

کشت و پیوند سلول‌های فیبروبلاست انسانی (آلوگرافت) بر روی پرده آمیوتیک جهت درمان بیماران مبتلا به اپیدرمولایزیس بولوسا

دکتر محمد جواد فاطمی*، دکتر زهرا عروجی**، دکتر سعید شفیعیان***

احسان تقی آبادی****، میترا نیازی*****

چکیده:

زمینه و هدف: اپیدرمولایزیس بولوسا (EB) یک بیماری ژنتیکی همراه با شکنندگی پوست و بی‌ثباتی در محل اتصال درم به اپیدرم است. تغییر شکل شدید دست به علت ایجاد زخم و چسبندگی بین انگشتان و کف دست این بیماران منجر به از دست دادن عملکرد و کاهش کیفیت زندگی آنها می‌شود. پوشش زخم بعد از باز کردن چسبندگی از مشکلات بزرگ جراحی ترمیمی است. هدف ما در این مطالعه استفاده از آمینون دارای فیبروبلاست آلوگرافت پس از جراحی آزاد کردن چسبندگی دست بیماران مبتلا به EB بوده است.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر نوعی مطالعه مداخله‌ای بوده که بر روی ۶ بیمار مبتلا به اپیدرمولایزیس بولوسا با دفورمیتی و چسبندگی دست انجام شد. با استفاده از نمونه پوست از پشت گوش یکی از والدین بیمار، فیبروبلاست جدا و کشت داده شد و به پرده آمینون منتقل گردید. بعد از آزاد کردن کامل چسبندگی‌های دست، تمام مناطق بدون پوست با آمینون دارای فیبروبلاست آلوگرافت پوشانده شد. سپس سرعت و کیفیت ترمیم زخم، مدت زمان بهبودی و همچنین دامنه حرکتی مفاصل انگشتان و تحمل فشار پوست مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که ترمیم زخم به خوبی انجام شده و مدت ترمیم زخم بین ۱۵ تا ۲۹ روز متفاوت و میانگین مدت ترمیم ۲۳/۱ روز با انحراف معیار ۳/۷۷ بوده است. پوست ترمیم شده به خوبی فشار ناشی از فعالیت‌های توانبخشی دست و اسپلینت را تحمل نموده است.

نتیجه‌گیری: فیبروبلاست آلوگرافت به همراه اسکافولد مانند آمینون می‌تواند نیاز به پیوند پوست در بیماران اپیدرمولایزیس بولوسا را کاهش دهد. نرمال بودن فیبروبلاست آلوگرافت و ترشح کلاژن نوع هفت که در این بیماران وجود ندارد می‌تواند عامل ترمیم بهتر زخم‌ها باشد و از فیبروبلاست‌های اتوگرافت نتایج بهتری داشته باشد. مطالعات تکمیلی کمک کننده است.

واژه‌های کلیدی: اپیدرمولایزیس بولوسا، آلوگرافت، آزاد کردن چسبندگی، فیبروبلاست

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

** پزشک عمومی، گروه تحقیقات زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی،

تلفن: ۸۸۸۴۲۷۵

E-mail: fatemi41@yahoo.com

پژوهشکده رویان

*** متخصص پوست، گروه تحقیقات زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی،

پژوهشکده رویان

**** کارشناسی ارشد بیولوژی تکوین، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی،

مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست پزشکی ترمیمی

***** کارشناسی ارشد کار درمانی، مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

زمینه و هدف

اپیدرمولایزیس بولوسا [Epidermolysis Bullosa (EB)] به یک گروه از اختلالات ناهمگن پوستی ژنتیکی اطلاق می‌گردد که با شکنندگی پوست و ساختارهای اپیتلیال دیگر همراه است.^۱ این بیماری اولین بار در سال ۱۸۷۰ توسط Von Herba معرفی شد.^۲ میزان بروز این بیماری در منابع مختلف به صورت متفاوت از ۱ در ۵۰۰۰۰۰ تا ۱ در یک میلیون نفر گزارش شده است.^۳

این بیماری از یک جهش ژنتیکی در کراتین یا کلاژن ایجاد می‌شود از آنجا که لایه خارجی پوست (اپیدرم) و لایه داخلی پوست توسط قلاب‌های پروتئینی از جنس کراتین یا کلاژن به هم متصل شده‌اند و این قلاب‌ها مانع حرکت مستقل این دو لایه می‌شوند. در افراد مبتلا به EB، این قلاب‌ها به درستی ساخته نمی‌شوند.^۴

همی دسموزم‌ها (HD) یکسری فیلامنت‌های لنگری هستند که از یک کمپلکس پروتئینی تشکیل شده‌اند که باعث اتصال سلول‌های کراتینوسایت لایه اپیدرمی به غشاء پایه زیرین و لایه درم می‌گردد. اهمیت (HD) زمانی مشخص می‌شود که کمبود در این فاکتور اصلی به علت نقص ژنتیکی باعث ایجاد گروهی از بیماری‌های مادرزادی پوستی به همراه یکسری تاول‌ها اپیدرمولایزیس بولوسا (EB) می‌شود. اجزای تشکیل دهنده وابسته به فیلامنت‌های لنگری همی دسموزم‌ها (HD) شامل کراتین،^۵ $\text{Integrin}\alpha 6\beta 4$, Plectin کلاژن XVII، لامینین ۳۳۲ و کلاژن VII هستند که کمبود و نقصان در این ناحیه باعث ایجاد اپیدرمولایزیس بولوسا (EB) می‌شود. پوست این بیماران بسیار ضعیف، سست و نازک است که حتی با کوچکترین سایش و مالش دچار زخم و تاول می‌شوند. در اپیدرمولایزیس بولوسا (EB) مزمن، تاول‌ها فقط محدود به سطوح خارجی پوست نیست، بلکه ممکن است در سطوح داخلی بدن مثل: آستر داخلی دهان، معده، مری، روده‌ها، بخش فوقانی راه تنفسی، مثانه و اندام تناسلی نیز گسترش یابد.^۴

بیش از ۲۰ فنوتیپ بالینی مجزا از EB شرح داده شده اما سه زیرگروه اصلی وجود دارد: ساده (Simplex EB)، اتصالی (Junctional EB) و نوع دیستروفیک (Dystrophic EB). نوع ساده معمولاً در لایه خارجی پوست

(اپیدرم) رخ می‌دهد. در حالیکه، دو نوع دیگر در ناحیه غشاء پایه پدیدار می‌شوند (غشای پایه به محل اتصال اپیدرم به درم گفته می‌شود).^{۱-۴}

در EB Simplex، ژن‌هایی که به نوعی در تولید کراتین و پروتئین‌های رشته‌ای در اپیدرم دخالت دارند دچار اختلال و کمبود می‌شوند.^۶ در Junctional EB نقص در ژن‌ها به طور معمول از هر دو والد به ارث می‌رسد (اتوزومال مغلوب) که به صورت نرمال شکل‌گیری یک سری از فیلامنت‌های رشته‌ای شکل همی دسموزوم‌ها را به عهده دارد. این ساختارهای لنگری باعث اتصال اپیدرم به غشای پایه زیرین خود می‌شود.^۷ این نقصان و کمبود باعث جدا شدن بافت‌ها و ایجاد تاول‌ها در بخش بالایی غشاء پایه می‌شود. در Dystrophic EB فیلامنت‌هایی که اپیدرم را به درم قلاب می‌کند فاقد عملکرد لازم است. این نوع اپیدرمال بولوسا (EB) به علت نقصان در ژن کلاژن نوع VII ایجاد می‌شود.^۸ بیماران مبتلا به EB از بدو تولد دارای تاول، خوردگی، زخم و اسکار پوست هستند که می‌تواند به دست‌ها، پاها، دهان، چشم، حنجره و مری نیز گسترش یابد. عوارض ثانویه آنها نیز شامل اختلال رشد، سوء تغذیه، آلوپسی و کم خونی می‌باشند.^۱ هر نوع اصطکاک یا ترومای کوچک منجر به ایجاد تاول و زخم و در نهایت چسبندگی غیر طبیعی بین لایه مختلف پوست این بیماران می‌شود.^{۱۱}

این آسیب‌های مکرر پوست، تولید اسکار و ایجاد تاول منجر به بدشکلی پیش‌رونده دست می‌شود. سیکل آسیب، بهبودی و اسکار این بیماران وضعیتی شبیه به سینداکتیلی (چسبندگی بین انگشتان)، انقباض و کانترکچر عضلات نزدیک‌کننده شست و انگشتان (از بین رفتن فضای بین انگشتان)، کانترکچر مفاصل خم‌کننده انگشتان و مچ و فقدان ناخن دست ایجاد می‌کند. ظاهر مرحله نهایی این دست‌ها به عنوان "Cocoon hands" و "Mitten hands" نامیده می‌شوند. از آنجا که عملکرد دست برای اکثر فعالیت‌های روزمره زندگی ضروری است، تأثیر جدی این دفورمیتی‌ها روی افت عملکرد و انزوای اجتماعی و همچنین کاهش کیفیت زندگی بسیار مورد توجه است.^{۱۰-۱۲}

است که پیوند پوست در این بیماران انجام می‌گیرد و باعث ترمیم زخم می‌شود. در تئوری سلول‌های فیبروبلاست آلوگرافت امکان ترشح همه انواع کلاژن را دارند و احتمالاً با ترشح کلاژن نوع هفت در این بیماران باعث ترمیم سریع‌تر و پوست بهتری می‌شود.^{۱۵}

آیا می‌توان با استفاده از فیبروبلاست آلوگرافت نتایج ترمیمی بهتری بدست آورد و نیاز به پیوند پوست را هم کاهش داد. در این مطالعه ما از سلول‌های فیبروبلاست والدین به همراه اسکافولد آمینون برای پوشش زخم‌های دست هشت کودک مبتلا به این بیماری استفاده کرده‌ایم.

مواد و روش‌ها

روش درمانی برای والدین و بیمار توضیح داده شد و از همه بیماران یا والدین آنها رضایت آگاهانه گرفته شد. شش بیمار دارای چسبندگی دست که اندیکاسیون عمل جراحی داشتند وارد مطالعه شدند. در پنج نفر از بیماران هر دو دست مورد عمل جراحی همزمان قرار گرفت. مجموعاً یازده دست با این روش عمل جراحی شد. بیماران با متوسط سن ۹/۶ و انحراف معیار ۳/۴ بودند، سه نفر از آنها دختر و سه نفر از آنها پسر بودند.

آماده‌سازی فیبروبلاست آلوگرافت

جهت تهیه فیبروبلاست، ابتدا نمونه نیم در نیم سانتی‌متر از پوست پشت گوش والدین برداشته شد و در محیط مخصوص قرار داده شد و در کولد باکس به مؤسسه رویان منتقل شد. از این نمونه‌ها فیبروبلاست جدا شده و کشت داده شد. بعد از سه تا چهار پاساژ و به دست آمدن تعداد کافی فیبروبلاست، هرکدام از فیبروبلاست‌های پدر یا مادر که در بررسی میکروسکوپی بهتر به نظر آمده و رشد بهتری را داشتند برای انتقال روی اسکافولد آمینون انتخاب شدند. پس از انتقال با رعایت زنجیره سرد و دمای ۴ درجه سانتیگراد نمونه‌ها به اتاق عمل منتقل شدند (تصویر ۱ مراحل را به ترتیب نشان می‌دهد).

هدف از درمان شامل پیشگیری از آسیب پوست، اصلاح فعالیت‌ها، حفظ تغذیه مناسب و بازسازی عملکرد دست می‌باشد. اهداف جراحی شامل آزادسازی فضای وب اول و کانترکچر انگشتان و کمک به بازگشت فعالیت گرفتن اشیاء (Pinch and Grasp) می‌باشد.^{۱۶،۱۷}

درمان این بیماران در حال حاضر با گرافت‌های مختلفی از قبیل آلوژنیک، اتوگرافت، اپلی گرافت، بیوبران و ... انجام می‌شود. محققین و پزشکان در نوع استفاده از گرافت از جهت مشکلات زخم ناحیه دهنده پوست، جدا شدن اپیدرم در پوست تهیه شده برای گرافت و میزان ثبات آن اختلاف نظر دارند. اما به هر حال روش‌هایی که بتواند بدون نیاز به پیوند پوست باعث اپیتلیزاسیون مجدد زخم این بیماران شود، مفید خواهد بود.^{۱۲}

ما در این مطالعه سعی کرده‌ایم با توجه به خواص بسیار خوب غشاء آمینون و فیبروبلاست آلوگرافت، جهت درمان و پوشش زخم‌های دست این بیماران استفاده نماییم.

فیبروبلاست، فراوانترین سلول در بافت همبند است که همه انواع رشته‌های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه‌ای را سنتز می‌کند. فیبروبلاست‌ها کلاژن‌ها، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، فیبرهای مشبک و ارتجاعی و گلیکوپروتئین‌های موجود در ماتریکس برون سلولی و سیتوکین را می‌سازند.^{۱۳} فیبروبلاست‌های در حال رشد، تقسیم شده و ماده زمینه‌ای را می‌سازند. پیشرفت‌های اخیر در علوم سلولی و همچنین ایجاد امکانات لازم برای کشت سلول در شرایط استریل با کمترین نیاز به استفاده از مواد با منشأ حیوانی، موجب گردیده است که تکثیر و پیوند سلول‌های فیبروبلاست، به عنوان اصلی‌ترین سلول در ترمیم پوستی، مورد توجه پزشکان و بیماران قرار گیرد.^{۱۴}

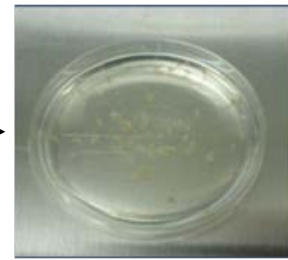
در بیماران اپیدرمولایزیس بولوسا سلول‌های فیبروبلاست کلاژن نوع هفت را ترشح نمی‌کنند.^{۱۳-۱۵} بعد از باز کردن چسبندگی دست این بیماران اغلب زخم‌های وسیعی در کف و پشت دست ایجاد می‌شود که نیاز به پوشش دارند. پیوند پوست اتوگرافت در این بیماران مشکل و سعی در اجتناب از آن می‌شود هر چند که مطالعات نشان داده



انتخاب بیمار (Mitten Hand)



بیوپسی



جداسازی سلول



کشت فیبروبلاست روی آمنیون



در زمان جراحی



سه ماه بعد

همه بیماران سه دوز آنتی‌بیوتیک وریدی و به مدت سه هفته آنتی‌بیوتیک خوراکی بر اساس وزن بدن دریافت کردند. پانسمان بیماران هر هفته یک بار و در اتاق عمل و با بیهوشی با ماسک انجام شد. در طی تعویض پانسمان سعی شد آمنیون در صورتی که به زخم چسبیده است دستکاری نشود. بررسی زخم از نظر عفونت و بررسی از نظر ترمیم زخم و فتوگرافی از دست‌ها انجام گرفت. سپس شستشوی فراوان با سرم فیزیولوژیک و پانسمان مجدد گذاشته شد. پس از یک ماه وایرها خارج و کاردرمانی - فیزیوتراپی به همراه اسپلینت برای بیماران شروع شد.

یافته‌ها

در این مطالعه شش بیمار دارای چسبندگی دست که اندیکاسیون عمل جراحی داشتند، انتخاب شدند. در پنج نفر از بیماران هر دو دست مورد عمل جراحی همزمان قرار گرفت. مجموعاً یازده دست با این روش عمل جراحی شد. بیماران با متوسط سن ۹/۶ و انحراف معیار ۳/۴ و سه نفر از آنها دختر و سه نفر از آنها پسر بودند (جدول ۱).

تمام بیماران به صورت بیهوشی عمومی با ماسک تحت عمل جراحی قرار گرفتند. در هیچ کدام از بیماران برای جلوگیری از تنگی تراشه و مری از لوله تراشه استفاده نشد. در هنگام استفاده از ماسک با پدهای مناسب از زخم شدن صورت پیشگیری شد. همه بیماران توسط یک جراح پلاستیک عمل جراحی شدند. در تمام بیماران از تورنیکه استفاده شد ولی چند لایه ویبریل زیر تورنیکه و دور بازو برای جلوگیری از زخم قرار داده شد. تمام چسبندگی‌های وب اول تا چهارم، چسبندگی‌های فلکسیون در انگشتان، کف دست و اینتر تنار به طور کامل آزاد شدند. سعی شد تا حد امکان انگشتان از پوسته ایجاد شده که باعث چسبندگی بود خارج شود با این همه در بعضی مناطق نیاز به برش‌های عرضی کامل پوست برای آزاد کردن چسبندگی شدیم. سپس با وایر کریشر متناسب با اندازه انگشت، دست و انگشتان در وضعیت اکستنسیون کامل مفاصل متاکارپوفالانژیال و اینترفالانژیال ثابت شدند. سپس شستشو و کنترل خونریزی انجام و آنگاه تمام زخم‌ها با آمنیون دارای سلول‌های فیبروبلاست به گونه‌ای پوشانده شد که سلول‌ها روی زخم قرار می‌گرفتند.

جدول ۱- اطلاعات دموگرافیک بیماران

کد بیمار	سن	جنس	سابقه بیماری در خانواده	ازدواج فامیلی	سابقه جراحی دست	تاریخ پذیرش	اهداف کننده سلول	محل دریافت
۱	۱۰	دختر	منفی	مثبت	مثبت	۹۱/۰۷/۰۹	پدر، خواهر	دست چپ
۲	۸	پسر	منفی	منفی	منفی	۹۱/۰۵/۰۳	پدر	هر دو دست
۳	۱۴	دختر	مثبت	منفی	منفی	۹۱/۰۵/۰۳	مادر	هر دو دست
۴	۱۰	پسر	منفی	منفی	منفی	۹۱/۰۷/۰۴	پدر	هر دو دست
۵	۱۲	پسر	منفی	منفی	منفی	۹۱/۰۷/۲۴	پدر	هر دو دست
۶	۴	دختر	منفی	مثبت	منفی	۹۱/۰۷/۲۴	پدر	هر دو دست

کامل زخم‌های خود را داشتند. در معاینه پوست کف دست این بیماران تفاوتی با پوست اطراف وجود نداشت. همه وب‌ها به خوبی باز شدند و چسبندگی و دفورمیتی انگشتان و کف دست برطرف شد. پوست ایجاد شده به خوبی فشار ناشی از کاردرمانی، فیزیوتراپی و اسپلینت را تحمل کرد و در طی سه ماه پیگیری بیماران زخم یا چسبندگی ایجاد نشد. شکل دست به میزان تقریباً طبیعی نزدیک شد و حرکات بیمار بهبود یافت (تصویر ۲).

در همه بیماران ترمیم زخم‌ها به خوبی انجام شد. کمترین مدت ترمیم کامل زخم‌ها ۱۵ روز و بیشترین مدت ترمیم ۲۹ روز بود. متوسط ترمیم کامل زخم در دست‌های بیماران به گونه‌ای که تمام زخم اپیتلیزاسیون کامل داشته و بتوان فیزیوتراپی و کاردرمانی را شروع کرد $23/1 \pm 3/77$ روز بود. سرعت ترمیم زخم در پنج دست از یازده دست به گونه‌ای بود که قبل از سه هفته همه نواحی بدون پوست دارای اپی‌تلیوم بودند. همه بیماران قبل از یک ماه ترمیم



(الف)

(ب)

(ج)

تصویر ۲- دست بیمار قبل از جراحی (الف)، بعد از جراحی و در طی سه هفته اول (ب) و سه ماه بعد از جراحی (ج) را نشان می‌دهد

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آمینون به همراه سلول‌های فیبروبلاست از نوع آلوگرافت می‌تواند به عنوان جایگزین پیوند پوست اتوگرافت در بیماران اپیدرمولایزیس بولوسا مطرح باشد.

امروزه درمان اختلالات ژنتیکی به شدت مورد توجه جوامع علمی بین‌المللی قرار گرفته‌اند. به ویژه بیماری‌های ژنتیکی پوستی به عنوان ارگان هدف به دلیل دسترسی راحت برای اندازه‌گیری‌های درمانی و آنالیز اثراشان روی سطح مولکولی، میکروسکوپی و ماکروسکوپی در مرکز توجه می‌باشند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تغییرات نسبتاً کوچک بیولوژیکی می‌تواند اثرات بالینی قابل توجهی داشته باشد. بنابراین تعداد کثیری از بیماران مبتلا به اختلالات ژنتیکی پوست انتظار درمان کامل را ندارند، اما هر روش درمانی که علائم را کاهش دهد و باعث بهبود عملکرد و افزایش کیفیت زندگی فرد شود، مورد توجه خواهد بود.^{۱۵و۱۴}

بیماری اپیدرمولایزیس بولوسا نیز یکی از این بیماری‌هاست که به علت تغییر شکل و دفورمیتی شدید اندام به ویژه چسبندگی دست‌ها بیمار را از لحاظ عملکرد و فعالیت‌های روزمره زندگی دچار مشکل می‌نماید.^{۱۶و۲}

روش‌های متعددی برای جراحی دست بیماران در مطالعات مختلف به کار رفته از جمله اتوگرافت نیمه ضخامت، آلوگرافت انسانی، پوست حیوان و سلول‌های اپیتلیال کشت داده شده انسان، پیوند مغز استخوان و سلول درمانی.^{۱۷و۱}

کلاژن نوع ۷ یک جزء اصلی از فیبرهای مهم و مهمی چسبندگی مولکولی در محل اتصال درم به اپیدرم می‌باشد که میزان این کلاژن با جهش ژنی در بیماران EB کاهش می‌یابد. مطالعات آزمایشگاهی و پایلوت ثابت کرده‌اند که فیبروبلاست‌ها مسئول ساخت و سنتز کلاژن در بدن است و افزایش میزان کم در کلاژن نیز به طور قابل توجهی پوست را در برابر نیروهای برشی (Shearing) مقاوم می‌کند.^{۱۴} از این رو ما در مطالعه خود از فیبروبلاست جهت افزایش میزان کلاژن استفاده نمودیم و نتایج رضایت‌بخشی نیز به دست آوردیم.

Wong و همکارانش در مطالعه خود دریافتند که بعد از ۳ تا ۴ هفته از سنتز پروتئین توسط سلول‌های فیبروبلاست سطح کلاژن به طور قابل توجهی افزایش یافته و در سه ماه افزایش یکپارچگی قابل ملاحظه‌ای در پوست مشاهده شد. به غیر از التهاب خفیف هیچ اثر جانبی دیگری مشاهده نشد.

همچنین مطالعات مشابه دیگر نشان دادند که تزریق داخل جلدی فیبروبلاست باعث افزایش مقاومت پوست در برابر نیروهای خارجی و کاهش تاول پوست و زخم در مناطق در معرض تروما می‌گردد که در مطالعه حاضر نیز این نتایج به دست آمد.^{۱۳}

در مطالعه‌ای دیگر نیز که توسط Woodley انجام شده بود بیان کرده‌اند که استفاده از فیبروبلاست امن بوده، غیرالتهابی است و گرایش به ایجاد تاول را کم می‌کند و همانند مطالعه ما میزان ترمیم را در موارد خفیف تا متوسط بهبود می‌بخشد.^{۱۴}

از آنجا که در بیماران EB پوست تمام بدن درگیر است، به همین دلیل یافتن ناحیه‌ای برای برداشتن پوست از خود بیمار که سالم باشد، بسیار کار سختی است.^{۱۹و۱۸} برای غلبه بر این مشکل چندین روش وجود دارد. یکی از این روش‌ها استفاده از آلوگرافت^{۲۰} می‌باشد که ما در این مطالعه از پوست پشت گوش والدین بیمار استفاده نمودیم.

در مطالعه Buonocore نتایج نشان داد که آلوگرافت جسد این اجازه را می‌دهد که عمل جراحی به صورت سرپایی انجام شود و دیگر لازم به بی‌حسی منطقه شکم یا کشاله ران به منظور برداشتن پوست از آن نواحی نیست و بیماران تا ۱۰ هفته بعد از عمل به طور کامل بهبود یافتند.^{۲۱}

به علاوه در مطالعاتی دیگر نیز نشان داده شد که استفاده از این روش منجر به اپیتلیزاسیون سریع دوباره زخم می‌شود، همانطور که در مطالعه ما نیز این مورد مشاهده شد.^{۲۲-۲۴}

همچنین در تحقیقاتی که توسط Eisenberg و Crikelair انجام شد این نتایج حاصل شد که اگرچه آلودرم به طور موقت اپیتلیزاسیون را زیاد می‌کند، اما افزایش زمان بهبودی محققین را در استفاده از آن دلسرد نموده است و آلوگرافت به تنهایی یک لایه خارجی بیولوژیکی ایجاد می‌کند که از خشک شدن لایه‌های زیرین جلوگیری می‌نماید.^{۲۵و۲۶}

همچنین در مطالعات مشابه دیگر نشان داده شد که اکثر زخم‌ها با آلوگرافت تا ۲ الی ۴ ماه بهبودی کامل می‌یابند که این مدت در مطالعه ما خیلی کمتر بوده است. در استفاده از فیبروبلاست آلوگرافت میزان شکنندگی مجدد پوست نیز کمتر بوده است. ما در بیمار شماره یک فقط دست چپ را با آمینون و فیبروبلاست آلوگرافت پوشانیدیم و در دست راست از پیوند پوست اتولوگ استفاده کردیم. در طی فیزیوتراپی و

کاردرمانی بیمار ابراز می‌کند که دست چپ که فیبروبلاست آلوگرافت استفاده شده است تحمل بهتری داشته و کمتر تاول می‌زند هرچند که قابل استناد و نتیجه‌گیری علمی نمی‌باشد و نیاز به مطالعات دقیق‌تری دارد. بقیه بیماران که هر دو دست آنها به این روش عمل شده بود به راحتی فیزیوتراپی و کاردرمانی را انجام دادند.

علاوه بر تمام مواردی که در بالا ذکر شد این روش جراحی، عوارض محل دهنده پوست را کم می‌کند و اجازه ترخیص زودتر به بیمار می‌دهد. همچنین تسهیل اپیتلیزاسیون و بهبود زخم با دوام از مزایای دیگر این روش می‌باشند.

بنابراین در کنار روش‌های گوناگون جراحی برای چسبندگی دست بیماران EB مثل اپلی گرافت، اتوگرافت، کراتینوسیت و ... که همگی نتایج مثبت و خوبی در درمان داشته‌اند به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های فیبروبلاست آلوگرافت از نظر میزان ترمیم و مدت زمان بهبودی و حتی عملکرد دست ارجحیت داشته باشد. در سایر روش‌ها چون از فیبروبلاست آلوگرافت استفاده نمی‌شود، تصور این است که امکان ترشح کلاژن نوع ۷ وجود ندارد.

با این حال پیشنهاد می‌گردد مطالعات مشابه دیگری در این زمینه با افزایش تعداد بیماران انجام شود تا نتایج آن در آینده قابل تعمیم باشد.

Abstract:

Evaluation of Culture and Human Fibroblast Cells Transplant (Allograft) on Amniotic Membrane for Treatment of Epidermolysis Bullosa

Fatemi M. J. MD ^{*}, *Orouji Z. MD* ^{**}, *Shafieyan S. MD* ^{***}, *Taghi Abadi E. Msc* ^{****}

Niazi M. Msc ^{*****}

(Received: 11 Oct 2015 Accepted: 5 Feb 2016)

Introduction & Objective: Epidermolysis bullosa (EB) is a genetic disease with skin fragility and instability at the junction of dermis to epidermis. Severe deformity of hands because of scars and adhesions leads to lose the proper function of hand which affects the quality of patients' life. Covering the wound after opening adhesion is the major problem in the way of reconstructive surgeons. Our purpose in this study is to use allogeneic fibroblasts amnion after surgery as a cover in patients to prevent further adhesion.

Materials & Methods: This study was an experimental study that was done on six Epidermolysis bullosa Patients with hand deformity and Adhesion. We took a skin sample from back of one of parents' ear. Then fibroblast was separated, cultured and transferred to the amniotic membrane. After separating the full adhesion, all parts without skin were covered with the allogeneic fibroblast amnion. Furthermore, speed, quality, recovery time of wound were examined as well as range of motion in finger joints and the pressure on skin.

Results: The results of the study showed that wound healing well done and for wound healing varies between 15 to 29 days and the average length of treatment was 1.23 days with a standard deviation 77.3. Skin repair and rehabilitation activities as well as the pressure of splint has endured.

Conclusions: Allogeneic fibroblast with a scaffold like amnion can reduce the need for skin graft in patients with Epidermolysis Bullosa. Normal allogeneic fibroblast and disability of releasing collagen seven in these patients can be effective factors in wound healing and be better than autogenic fibroblasts.

Key Words: Epidermolysis Bullosa, Fibroblast, Opening Adhesion, Allograft

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

^{**} *General Physician, Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

^{***} *Dermatologist, Department of Regenerative Biomedicine at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

^{****} *Master of Science in Biology, Department of Regenerative Biomedicine at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

^{*****} *Master of Science in Occupational Therapy, Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

References:

1. Bernardis C, Box R. Surgery of the hand in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatologic clinics*. 2010 Apr 30; 28(2): 335-41.
2. Campiglio GL, Pajardi G, Rafanelli G. A new protocol for the treatment of hand deformities in recessive dystrophic epidermolysis bullosa (13 cases). In *Annales de Chirurgie de la Main et du Membre superieur* 1997 Dec 31; 16 (2): 91-100.
3. Tian F, Li B, Tian LJ. Treatment of severe hand deformities caused by epidermolysis bullosa. *Orthopedics*. 2011 Nov 1; 34(11): e780-3.
4. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008 Jun 30; 58(6): 931-50.
5. Marinkovich M, Peter, and E. A. Bauer. "Epidermolysis bullosa." *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill 2008: 505-516.
6. Gu LH, Coulombe PA. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Current opinion in cell biology*. 2007 Feb 28; 19(1): 13-23.
7. Coulombe PA, Fuchs E. Epidermolysis bullosa simplex. In *Seminars in dermatology* 1993 Sep; 12(3): 173-190.
8. Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Human mutation*. 2008 Mar 1; 29(3): 351-60.
9. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*. 1980 Apr 30; 19(4): 1033-42.
10. Eismann EA, Lucky AW, Cornwall R. Hand function and quality of life in children with epidermolysis bullosa. *Pediatric dermatology*. 2014 Mar 1; 31(2): 176-82.
11. Comer GC, Ladd AL. Management of Complications of Congenital Hand Disorders. *Hand clinics*. 2015 May 31; 31(2): 361-75.
12. Eisenberg M, Llewelyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *British journal of plastic surgery*. 1998 Dec 31; 51(8): 608-13.
13. Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJ, Pacy J, Elia G, Jeffery R, Leigh IM, Navsaria H, McGrath JA. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008 Sep 1; 128(9): 2179-89.
14. Woodley DT, Krueger GG, Jorgensen CM, Fairley JA, Atha T, Huang Y, Chan L, Keene DR, Chen M. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *Journal of investigative dermatology*. 2003 Nov 1; 121(5): 1021-8.
15. Ortiz-Urda S, Lin Q, Green CL, Keene DR, Marinkovich MP, Khavari PA. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Jan 15; 111(2): 251-5.
16. Luria S, Radwan S, Zinger G, Eylon S. Hand Surgery for Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2014 Oct 1; 34(7): 710-4.
17. Pai, Shan, and M. Peter Marinkovich. "Epidermolysis bullosa." *American journal of clinical dermatology*. 2002; 3(6): 371-380.
18. Sankale AA, Coulibaly NF, Ndiaye L, Tiemdjo H. Inherited epidermolysis bullosa: Case report of finger localization. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2012 Sep; 45(3): 568.
19. Pajardi G, Pivato G, Rafanelli G. Rehabilitation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Techniques in hand & upper extremity surgery*. 2001 Sep 1; 5(3): 173-7.
20. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH. Tissue-engineered skin. *American journal of clinical dermatology*. 2001 Oct 1; 2(5): 305-13.
21. Buonocore SD, Ariyan S. Cadaveric allograft for wound closure after resection of squamous cell carcinoma in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a report of 32 resections and repairs in 2 patients. *Annals of plastic surgery*. 2009 Sep 1; 63(3): 297-9.
22. Witt PD, Cheng CJ, Mallory SB, Lind AC. Surgical treatment of pseudosyndactyly of the hand in epidermolysis bullosa: histological analysis of an acellular allograft dermal matrix. *Annals of plastic surgery*. 1999 Oct 1; 43(4): 379-85.
23. Witt PD, Cohen DT, Mallory SB. Use of a permanent acellular dermal allograft in recessive dystrophic epidermolysis bullosa involving the hands. *Archives of dermatology*. 1999 May 1; 135(5): 503-6.
24. Dagregorio G, Guillet G. Artificial skin as a valuable adjunct to surgical treatment of a large squamous cell carcinoma in a patient with epidermolysis bullosa. *Dermatologic surgery*. 2005 Apr 1; 31(4): 474-6.
25. Eisenberg M, Llewelyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic

epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *British journal of plastic surgery*. 1998 Dec 31; 51(8): 608-13.

26. Crikelair GF, Hoehn RJ, Domonkos AN, et al. Skin homografts in epidermolysis bullosa dystrophica. *Plast Reconstr Surg*. 1970 Jul 1; 46(1): 89-92.