اثر سلول‌های بنیادی اتوگرافت مشتق از چربی در میزان آنژیوژنز فلپ پوستی راندوم در مدل حیوانی موش صحرائی

دکتر حسام شبیری*، دکتر حسین اکبری**، دکتر محمدجواد فاطمی***، دکتر محسن صابری****

چکیده:

زمینه و هدف: نکروز فلپ ناشی از جریان خون ناکافی یک عارضه مشترک در عمل‌های جراحی ترمیمی است. از آنجا که پتانسیل رگ‌زایی سلول‌های بنیادی ثابت شده است، هدف از این مطالعه بررسی اثر سلول‌های بنیادی اتوگرافت مشتق از چربی درمیزان آنژیوژنز فلپ پوستی راندوم در مدل حیوانی موش صحرائی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹٤ در آزمایشگاه حیوانات بیمارستان حضرت فاطمه(س) انجام گرفته است. در این مطالعه ۲٤ موش صحرائی مذکر نژاد اسپراگ داولی (Sprague-Dawley) با وزن حدود ۳۰۰-۳۵۰ گرم پس از بیهوشی به دو گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند. در گروه مطالعه سلول‌های بنیادی اتوگرافت از بافت چربی ناحیه اینگوینال تهیه و کشت داده شد و سپس در پایه فلاپ راندوم بصورت زیرجلدی تزریق گردید و در گروه کنترل نرمال سالین تزریق شد. در روزهای ۷ و ۱٤ فتوگرافی برای تعیین میزان نکروز فلپ تهیه گردید و سپس در روز چهارده پایه فلپ برای بررسی هیستوپاتولوژی و شمارش تعداد مویرگ‌ها نمونه برداری شد. در پایان اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۹ و آزمون‌های تی مقایسه میانگین نمونه‌های زوجی و تی مقایسه میانگین‌های دو گروه مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مقایسه بین دو گروه نشان داد میانگین سطح زنده فلپ در روز هفتم در گروه سلول بنیادی ۱۰/۵۹۲±۱/۰۹۵ و در گروه کنترل ۵/۷۹۳±۲/۲۳ و در روز چهاردهم به ترتیب ۱۰/۷٦۰±۰/۹۳٤ و ۵/۵۱۹±۲/۱۰۷ بود که اختلاف آنها معنادار بوده است ($P < ۰/۰۰۱$). نتایج آنژیوژنز گروه سلول‌های بنیادی ۲۷/٦٦٦±۱۰/۲۰۱ و گروه کنترل ۱۲/۷۵۰±٦/۸۱۰ بوده و تفاوت در دو گروه معنادار نشان داده شد ($P < ۰/۰۰۱$)، به طوری که میانگین آنها در گروه سلول‌های بنیادی بیشتر است.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی پتانسیل افزایش بقای فلپ راندوم را دارند. این مکانیسم می‌تواند هم با تمایز این سلول‌ها به سلول‌های اندوتلیال و یا به طور غیرمستقیم از طریق افزایش آنژیوژنز باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مشتق از چربی، آنژیوژنز، فلپ راندوم

* دستیار گروه جراحی ترمیمی و پلاستیک، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بیمارستان حضرت فاطمه(س)

** استادیار گروه جراحی ترمیمی و پلاستیک، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بیمارستان حضرت فاطمه(س)، مرکز تحقیقات سوختگی

*** استاد گروه جراحی ترمیمی و پلاستیک، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بیمارستان حضرت فاطمه(س)، مرکز تحقیقات سوختگی

**** استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات طب، قرآن و حدیث

نویسندهٔ پاسخگو: دکتر حسین اکبری

تلفن: ۸۸۸۸۴۲۷۵

E-mail: hakbari1339@yahoo.com

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۰۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۰

زمینه و هدف

فلاپ‌های پوستی یکی از روش‌های معمول پوشش زخم و بازسازی دیفکت‌های ناشی از نقایص مادرزادی، تومورها و تروما در جراحی پلاستیک و ترمیمی می‌باشد، به ویژه زمانی که نامناسب بودن بستر و نرسیدن خون کافی مانع از زنده ماندن پیوند پوست شود.[۱-۳] نمونه‌هایی از این کاربردها عبارتند از زخم‌های وسیع و زخم‌هایی که باعث در معرض قرار گرفتن استخوان، تاندون، عروق و دیگر ساختارهای حیاتی شده‌اند.[۴]

فلپ در جراحی پلاستیک به علت نتایج بهتر زیبایی و عملکردی بیشتر از گرافت استفاده می‌شود.[۱] اولین فلپ پوستی از نوع کوتانئوس بوده که در سال ۱۹۷۰ به کار برده شده است. فلپ‌ها بر اساس ناحیه دهنده یا گیرنده، فاصله آنها از یکدیگر، نحوه خون‌رسانی و نیز نوع بافت منتقل شده تقسیم می‌شوند. شایعترین فلپ در جراحی پلاستیک از نوع راندوم است که خونرسانی آن به شبکه عروق زیرجلدی وابسته است و محدودیت طول به عرض دارد. علاوه بر این ریسک فاکتورهای بیمار (مصرف سیگار، دیابت، رادیوتراپی و بیماری عروق محیطی) تعیین می‌کند، فلاپ بر چه پایه‌ای و با چه ابعادی قابل استفاده است.[۳و۶]

مساله اساسی در استفاده از فلاپ‌ها مربوط به خونرسانی می‌باشد، بطوریکه از دست رفتن فلاپ به دلیل نکــروز ناشی از ایسکمی، بخصوص در بخش دیستال آن، چالش اولیه در بکارگیری آنها است.[۷و۸]

با توسعه جراحی ترمیمی، به تدریج جلوگیری از نکروز فلپ جزئی یا کلی، که عارضه اصلی استفاده از فلپ پوستی است، پیشرفت سریعی داشته است. اگر چه علت نکروز فلپ پوستی به طور کامل هنوز حل و فصل نشده است، عدم خونرسانی از مواد مغذی کافی قطعاً نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی نکروز ایفا می‌کند.[۹]

برای مقاصد بالینی فاکتورهای ذکر شده عوامل محدودکننده هستند، حال اگر با استفاده از روشی، نئووازکولاریزاسیون را در فلاپ افزایش دهیم، چه از طریق ایجاد رگ‌های جدید (وازکولوژنز) و چه از طریق تسریع در برقراری ارتباط رگ‌های آسیب دیده (آنژیوژنز)، امکان استفاده از فلاپ‌های بزرگتر با پایه کوچکتر بخصوص در بیماران با میکروآنژیوپاتی مهیا خواهد شد.[۱]

نظریه‌های فعلی بر این باورند که نئوواسکولاریزاسیون از طریق دو مکانیسم رخ می‌دهد. مکانیسم اول آنژیوژنز، گسترش رگ‌های میکروسکوپی از یک شبکه مویرگی موجود است. تا همین اواخر، اعتقاد بر این بود که آنژیوژنز تنها روشی است که عروق خونی جدید را می‌توان در سیستم عروقی بزرگسالان تشکیل دهد. مکانیسم دوم تشکیل عروق خونی جدید واسکولوژنیز یعنی تشکیل رگ‌های خونی از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (EPCs) در محل تمایز است.[۹و۱۰]

اغلب مطالعات با هدف بالا بردن بقای فلپ انجام شده است. روش‌های مختلفی برای تحریک آنژیوژنز آزمایش شده‌اند از قبیل درمان اکسیژن پرفشار، تقسیم مرحله‌ای پایه فلپ، استفاده از داروهای بی‌حسی موضعی مثل اپی نفرین و استفاده از عوامل برونزا مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF) به منظور افــزایش عروق و بهبود بقای فلپ ایسکمیک نشان داده شده است.[۱۱-۱۶] اما این مواد به علت عمرکوتاه مدت و محدودیت درتولید سلول، در روند بهبود زخم چندان مؤثر نبوده‌اند.[۱۷]

در سال‌های اخیر پیشرفت سریع زیست شناسی سلولی و ژنتیک در شناسایی توانایی سلول‌های بنیادی سوماتیک، به ویژه سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان (BSC) و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSC ها)، به افزایش نئوواسکولاریزاسیون کمک‌کننده بوده است.[۱۸-۲۱]

سلول بنیادی به سلول غیرمتمایزی گفته می‌شود که قابلیت تجدید شوندگی و ایجاد تعداد زیادی نسل متمایز را دارد. اولین سلول‌های بنیادی حقیقی با این مشخصات از جنین تحت عنوان سلول بنیادی جنینی بدست آمد[۲۲و۲۳] که کاربرد تئوریک آن با محدودیت‌هایی همراه بود. در مقایسه با این سلول‌های بنیادی جنینی، سلول بنیادی بزرگسالان این محدودیت‌ها را نداشته و از میان انواع آن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در سال ۱۹۷۶ برای اولین بار شناخته شدند.[۲۴]

مطالعات مختلف به مقایسه انواع مختلف سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، بند ناف و یا بافت چربی پرداختند و این سلول‌ها در مقایسه با هم از نظر مورفولوژی، ایمنی و تمایز تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما اثرات پیش‌آگهی دهنده سلول‌های بنیادی استخوان و چربی به خوبی نشان می‌دهد که این دو گروه در مکانیسم آنزیوژنز به نظر می‌رسد، مناسب باشند.[۲۵]

اگرچه تا مدت‌ها مغز استخوان منبع اصلی بود و در اکثر این مطالعات سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان (سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و مشتق از بافت چربی به میزان کمتر (ADSC) استفاده شده است.[۲۶]

ولی همراه با شناسایی توانایی ADSCها با مزایای متعدد از قبیل حداقل تهاجم در تکنیک‌های استخراج، جداسازی، و کشت آنها را در خط اول تحقیق و پژوهش برای اهداف درمانی مختلف در علوم پزشکی قرار داده است.[۲۷و۲۸]

مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان افزایش بقاء فلاپ‌های پوستی راندوم از طریق وازکولوژنز - انژیوژنز با استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انجام گرفت.

مــواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده و در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه حیوانات بیمارستان حضرت فاطمه(س) انجام گرفته است. در این مطالعه از ۲۴ موش صحرائی مذکر نژاد اسپراگ داولی با وزن حدود ۳۰۰-۳۵۰ گرم استفاده گردید. موش‌های صحرائی در تمام طول دوره مطالعه با حفظ قواعد و ضوابط و توصیه‌های کمیته مراقبت از حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری گردیدند.

بدین صورت که در قفس‌های جداگانه استاندارد بـا چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای 0C ۲۲-۲۴ نگهداری و پروتکل‌های بیهوشی استاندارد و روش معدوم کردن حیوانات توصیه شده مورد استفاده قرار گرفت. هر موش صحرائی به صورت آزادانه به غذا و آب دسترسی داشت و غذای پلت شده استاندارد در اختیار حیوانات قرار داشت.

پس از ایجاد بیهوشی عمومی با تزریق عضلانی ترکیب کتامین ۱۰٪ (۹۰ mg/kg) (Alfasan Inc., Woerden, Netherland) و زایلازین ۲٪ (۹ mg/kg) (Alfasan Inc., Woerden, Netherland)، موش‌های صحرائی به طور تصادفی به دو گروه (گروه مداخله و گروه کنترل) تقسیم شدند. در گروه مداخله پس از بیهوشی، موهای ناحیه اینگوئینال با مو تراش برقی تراشیده شده و با بتادین و الکل آماده گردیده. با برش نیم سانتیمتری ناحیه اینگوئینال موش صحرائی، بخشی از چربی ناحیه به طول یک سانتیمتر و حجم ۳-۲ سی سی برداشت شده و در محیط مناسب (Dulbecco's Modified Eagle Medium) برای استخراج ADSC به مرکز تک یاخته ارسال گردید. سپس ADSCها کشت داده شده و به حجم تقریبی یک میلیون سلول رسانده شد.

سپس سلول‌های بنیادی در پایه فلاپ راندوم طراحی شده بر سطح پشتی حیوان بصورت زیرجلدی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر تزریق گردید و در گروه کنترل نرمال سالین تزریق شد. ۲۱ روز پس از تزریق فلاپ راندوم بر سطح پشتی حیوان با اندازه استاندارد ۶ در ۲ سانتیمتر قدام به فاشیا دایسکت شده و مجدد در محل اولیه با نخ نایلون ۴ صفر بخیه شد.

در روزهای ۷ و ۱۴ پس از جراحی عکس دیجیتال تمام طول فلپ به همراه خط کش مدرج تهیه گردید (با دوربین Nikon D300 و لنز ماکروی ۶۰ میلی‌متری با درجه بزرگنمایی ۱:۱۰ و فاصله ۸۰ سانتی‌متری). عکس‌های دیجیتالی با نرم افزار Image J, version 1.45, (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) برای اندازه‌گیری سطح Gross نکروزه و سطح کل فلاپ مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در روز چهارده پایه فلپ برداشته و سپس برش‌های متعددی از ۱ سانتی‌متری قاعده فلاپ با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزینوفیل جهت شمارش تعداد مویرگ‌ها در ۲۰ فیلد میروسکوپی (با بزرگنمایی ۴۰) تهیه گردید.

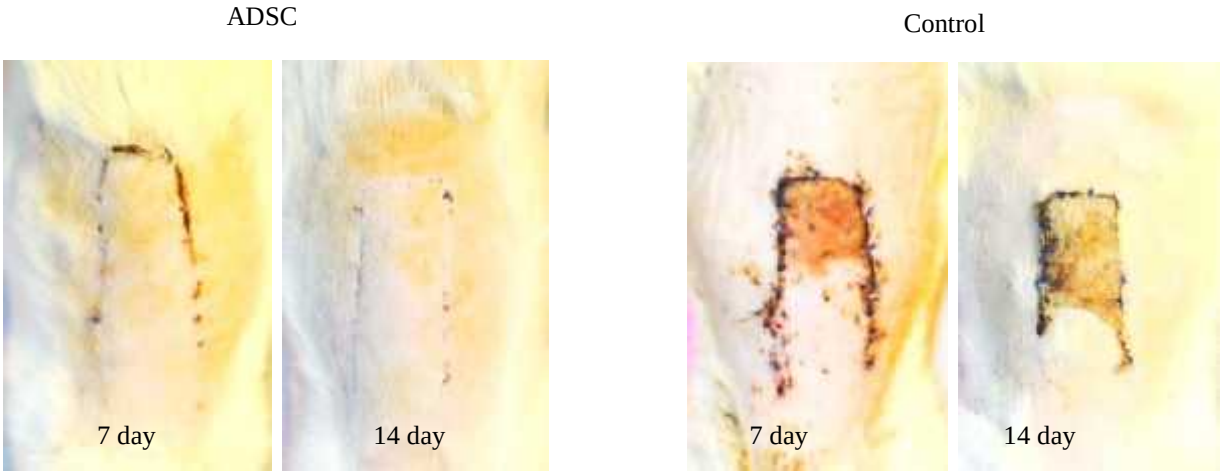
داده‌های جمع‌آوری شـده شامل متغیرهای سطح زنده فلپ و میزان آنژیوژنز توسـط SPSS ۱۹ بررسی شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار خلاصه شدند. برای انجام تحلیل‌های آماری، از آنجا که توزیع نمونه‌ها براسـاس آزمون کولموگروف - اسمیرنوف در بین دو گروه نرمال بود، از آزمون تی مقایسه میانگین‌های دو گروه زوجی و آزمون تی مقایسه میانگین‌های دو گروه مستقل استفاده شد. میزان معناداری کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شده است.

یافته‌ها

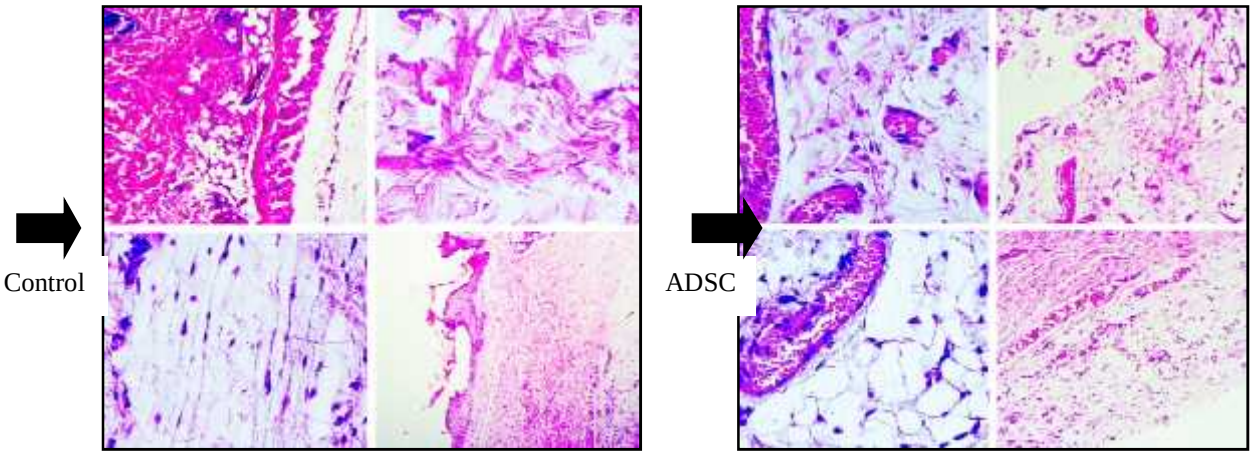
همانگـونه که جدول یک می‌توان دید، نتایج حاصل از مقایسه میانگیـن متغیـرها بین دو گروه نشان می‌دهد که میانگین سطـح زنده فلـپ در روزهای ۷ و ۱۴ و نتایج آنژیوژنز بین دو گـروه اختلاف آماری معناداری دارند، به طوری که میانگین متغیـرها در گروه سلول‌های بنیادی بیشتر است ($P < ۰/۰۰۱$).

جدول ۱- مقایسه میانگین سطح در روز ۷ و ۱٤ اختلاف آنها و میزان آنژیوژنز در دو گروه

متغیر	گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	مقدار احتمال
سطح (روز ۷)	سلول بنیادی	۱۲	۱۰/۵۹۲	۱/۰۹۵	$P < ۰/۰۰۱$
	کنترل	۱۲	۵/۷۹۳	۲/۰۲۳	
سطح (روز ۱۴)	سلول بنیادی	۱۲	۱۰/۷۶۹	۰/۹۳۴	$P < ۰/۰۰۱$
	کنترل	۱۲	۵/۵۱۹	۲/۱۰۷	
آنژیوژنز	سلول بنیادی	۱۲	۲۷/۶۶۶	۱۰/۲۰۱	$P < ۰/۰۰۱$
	کنترل	۱۲	۱۲/۷۵۰	۶/۸۱۰	



تصویر ۱- مقایسه سطح فلپ در یکی از نمونه‌ها در هر گروه در روزهای ۷ و ۱٤



تصویر ۲- تصویر برداری میکروسکوپی میزان آنژیوژنز در دو گروه سلول‌های بنیادی و گروه کنترل را نشان می‌دهد

(Hematoxylin-eosin, X 40)

با توجه به مقادیر میانگین متغیرها در جدول یک و با استفاده از آزمون تی زوجی مقایسه میانگین‌ها نشان داده شد که میانگین سطح زنده فلپ بین روزهای ۷ و ۱۴ در گروه سلول‌های بنیادی (P = ۰/۰۶۶) و در گروه کنترل (P = ۰/۲۴۶) از لحاظ آماری اختلاف معناداری ندارد.

بحث

سلول‌های بنیادی با قابلیتشان نه تنها در تولید سلول‌های جدید بلکه توانایی تبدیل به سلول‌های خاص با عملکردهای مختلف شناخته می‌شوند.[۲۱و۲۹] آغاز مطالعه سلول‌های بنیادی توسط محققان **Ernest McCulloch** و **James Till** در مؤسسه سرطان آنتاریو در تورنتو رخ داده است. آنها گزارشی درخصوص سلول‌های خود تجدید در مغز استخوان موش بیان کردند و این سلول‌ها به عنوان احیاء کننده سلول‌های بنیادی فرض شد.[۳۰] در سال ۲۰۰۱ سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSC) به گروهی از سلول‌های بنیادی بالغ اضافه شد و نشان داد که آنها قادر به تمایز به سلول‌های مزودرمی (سلول‌های چربی، سلول‌های غضروفی، استخوان و میوسیت) هستند.[۳۱]

در جراحی پلاستیک نیز این نوع سلول به طور فراوان مورد مطالعه قرار گرفته و برای موارد گوناگون، به عنوان مثال، برای افزایش میزان موفقیت زنده ماندن در گرافت‌ها و فلپ‌های پوستی استفاده می‌شود.[۳۱] از آنجا که بهبود بقاء فلاپ پوستی راندوم بصورت عمده وابسته به نئووازکولاریزاسیون و از طریق دو مکانیسم مجزای انژیوژنز و وازکولوژنز است.[۲و۱۸و۲۲] مطالعه حاضر به بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بر میزان آنژیوژنز فلپ راندوم در موش صحرائی پرداخته است. به طور کلی مطالعه ما نشان می‌دهد که درمان با ADSC به طور معناداری بقای فلپ را افزایش می‌دهد، که این تأثیر ناشی از افزایش میزان خونرسانی و آنژیوژنز در محل فلپ بوده است. اندازه‌گیری سطح نکروز اغلب برای ارزیابی بقاء فلپ استفاده می‌شود، بنابراین ما هم در این مطالعه میزان سطح زخم را بررسی کردیم. نتایج حاکی از این بود که سطح در روزهای ۷ و ۱۴ بین دو گروه اختلاف آماری معنادار داشته، به طوری که میانگین آنها در گروه سلول‌های بنیادی بیشتر بوده ولی اختلاف اندازه روز ۷ و ۱۴ بین دو گروه از لحاظ آماری معنادار نبوده است.

مشابه مشاهدات ما، **Li** همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در بقای فلپ پوستی در خرگوش بررسی کرده و به این نتایج دست یافتند که گروه مداخله بقای بیشتری نسبت به کنترل داشته، همچنین نتایج هیستوپاتولوژی نشان داد که تراکم مویرگی نیز در گروه سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بالاتر بوده است و این نشان می‌دهد که ADSCها یک سازگاری سیستم ایمنی بهتر و بالقوه برای افزایش جریان خون فلپ پوستی تصادفی می باشد.[۳۱]

در یک مطالعه تجربی روی موش صحرایی، **Suartz** و همکارانش اثر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSC) در زنده ماندن فلپ پوستی تصادفی انجام دادند. آنها نشان دادند که این سلول‌ها قابلیت تمایز به بافت چربی، استخوان و غضروف را در شرایط آزمایشگاهی دارند، همچنین با استفاده از ADSC نکروز به طور قابل توجهی کاهش یافته است.[۳۲] در مطالعه حاضر نیز نتایج سطح زخم نشان‌دهنده کم شدن نکروز در گروه سلول‌های بنیادی روز ۱۴ بوده است.

Hasdemir و همکارانش در سال ۲۰۱۵ تحقیقی با هدف شناسایی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در بقاء فلپ تصادفی در بافت‌های تحت اشعه به انجام رساندند. آنها گزارش دادند که بقاء در گروه سلول‌های بنیادی افزایش یافته بود، اما بر خلاف مطالعه حاضر تفاوت آماری معنادار در تعداد عروق خونی مشاهده نشده بود.[۳۳]

Reichenberger و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۲ مطالعه با هدف بررسی اثر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی فلپ پوستی در حفاظت در برابر ایسکمی انجام دادند. نتایج مطالعه نشان داد که گروه درمان با ADSC در مقایسه با گروه کنترل، میزان بقاء و پرفوژن فلپ به طور قابل توجهی بالاتر بوده است که این یافته‌ها با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد.[۳۴]

در مطالعه مشابه دیگری **Izmirli** و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در فلپ نشان دادند که افزایش قابل توجه در سطح بقاء فلپ در گروه درمان با سلول‌های بنیادی نسبت به گروه کنترل وجود داشته است. بررسی هیستوپاتولوژیک نیز نشان داد که تراکم مویرگی در گروه سلول‌های بنیادی بالاتر از گروه شاهد بود.[۳۵]

بر اساس این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که درمان با سلول‌های با سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

نئوواسکولاریزاسیون (نورگ زایی) را افزایش می‌دهد. مطالعه حاضر با تأکید بر میزان آنژیوژنز انجام شد و همانطور که پیشتر نیز شرح داده شد، نئوواسکولاریزاسیون از طریق دو مکانیسم انژیوژنز و واسکولوژنز صورت می‌گیرد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد، مطالعات آینده با تأکید بر این موضوع که سلول‌های بنیادی بیشتر بر کدام یک از این مکانیسم‌ها اثرگذار است، انجام گردد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشـان می‌دهد که افزایش بقای فلپ تصادفی پوست می‌تواند از طـریق تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی اتولـوگ به محل فلپ به دست آید و که این سلول‌ها می‌توانند به سلـول‌های اندوتلیال افتـراق یابند، در نتیجه آنژیوژنز و نئوواسکـولاریزاسیون افـزایش می‌یابد.

Abstract:

The Effects of Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) Autograft in the Viability of Random Skin Flap in Rats

Shobeyri H. MD*, Akbari H. MD**, Fatemi M. J. MD, Saberi M. MD*****

(Received: 1 Sep 2016 Accepted: 30 April 2017)

Introduction & Objective: Flap necrosis caused by inadequate blood flow to a common complication of surgery is reconstructive. Since the angiogenic potential of stem cells has been shown, the purpose of this study was to evaluate the effect of adipose-derived stem cells autograft rate of random skin flap angiogenesis animal model rat.

Materials & Methods: This experimental study in 1394 in laboratory animals Hazrat Fatima (SA) was conducted. In this study, 24 male Sprague-Dawley, rats weighing 300-350 g were divided into two groups after anesthesia. In the study group of stem cells from fat tissue autograft were inguinal area and cultured and then injected subcutaneously at the base of random flap in the control group received saline. On days 7 and 14 photographs were taken to determine the extent of necrosis flap and then the flap base for histopathological examination on day fourteen and counting the number of capillaries were sampled. At the end, the data were analyzed by using 19 SPSS software and paired samples t-test.

Results: The comparison between the two groups showed areas of flap survival on the seventh day of the stem cell group 10.592 ± 1.095 and in the control group 5.793 ± 2.023 and on the fourteenth day respectively 10.769 ± 0.934 and 5.519 ± 2.107, the difference was significant ($P < 0.001$). Results angiogenesis stem cell group 27.666 ± 10.201 and control 12.750 ± 6.810 and the difference in the two groups was significant ($P < 0.001$), so that the average of the group is more stem cells.

Conclusions: These findings suggest that adipose-derived stem cells have the potential to improve the survival of random flap. This mechanism can also differentiate these cells into endothelial cells or indirectly by increasing angiogenesis is.

Key Words: Adipose-Derived Stem Cells, Angiogenesis, Random Flap

**Resident of Plastic & Reconstructive Surgery, Iran University of Medical Sciences, Hazrate Fateme Hospital, Tehran, Iran*

***Assistant Professor of Plastic & Reconstructive Surgery, Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Hazrate Fateme Hospital, Tehran, Iran*

****Professor of Plastic & Reconstructive Surgery, Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Hazrate Fateme Hospital, Tehran, Iran*

*****Assistant Professor of Community Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Medicine ,Quran and Hadith Research Center, Tehran, Iran*

References:

1. Schmid MH, Meuli-Simmen C, Hafner J. Repair of cutaneous defects after skin cancer surgery. Recent Results Cancer Res2002; 160: 225-233.
2. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. Br J Plast Surg1973; 26: 202-213.
3. Lu Feng, Hiroshi Mizuno, Cagri A. Uysal, et al. Improved Viability of Random Pattern Skin Flaps through the Use of Adipose-Derived Stem Cells. Plast. Reconstr. Surg. 2008; 121: 50.
4. Li QF, Reis ED, Zhang WX, Silver L, Fallon JT, Weinberg H. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. Journal of reconstructive microsurgery. 2000 Jan; 16(01): 0045-50.
5. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, Buncke HJ, Lineaweaver WC. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. Annals of plastic surgery. 2001 Mar 1; 46(3): 314-9.
6. Pang Y, Lineaweaver WC, Lei MP, Oswald T, Shamburger S, Cai Z, Zhang F. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. Plast Reconstr Surg2003; 112: 556-564.
7. 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 May; 30(4): 275-81.
8. Lee DW, Jeon YR, Cho EJ, Kang JH, Lew DH. Optimal administration routes for adipose-derived stem cells therapy in ischaemic flaps. J Tissue Eng Regen Med. 2014 Aug; 8(8): 596-603.
9. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. Annals of plastic surgery. 2005 May 1; 54(5): 546-52.
10. Tepper OM, Galiano RD, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cells: the promise of vascular stem cells for plastic surgery. Plast Reconstr Surg. 2003; 111: 846.
11. Richards L, Lineaweaver WC, Stile F, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the tubed pedicle flap survival in a rat model. Ann Plast Surg 2003; 50: 51-56.
12. Kitlowski EA. A simple method for gradual occlusion of circulation in tubed pedicle flaps. Plast Reconstr Surg1954; 13: 162-166.
13. Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, et al. Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study. Ann Plast Surg 2002; 49: 73-80.
14. Stark GB, Hong C, Futrell JW. Enhanced neovascularization of rat tubed pedicle flaps with low perfusion of the wound margin. Plast Reconstr Surg1987; 80: 814-824.
15. Park SS, Rodeheaver GT, Levine PA. Role of ischemic gradient in neovascularization of interpolated skin flaps. Arch Otolaryngol Head Neck Surg1996; 122: 886-889.
16. Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, et al. The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfers. Br J Plast Surg1991; 44: 585-588.
17. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. Circulation2003; 107: 1359-1365.
18. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res1999; 85: 221-228.
19. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. Circ Res2000; 87: 728-730.
20. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell trans-plantation for organ vascularization and regeneration. Nat Med 2003; 9: 702-712.
21. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. Circulation2004; 109: 656-663.
22. Evans, M. J., and Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154.
23. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145.
24. Friedenstein, A. J. Precursor cells of mechanocytes. Int. Rev. Cytol. 1976; 47: 327.
25. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells2006; 24: 1294-1301.
26. Zhang FG, Tang XF. New advances in the mesenchymal stem cells therapy against skin flaps necrosis. World J Stem Cells2014; 6: 491-496.
27. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. Plast Reconstr Surg2010; 126: 1163-1171.
28. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical

viability of random skin flap in rats. Acta Cirurgica Brasileira. 2014; 29: 6-9.
33. Hasdemir M, Agir H, Eren GG, Aksu MG, Alagoz MS, Duruksu G, Saglam O, Karaöz E. Adipose-derived stem cells improve survival of random pattern cutaneous flaps in radiation damaged skin. Journal of Craniofacial Surgery. 2015 Jul 1; 26(5): 1450-5.
34. Reichenberger MA, Heimer S, Schaefer A, Lass U, Gebhard MM, Germann G, Leimer U, Köllensperger E, Mueller W. Adipose derived stem cells protect skin flaps against ischemia-reperfusion injury. Stem Cell Reviews and Reports. 2012 Sep 1; 8(3): 854-62.
35. Izmirli HH, Alagoz MS, Gercek H, Eren GG, Yucel E, Subasi C, Isgoren S, Muezzinoglu B, Karaoz E. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Accelerate Neovascularization in Interpolation Flaps. Journal of Craniofacial Surgery. 2016 Jan 1; 27(1): 264-71.
applications. Plast Reconstr Surg 2012; 129: 1277-1290.
29. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001 Apr; 7(2): 211-28.
30. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature. 1963 Feb 2; 197: 452-4.
31. Li GZ, Sun QZ, Xiong ZY, Huang H, Xu J. [The effect of adipose-derived stem cells on viability of random pattern skin flap in rabbits]. Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waike zazhi = Chinese journal of plastic surgery. 2011 Mar; 27(2): 119-23.
32. Suartz CV, Gaiba S, França JP, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose-derived stem cells (ADSC) in the