، بالاتر از گروه زخم غیردیابتی بود (تصویر شماره 3-ه). سرانجام ارزیابی تجمیع ماست سل ها در روز هفتم نشان داد که تراکم این سلول ها در هر دو گروه دیابتی تیمار نشده و تیمار شده نسبت به گروه غیردیابتی کاهش معناداری (به ترتیب: $P<0/0001$ و $P<0/05$)، یافته است. با این حال تراکم این سلول ها در گروه دیابتی تیمار شده نسبت به دیابتی تیمار نشده افزایش معناداری ($P<0/001$)، را نشان داد. در روز 14 و 21 تعداد کل ماست سل ها در گروه دیابتی تیمار نشده به طور معناداری ($P<0/0001$)، بالاتر از هر دو گروه زخم غیردیابتی و دیابتی تیمار شده بود. در حالی که افزایش تراکم این سلول ها در گروه دیابتی تیمار شده نسبت به گروه غیردیابتی در روزهای 14

و 21 به ترتیب در سطح ($P<0/05$) و ($P<0/001$)، افزایش یافته بود. ضمن آن که تراکم کلی ماست سل ها در روزهای 14 و 21 در گروه دیابتی تیمار شده نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده کاهش معنی داری ($P<0/0001$)، یافته بود (تصویر شماره 3-و).

بحث

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود که پیوند HAMS به محل زخم دیابتی موجب بهبود شاخص درصد بسته شدن زخم نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده می شود. هم چنین ارزیابی انواع ماست سل های موجود در بافت گرانوله در حال ترمیم زخم (به عنوان سلول های دخیل در فرایند ایجاد و تداوم التهاب) نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، تراکم این سلول ها در زخم دیابتی تیمار نشده در روز هفتم کم تر و در روزهای 14 و 21 بیش تر می باشد. در حالی که این تغییرات تقریباً در همه موارد در گروه دیابتی تیمار شده تعدیل شده بود و تفاوت های معناداری را با گروه دیابتی تیمار نشده نشان می داد. حتی میزان این تعدیل به گونه ای بود که در گروه دیابتی تیمار شده تراکم ماست سل های نوع یک و سه در روز 14 به سطح گروه غیردیابتی بازگشته بود. این روند تغییرات تعداد ماست سل ها در زخم های دیابتی نسبت به زخم غیردیابتی بدان معنی است که در بیماران دیابتی التهاب حاد اولیه با تاخیر شروع شده و سپس به صورت مزمن درآمده و در زمان مناسب فرکش نمی کند؛ از این رو فرایند التیام زخم دچار اختلال می شود (27). در همین راستا نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعدیل تراکم ماست سل ها با استفاده از پیوند HAMS می تواند فرایند التیام زخم دیابتی را به طور مؤثری بهبود بخشد. ترمیم زخم های پوستی تحت تأثیر عواملی مانند حضور فاکتورهای رشد ضروری، التهاب کنترل شده، به هنگام و گذرا، خون رسانی مناسب و جبران ماتریکس ازدست رفته است تا یک ریز محیط سه بعدی مطلوب را به منظور چسبندگی، نفوذ و مهاجرت سلول ها و هم چنین

رگ‌زایی جدید فراهم نمایند (6). از این رو، در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی در میان پزشکان، مهندسان بافت و زیست‌شناسان برای طراحی و ساخت سازه‌های قابل پیوند بافتی مؤثر صورت گرفته تا بتوان روند بهبود را به‌ویژه در زخم‌های مزمن دیابتی تسریع نمود (11). با همین رویکرد، در مطالعه حاضر یک داربست سه‌بعدی متخلخل حاصل از پرده آمینون انسانی سلول‌زدایی شده به‌عنوان یک ماتریکس طبیعی باهدف ترمیم زخم دیابتی ایسکمیک تمام ضخامت پوستی طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر آن، برای درک بهتر اثر این نوع مداخله بر روند بهبود زخم، نتایج در سه مرحله اصلی ترمیم زخم، یعنی روزهای هفتم (فاز التهابی)، 14 (فاز تکثیری) و 21 (فاز بازآرایی) مورد ارزیابی قرار گرفت (11، 28).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پرده آمینون انسانی علاوه بر دارا بودن ماتریکسی مشابه درم پوست، حاوی سایتوکاین‌های گوناگونی است (20). از بین این سایتوکاین‌ها، $TGF-\beta$ و bFGF دارای گسترده‌ترین فعالیت‌ها در فرایند ترمیم زخم هستند، چون بر رفتار بسیاری از انواع سلول‌ها مانند فیروبلاست و کراتینوسیت تأثیر می‌گذارند (20، 29). هم‌چنین این سایتوکاین‌ها می‌توانند مهاجرت و تکثیر سلول‌ها را تحریک کرده (30) و فرایند تولید ماتریکس موقت و تشکیل بافت گرانوله را به‌عنوان بستری برای تشکیل عروق جدید، تعدیل رسوب کلاژن و بازآرایی آن (به‌منظور تشکیل ماتریکس دائمی) به‌راه اندازند (31). از جنبه دیگر، یکی از مهم‌ترین چالش‌های ترمیم زخم دیابتی، التهاب طولانی‌مدت است (32). در مراحل بهبود زخم، پس از ایجاد لخته هموستاتیک، فاکتورهای کموتاکتیک مترشح‌ه از پلاکت‌ها نفوذ سلول‌های التهابی از جمله نوتروفیل‌ها و ماست‌سل‌ها را به موضع زخم تحریک می‌کنند. این سلول‌های التهابی نیز با ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی باعث القای التهاب می‌شوند (33). در شرایط طبیعی، فاز التهابی گذرا

به‌سرعت تعدیل شده و فاز تکثیر آغاز می‌شود، اما در شرایط دیابتی ترشح طولانی‌مدت سایتوکاین‌های پیش التهابی باعث ایجاد زخم مزمن غیر التیام‌یافته می‌شود (34). در این رابطه، Chen و همکاران با بررسی مکانیسم مولکولی تأخیر روند بهبود زخم دیابتی ایسکمیک موش صحرایی دریافتند که بیان ژن‌های سایتوکاین‌های پیش التهابی $Tnf-\alpha$ و $IL-1\beta$ در چنین زخم‌هایی به‌طور قابل توجهی بالاتر از زخم‌های غیرمزمن است (35). همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، ماست‌سل‌ها در فرایند التهاب نقش مهمی دارند (8). این سلول‌ها در شرایط نرمال با تحریک سلول‌های فیروبلاست به تولید ECM در طول فاز تکثیری و هم‌چنین افزایش تولید فاکتورهای مؤثر در فرایند رگ‌زایی باعث بهبود زخم می‌شوند (36)؛ اما در شرایط دیابتی، ترشح طولانی‌مدت واسطه‌های التهابی توسط ماست‌سل‌ها باعث ایجاد التهاب مزمن و تأخیر بهبود زخم می‌گردد (34). بدین ترتیب، استفاده از رویکردهایی باهدف تعدیل تراکم ماست‌سل‌ها در موضع زخم موجب تبدیل ماکروفاژهای نوع یک (التهابی) به ماکروفاژهای نوع دو (ضدالتهابی) شده و متعاقباً میزان التهاب را کاهش می‌دهد و از این طریق فرایند ترمیم زخم را سرعت می‌بخشد (27). در این راستا، مطالعات گوناگونی وجود دارد که اثر ضدالتهابی HAM و مشتقات آن را در روند ترمیم زخم گزارش کرده است (29، 37). در مطالعه حاضر، بررسی‌های مورفومتریک ماست‌سل‌ها در بافت گرانوله زخم دیابتی ایسکمیک در حال ترمیم نشان داد که تراکم این سلول‌ها در گروه دیابتی تیمارنشده در روز هفتم نسبت به گروه غیردیابتی کاهش معنادار و در روزهای 14 و 21 افزایش معنادار یافته است. این یافته‌ها تأییدی بر بروز تأخیری التهاب و فروکش نکردن آن در زمان مقتضی و مزمن شدن آن در زخم دیابتی است. از طرفی، پیوند HAMS به محل زخم دیابتی موجب شد تا تغییرات تراکم ماست‌سل‌ها به‌طور چشمگیری تعدیل شود. این تعدیل به‌گونه‌ای بود که

بر ترمیم زخم داشته و تاکنون عوارض جانبی شناخته شده‌ای برای آن گزارش نشده است، می‌توان امیدوار بود که اثربخشی چنین داربست‌های متخلخلی بیش از دیگر روش‌ها باشد.

این مطالعه دارای محدودیت‌هایی است که جای بحث دارد. ابتدا آن که برای بررسی دقیق وقایع سلولی-مولکولی پدیده التهاب لازم است از تست‌هایی همچون RT-qPCR یا وسترن بلات استفاده شود. ضمن آن که مهم‌ترین محدودیت این مطالعه استفاده از مدل حیوان آزمایشگاهی است؛ لذا برای تعمیم نتایج حاصله به انسان بایستی تفاوت‌های بین گونه‌ای مد نظر قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه به شماره 32451 می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر می‌گردد.

References

1. Kumar A, Gangwar R, Ahmad Zargar A, Kumar R, Sharma A. Prevalence of diabetes in India: A review of IDF Diabetes Atlas 10th edition. *Curr Diabetes Rev* 2023.
2. Lotfi MH, Saadati H, Afzali M. Prevalence of diabetes in people aged ≥ 30 years: the results of screen-ing program of Yazd Province, Iran, in 2012. *J Res Health Sci* 2014 Winter; 14(1): 87-91.
3. Esteghamati A, Larijani B, Aghajani MH, Ghaemi F, Kermanchi J, Shahrami A, et al. Diabetes in Iran: Prospective Analysis from First Nationwide Diabetes Report of National Program for Prevention and Control of Diabetes (NPPCD-2016). *Sci Rep* 2017; 7(1): 13461.
4. Hunt DL. Diabetes: foot ulcers and amputations. *BMJ Clin Evid* 2011; 2011: 0602.
5. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* 2019; 99(1): 665-706.
6. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;89(3):219-29.
7. Dasari N, Jiang A, Skochdopole A, Chung J, Reece EM, Vorstenbosch J, Winocour S. Updates in Diabetic Wound Healing, Inflammation, and Scarring. *Semin Plast Surg* 2021; 35(3): 153-158.
8. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol* 2013; 22(8): 507-510.
9. Soleimani H, Amini A, Abdollahifar MA, Norouzian M, Kouhkeil R, Mostafavinia A, et al. Combined effects of photobiomodulation and curcumin on mast cells and wound strength in wound healing of streptozotocin-

تراکم ماست سل‌های نوع یک و سه در روز 14 به سطح گروه غیردیابتی رسیده بود. Higa و همکاران گزارش نمودند که ماتریکس پرده آمینون به‌طور قابل توجهی بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی را سرکوب می‌کند (38). هم‌چنین King و همکاران دریافتند که این ماتریکس دارای خواص ضدالتهابی و ضد میکروبی است (17). بطور کلی در مطالعه حاضر، تأثیر مثبت پیوند داربست حاصل از ماتریکس پرده آمینون انسان بر تعدیل واکنش‌های التهابی از طریق اثر بر تعداد ماست سل‌های موجود در بافت گرانوله و به دنبال آن بهبود شاخص درصد بسته شدن زخم دیابتی ایسکمیک تمام ضخامت پوستی موش صحرایی نشان داده شد. بی‌شک نیاز به مطالعات دقیق‌تر و جامع‌تری است تا بتوان ارتباط دقیق بین اثر پیوند HAMS بر تراکم و عملکرد ماست سل‌ها و هم‌چنین دیگر پارامترهای دخیل در ترمیم زخم دیابتی را روشن ساخت. با این وجود، از آن‌جا که زخم‌پوش‌های متنوع حاصل از پرده آمینون آثار مثبتی

- induced diabetes in rats. *Lasers Med Sci* 2021; 36(2): 375-386.
10. Holl J, Kowalewski C, Zimek Z, Fiedor P, Kaminski A, Oldak T, Moniuszko M, Eljaszewicz A. Chronic Diabetic Wounds and Their Treatment with Skin Substitutes. *Cells* 2021; 10(3): 655.
 11. Milan PB, Lotfibakhshaiesh N, Joghataie MT, Ai J, Pazouki A, Kaplan DL, et al. Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells. *Acta Biomater* 2016; 45: 234-246.
 12. Saki M, Kazemzadeh Narbat M, Samadikuchaksaraei A, Ghafouri HB, Gorjipour F. Biocompatibility Study Of A Hydroxyapatite-Alumina And Silicon Carbide Composite Scaffold For Bone Tissue Engineering. *Cell Journal (Yakhteh)* 2009; 11(1): 55-60.
 13. Mobini S, Hoyer B, Solati-Hashjin M, Lode A, Nosoudi N, Samadikuchaksaraei A, et al. Fabrication and characterization of regenerated silk scaffolds reinforced with natural silk fibers for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101(8): 2392-2404.
 14. Nasiry D, Khalatbary AR, Abdollahifar MA, Amini A, Bayat M, Noori A, et al. Engraftment of bioengineered three-dimensional scaffold from human amniotic membrane-derived extracellular matrix accelerates ischemic diabetic wound healing. *Arch Dermatol Res* 2021; 313(7): 567-582.
 15. Elkhennany H, El-Derby A, Abd Elkodous M, Salah RA, Lotfy A, El-Badri N. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13(1): 8.
 16. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2015; 173(2): 370-378.
 17. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28(2-3): 161-169.
 18. Ryzhuk V, Zeng XX, Wang X, Melnychuk V, Lankford L, Farmer D, et al. Human amnion extracellular matrix derived bioactive hydrogel for cell delivery and tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 85: 191-202.
 19. Yu H, Chen X, Cai J, Ye D, Wu Y, Fan L, et al. Novel porous three-dimensional nanofibrous scaffolds for accelerating wound healing. *Chemical Engineering Journal* 2019; 369: 253-262.
 20. Castellanos G, Bernabé-García Á, Moraleta JM, Nicolás FJ. Amniotic membrane application for the healing of chronic wounds and ulcers. *Placenta* 2017; 59: 146-153.
 21. Leal-Marín S, Kern T, Hofmann N, Pogozhykh O, Framme C, Börgel M, et al. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2021; 109(8): 1198-1215.
 22. Nasiry D, Khalatbary AR, Abdollahifar MA, Bayat M, Amini A, Kazemi Ashtiani M, Rajabi S, Noori A, Piryaie A. SDF-1 α loaded bioengineered human amniotic membrane-derived scaffold transplantation in combination with hyperbaric oxygen improved diabetic wound healing. *J Biosci Bioeng* 2022; 133(5): 489-501.
 23. Nasiry D, Khalatbary AR, Ghaemi A, Ebrahimzadeh MA, Hosseinzadeh MH. Topical administration of *Juglans regia* L.

- leaf extract accelerates diabetic wound healing. *BMC Complement Med Ther* 2022; 22(1): 255.
24. Nasiry D, Khalatbary AR, Ebrahimzadeh MA. Anti-Inflammatory and Wound-Healing Potential of Golden Chanterelle Mushroom, *Cantharellus cibarius* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms* 2017; 19(10): 893-903.
25. Rohr-Udilova N, Tsuchiya K, Timelthaler G, Salzmann M, Meischl T, Wöran K, et al. Morphometric Analysis of Mast Cells in Tumor Predicts Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation. *Hepatol Commun* 2021; 5(11): 1939-1952.
26. Lee JS, Shin J, Park HM, Kim YG, Kim BG, Oh JW, et al. Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering. *Biomacromolecules* 2014; 15(1): 206-218.
27. Tellechea A, Leal EC, Kafanas A, Auster ME, Kuchibhotla S, Ostrovsky Y, et al. Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. *Diabetes* 2016; 65(7): 2006-2019.
28. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther* 2017; 34(3): 599-610.
29. Song M, Wang W, Ye Q, Bu S, Shen Z, Zhu Y. The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 77: 739-747.
30. Gharaboghaz MNZ, Farahpour MR, Saghaie S. Topical co-administration of *Teucrium polium* hydroethanolic extract and *Aloe vera* gel triggered wound healing by accelerating cell proliferation in diabetic mouse model. *Biomed Pharmacother* 2020; 127: 110189.
31. El Gzaerly H, Elbardisey DM, Eltokhy HM, Teaama D. Effect of transforming growth factor Beta 1 on wound healing in induced diabetic rats. *Int J Health Sci (Qassim)* 2013; 7(2): 160-172.
32. Bagheri M, Amini A, Abdollahifar MA, Ghoreishi SK, Piryaee A, Pouriran R, et al. Effects of Photobiomodulation on Degranulation and Number of Mast Cells and Wound Strength in Skin Wound Healing of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Photomed Laser Surg* 2018; 36(8): 415-423.
33. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014; 6(265): 265sr6.
34. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1219-1222.
35. Chen C, Schultz GS, Bloch M, Edwards PD, Tebes S, Mast BA. Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6): 486-494.
36. Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 2020; 58(3): 298-312.
37. Tauzin H, Rolin G, Viennet C, Saas P, Humbert P, Muret P. A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 2014; 15(2): 257-265.
38. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005; 24(2): 206-212.