

## Human-bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned medium and low-level laser therapy increase trophic factor expression in diabetic fibroblasts

Abbas Piryaei<sup>1\*</sup>, Farzane Hendudari<sup>1</sup>, Mohammad Bayat<sup>1</sup>, Seyedeh Nafiseh Hassani<sup>2</sup>

1. Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

(Received: 4 Nov 2015

Accept: 22 Feb 2016)

### Abstract

**Background:** Chronic wounds of diabetic patients, which resulted from some impairments including disruption in production and secretion of effective factors in the process of healing is highly regarded. In recent years, many studies have been reported the positive impact of low level laser therapy (LLLT) and mesenchymal stem cells (MSCs) and their conditioned media (CM) in diabetic wound healing. In the present study we evaluated the combined effect of LLLT and human-bone marrow (h-BM) MSCs-CM on the expression of an inflammatory factor and a growth factor, both involved in wound healing, in cultured fibroblasts at high glucose condition.

**Materials and Methods:** In this experimental study human dermal fibroblasts (HDFs) were cultured at culture media with normal and high glucose (as diabetic model) concentrations. Then the diabetic fibroblasts were treated by a laser beam with 0.5J/cm<sup>2</sup> and h-BM MSCs-CM, separately and in combination with each other. Finally, the gene expression of bFGF and TGF- $\beta$ 2 were evaluated, using RT-PCR technique.

**Result:** The expression of bFGF, significantly and the expression of TGF- $\beta$ 2, non-significantly were increased in all three treated diabetic groups, compared to the untreated diabetic group. Despite the relative expression of bFGF in diabetic group was 0.47 $\pm$ 0.11. It significantly ( $p < 0.05$ ) rose to 1.23 $\pm$ 0.35 in laser treated group, 0.98 $\pm$ 0.028 in CM treated group and 1.37 $\pm$ 0.2 in Laser+CM treated group.

**Conclusion:** Apparently, by their synergistically effects, using the LLLT and the h-BM MSCs-CM together, positively affect the expression of trophic factor involved in diabetic wound healing.

**Key words:** Low level laser therapy, Mesenchymal stem cells, Conditioned medium, Wound healing, Diabetes

\* Corresponding Author: Abbas Piryaei\*  
Email: piryae\_a@yahoo.com

# محیط کشت بهینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان و تابش لیزر کم‌توان موجب افزایش بیان فاکتور رشد در فیبروبلاست‌های دیابتی می‌شوند

عباس پیریایی<sup>۱\*</sup>، فرزانه هندودری<sup>۱</sup>، محمد بیات<sup>۱</sup>، سیده نفیسه حسینی<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، تهران، ایران  
۲- گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۱۳

## چکیده

**مقدمه:** زخم‌های مزمن در افراد دیابتی به دلایل مختلف، از جمله اختلال در روند تولید و ترشح فاکتورهای مؤثر در فرآیند التیام زخم، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در سال‌های اخیر مطالعه‌های زیادی تأثیر مثبت تابش لیزر کم‌توان و استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و محیط کشت بهینه آن‌ها را در التیام زخم‌های دیابتی گزارش کرده‌اند. در مطالعه حاضر ما تأثیر ترکیبی لیزر کم‌توان و محیط کشت بهینه سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را بر بیان یک فاکتور التهابی و یک فاکتور رشد که هر دو در روند ترمیم زخم شرکت دارند، در فیبروبلاست‌های کشت شده در غلظت بالای گلوکز را بررسی کردیم.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان در محیط کشت حاوی غلظت طبیعی و غلظت بالای گلوکز (مدل دیابتی) کشت داده شدند. سپس از تابش لیزر با انرژی ۰/۵ ژول بر سانتی‌متر مربع و محیط کشت بهینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به صورت جداگانه و توأم با یکدیگر برای تیمار فیبروبلاست‌های دیابتی استفاده شد. سرانجام میزان بیان ژن فاکتورهای *bFGF* و *TGF-β2* با استفاده از تکنیک RT-PCR بررسی شد. **یافته‌ها:** بیان ژن *bFGF* به‌طور معنادار و بیان ژن *TGF-β2* به‌طور غیر معنادار در هر سه گروه دیابتی تیمار شده، نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده افزایش یافته بود. به نحوی که میزان بیان نسبی ژن *bFGF* از ۱۱/۱۱ ± ۰/۷۴ در گروه دیابتی به ۳۵/۳۲ ± ۱/۳۲ در گروه تیمار شده با لیزر، ۲۸/۱۸۹ ± ۰/۱۸۹ در گروه تیمار شده با محیط کشت بهینه و ۱۲/۱۷۳ ± ۰/۱۷۳ در گروه تیمار همزمان با لیزر و محیط کشت بهینه افزایش یافت و همه این تغییرها در سطح  $P < 0.05$  معنادار بود. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که استفاده هم‌زمان از تابش لیزر کم‌توان و محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان، با اثر هم‌افزایی که بر یکدیگر دارند، موجب می‌شود بیان فاکتور رشد مؤثر در ترمیم زخم پوستی دیابتی افزایش چشمگیری یابد.

**واژگان کلیدی:** لیزر کم‌توان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، محیط کشت بهینه، ترمیم زخم، دیابت

## مقدمه

کراتینوسیت‌ها) و همچنین برخی سلول‌های دیگر (نظیر سلول‌های اندوتلیال و عضله صاف) بیان می‌شوند. شاید مهم‌ترین نقش این فاکتورها تأثیر تحریکی آنها بر سلول‌های سترکننده کلاژن، برای تنظیم تولید و بازسازی اجزای ماتریکس خارج سلولی باشد. همچنین این فاکتورها می‌توانند بر روند مهاجرتی سلول‌های فیبروبلاست به لبه‌های زخم مؤثر باشند. در میان این خانواده ۲۳ عضوی، *bFGF* دارای عملکرد قابل توجهی در تمام مراحل ترمیم زخم به‌ویژه شکل‌گیری بافت گرانوله و تجدید قالب دوباره بافت است (۸). خانواده *TGF-β* نیز شامل مجموعه‌ای از فاکتورهای التهابی است که سه عضو اصلی آن  $1\beta$ ،  $2\beta$  و  $3\beta$  دارای عملکرد متقابل و مؤثر در روند بهبود زخم به‌ویژه زخم‌های مزمن دیابتی هستند. در این بین *TGF-β2* در التهاب، رگ‌زایی، اپیتلیوم زایی مجدد و ترمیم بافت همبند دارای اهمیت است. این فاکتور به کارگیری سلول‌های التهابی را تسهیل کرده و عملکرد ماکروفاژها را در پاکسازی بافت تقویت می‌کند، از دیگر آثار این فاکتور در مراحل چندگانه ترمیم زخم

بروز تأخیر در التیام زخم‌های دیابتی، یکی از عوارض شایع بیماری مبتلا به دیابت شیرین است که به دنبال بالا بودن میزان قند خون ایجاد می‌شود (۱ و ۲). متأسفانه این عارضه موجب مزمن شدن زخم شده و حتی ممکن است به قطع عضو نیز منجر شود (۳). به‌طور حتم قطع عضو بیماران دیابتی بار روانی و اقتصادی بسیاری بر فرد و جامعه تحمیل کرده و کیفیت زندگی چنین بیمارانی را کاهش می‌دهد (۴ و ۵). التیام زخم فرآیند پیچیده‌ای شامل برهمکنش‌های شیمیایی و بیولوژیکی مختلف میان سلول‌ها، فاکتورهای رشد و التهابی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی است (۶-۷). از جمله فاکتورهای تأثیرگذار شرکت‌کننده در فرآیند ترمیم زخم می‌توان به خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs) و خانواده فاکتورهای تغییر شکل‌دهنده بتا *TGF-βs* اشاره کرد.

خانواده FGF از مؤثرترین سیتوکین‌های شرکت‌کننده در مراحل ترمیم زخم هستند که به‌طور عمده توسط سلول‌های پوستی (فیبروبلاست‌ها و

نویسنده مسئول: سیمین فاضلی پور

پست الکترونیکی: [simin\\_fazelipour@yahoo.com](mailto:simin_fazelipour@yahoo.com)

نشانی: تهران، خیابان شریعتی - زرکند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، گروه علوم تشریحی، تلفن ۰۲۱-۲۲۶۰۰۶۶۵، شماره ۲۲۶-۰۲۱-۲۲۶۰۰۷۱۴

شو شدند. پس از آن سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بلاک‌کننده سرم آلبومین گاو ۲ درصد Sigma, USA، انکوبه شده و سرانجام با آنتیبادیهای کوئزوگه شده با FITC و PE به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. برای بررسی مارکرهای سطح سلولی، آنتی‌بادی‌های زیر استفاده شد: anti-CD105-PE (R&D Systems, FAB10971p)، anti-CD90-PE (Abcam, ab95698)، anti-CD73-PE (BD Biosciences, BD550257)، anti-CD45-PE (ab157309) و anti-CD34-FITC (Abcam, ab18227). برای نمونه کنترل منفی نیز از ایزوتایپ Abcam, IgG1, kappa, ab18443 استفاده شد. سرانجام برای بررسی درصد سلول‌های مثبت و منفی، برای هر آنتی‌بادی تعداد ۱۰۴ سلول با دستگاه فلوئوسیتومتری Becton Dickinson flow cytometer ارزیابی و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار WinMDI آنالیز شد.

#### تهیه محیط کشت بهینه:

تهیه محیط کشت بهینه به صورت تک مرحله‌ای و پس از اطمینان از سازگاری سلول‌ها انجام شد. پس از آنکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ پنجم حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسکها را پر کردند، دو باره با محلول PBS شسته شدند و به هر فلاسک محیط کشت DMEM فاقد سرم افزوده شد و انکوبه شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون محیط کشت جمع‌آوری شده و به مدت پنج دقیقه با دور ۵۰۰ سانتریفیوژ Eppendorf, Germany شد، تا خرده‌های سلولی موجود در آن حذف شود (۱۹-۱۷). سرانجام محیط به دست آمده با دستگاه لایوفیلایزر Christ Alpha1-2 LD plus, Germany تا ۲۰ برابر تغلیظ و تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد (۱۷ و ۳۷).

#### کشت سلول‌های فیبروبلاست و ایجاد مدل دیابتی:

در این مرحله از سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان که در بانک سلولی مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان موجود بود، استفاده شد. برای استفاده از این سلول‌ها علاوه بر اخذ رضایتنامه کتبی از افراد اهداکننده، تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (کد: IR. SBMU. SM. REC. 1394. 31) نیز دریافت شد. این سلول‌ها نیز مشابه سلول‌های مزانشیمی، در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS کشت و تکثیر داده شدند. برای گروه کنترل طبیعی NG سلول‌ها در غلظت ۵ Mm/1 گلوکز و برای ایجاد مدل دیابتی سلول‌ها در غلظت ۱۱۵ Mm/1 گلوکز کشت داده شدند. لازم به ذکر است که برای تثبیت شرایط دیابتی در سلول‌ها، فیبروبلاست‌ها قبل از شروع تیمار به مدت یک هفته تحت تأثیر این غلظت بالای گلوکز قرار می‌گرفتند (۳۷).

#### انتخاب دوز مناسب لیزر:

در این مطالعه، برای تابش لیزر کم‌توان از دستگاه مولد لیزر هلیوم-نئون (ساخت سازمان انرژی اتمی ایران، مدل IR-۲۰۰۰) استفاده شد که پرتویی با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و قطر خروجی ۲ میلی‌متر و توان خروجی ۱۰ میلی‌وات ساطع می‌کرد. قطر لیزر خروجی نیز با استفاده از دستگاه Beam Expander ۱۵ سانتیمتری به ۱۷ میلی‌متر افزایش می‌یافت تا کل سطح یک چاهک پلیت ۲۴ چاهکی را در بر گیرد (در این حالت توان خروجی دستگاه برابر با ۱/۵ میلی‌وات بود). برای تعیین دوز مناسب لیزر، سه زمان پرتودهی، به ترتیب ۶۳۸، ۱۵۱۲ و ۳۰۲۴ ثانیه (که معادل با انرژی ۰/۵، ۱ و ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع بود) انتخاب شد (۲۴). سپس فیبروبلاست‌های گروه کنترل طبیعی (گروه NG) به تعداد ۵۰۰۰ سلول درون هر چاهک پلیت ۲۴ چاهکی (SPL, Korea) کشت داده شدند و سه بار به صورت یک روز در میان در معرض تابش لیزر قرار گرفتند. سرانجام سلول‌ها در روز چهارم با تست MTT (شرکت ایده زیست، ایران) ارزیابی شدند تا میزان تکثیر آن‌ها تحت این شرایط محاسبه شود. لازم به ذکر است که با توجه نتایج حاصل از این مرحله، دوز ۰/۵ ژول بر سانتی‌متر مربع به‌عنوان دوز مناسب برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

تیمار فیبروبلاست‌های دیابتی با لیزر و محیط کشت بهینه برای این هدف در کنار فیبروبلاست‌های گروه کنترل طبیعی NG، فیبروبلاست‌هایی که به مدت یک هفته در شرایط غلظت گلوکز ۱۱۵ mM کشت داده شده بودند به چهار گروه تقسیم شدند و هر گروه نیز شامل سه تکرار بود. گروه کنترل دیابتی HG هیچگونه تیماری را

میتوان به تأثیر تحریکی این فاکتور بر فیبروبلاست‌ها برای سنتز هرچه بیشتر کلاژن به‌عنوان یکی از اجزای ماتریکس خارج سلولی اشاره کرد (۹). باوجود پیشرفت‌های زیاد علوم پزشکی و مطالعه‌های فراوان که در زمینه التیام زخم‌های دیابتی و غیردیابتی انجام شده است هنوز درمان زخم‌های مزمن پوستی به‌ویژه در بیماران دیابتی از جمله مسائل مهمی است که به‌عنوان یکی از بحران‌های سلامت مطرح می‌شود (۱۰). از جمله دلایل مزمن شدن زخم در بیماران دیابتی می‌توان به تأخیر در روند ترمیم برخی فاکتورهای رشد و کاهش رگ‌زایی در محل زخم اشاره کرد (۱۱-۱۳). تأثیر دیابت و بالا بودن میزان قند خون به‌طور معمول با کشت انواع سلول‌های پوست از جمله فیبروبلاست‌ها در محیط کشت حاوی غلظت بالای گلوکز بررسی می‌شود (۱۴-۱۶). به تازگی گزارش‌های بسیاری مبنی بر تأثیر مثبت تابش لیزر کم‌توان بر سلول‌های پوستی نظیر فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها، به‌عنوان عمده‌ترین سلول‌های شرکت‌کننده در روند التیام زخم و سنتز کلاژن و همچنین ترمیم فاکتورهای رشد همچون bFGF و IL-6 ارائه شده است (۱۸-۲۰). در کنار لیزر کم‌توان، یکی دیگر از روش‌های درمانی که به تازگی مورد توجه محققان قرار گرفته است، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا ترشحات آنها در التیام زخم و سایر بیماری‌های صعب‌العلاج است (۲۱-۲۲). باوجود موفقیت‌هایی که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پی داشته، گزارش‌هایی در باره خاصیت ایمنی‌زایی این سلول‌ها و نیاز به سرکوب سیستم ایمنی فرد گیرنده ارائه شده است. این امر سبب شده که استفاده از ترشحات پاراکرین این سلول‌ها به جای خود سلول، به‌عنوان یک روش درمانی ایمن و کم‌خطر معرفی شود (۲۳). محیط کشت بهینه Conditioned Media, CM مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل انواع مختلفی از فاکتورهای رشد و سیتوکین‌هایی است که بر روند التیام زخم تأثیر دارند (۲۲). ترشحات این سلول‌ها موجب کاهش زمان بسته شدن زخم و افزایش میزان رگ‌زایی در موش‌های صحرایی دیابتی شده است (۳۱-۲۵). به‌طور کلی، طی مطالعه‌های انجام شده در هشت سال گذشته، مشخص شده که استفاده از این روش درمانی آثار مثبتی بر زخم‌های دیابتی و غیردیابتی در محیط Invitro و Invivo دارد (۱۷ و ۳۶-۳۳). اما تاکنون مطالعه‌ای در باره بررسی اثر ترکیبی تابش لیزر کم‌توان و ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در التیام زخم‌های مزمن انجام نشده است. برای همین، در مطالعه حاضر اثر ترکیبی این دو روش درمانی بر میزان بیان فاکتورهای bFGF و TGF-β2 در فیبروبلاست‌های کشت شده در غلظت بالای گلوکز (به‌عنوان مدل دیابت در Invitro) بررسی شد. امید آنکه نتایج حاصل از این تحقیق دریچه تازه‌ای را در زمینه درمان زخم‌های دیابتی بگشاید.

#### مواد و روش‌ها:

**نوع مطالعه:** در این مطالعه تجربی مراحل انجام آزمایش‌ها به شرح زیر طراحی شد.

#### کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، از مغز استخوان افراد اهداکننده‌ای که در بانک سلولی مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان موجود بود، تهیه شد. برای استفاده از این سلول‌ها علاوه بر اخذ رضایتنامه کتبی از افراد اهداکننده، تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (کد: IR. SBMU. SM. REC. 1394. 31) نیز دریافت شد. این سلول‌ها درون فلاسک‌های کشت ۷۵ سانتی‌متر مربع (SPL, Korea) حاوی محیط کشت DMEM (شرکت ایده زیست، ایران) به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاو (FBS, Gibco, UK) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلیلیتر پنی‌سیلین و یک درصد استرپتومایسین (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در غلظت ۵ درصد دیاکسید کربن کشت داده شده و در انکوباتور (Memert, Germany) نگهداری شدند. محیط کشت فلاسک‌ها هر سه روز تعویض شد و پس از آنکه ۸۰ تا ۹۰ درصد کف فلاسک‌ها با سلول پر می‌شد، سلول‌ها با تریپسین (Gibco, EDTA/UK) از کف ظرف جدا شده و به نسبت ۱ به ۳ پاساژ داده می‌شدند. این سلول‌ها تا پاساژ پنجم برای خالص‌سازی و تکثیر، کشت داده شدند (۲۱).

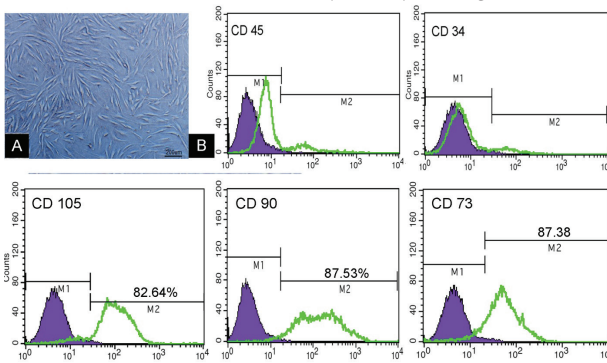
#### تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تکنیک فلوئوسیتومتری

سلول‌های مزانشیمی پاساژ چهارم پس از جداسازی از کف ظروف کشت به مدت ۱۰ دقیقه در فرمالدئید ۴ درصد Merck, Germany فیکس و سپس توسط فسفات بافرسالیین PBS, Gibco, UK حاوی ۵ درصد Tween Merck, Germany شست و

Oneway-ANOVA Kolmogorov-Smirnov بررسی و پس از تأیید آن با روش LSD سنجیده شد و داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده و ۵ درصد  $p <$  از نظر آماری معنادار محسوب شد.

#### یافته‌ها:

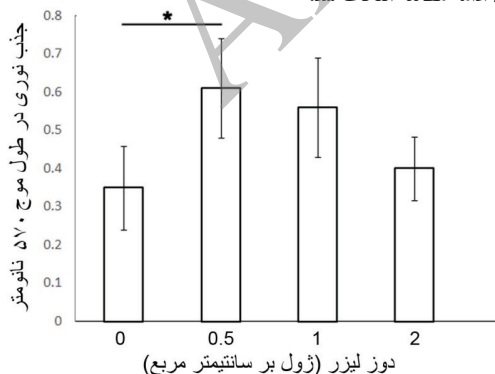
ویژگی‌های ظاهری و بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کشت سلول‌های تک هسته جدا شده از مغز استخوان، در پاساژهای ابتدایی ناخالصی‌هایی مشاهده می‌شد که سرانجام در پاساژ ۴ این ناخالصیها برطرف شدند و همه سلول‌ها ویژگی‌های معمول سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دادند. به گونه‌ای که سلولهای چسبنده به طور یکدست، دوکی شکل و کشیده و ظاهری شبیه فیبروبلاست داشتند (شکل ۱A). همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری نیز حاکی از آن بود که این سلولها شاخصهای سطحی مزانشیمی شامل CD90 (87.53%)، CD105 (82.64%) و CD73 (87.38%) را با درصد بالا بیان می‌کنند، درحالی‌که شاخصهای سلولهای خونساز (CD34, 45) را بیان نمی‌کنند (شکل ۱B).



شکل ۱: ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در پاساژ چهارم. (A) تصویر میکروسکوپی سلول‌های مزانشیمی که ظاهر یکدست، دوکی شکل و شبه فیبروبلاست آن‌ها را نشان می‌دهد. (B) نمودارهای فلوسایتومتری نشان می‌دهد که این سلول‌ها شاخص‌های سطحی مزانشیمی شامل CD73 و CD105، CD90 را با درصد بالا بیان می‌کنند، درحالی‌که شاخص‌های سلول‌های خونساز CD34، CD45 را بیان نمی‌کنند.

#### دوز تأثیرگذار لیزر بر فیبروبلاست

برای تعیین دوز مؤثر لیزر، فیبروبلاستها تحت تأثیر تابش لیزر با انرژی ۰/۵، ۱ و ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع قرار گرفتند. یافته‌های این مرحله حاکی از آن بود که تعداد فیبروبلاست‌هایی که دوز ۰/۵ ژول بر سانتی‌متر مربع را دریافت کرده بودند، نسبت به گروه کنترل (که تحت تابش لیزر قرار نگرفته بودند) افزایش معناداری (۵ درصد  $P <$ ) یافته است (شکل ۲). به این ترتیب دوز لیزر ۰/۵ ژول بر سانتی‌متر مربع به‌عنوان دوز مؤثر برای، ادامه مطالعه انتخاب شد.



شکل ۲: نمودار حاصل از آزمایش MTT برای تعیین دوز مناسب لیزر کم‌توان هلیوم-نئون. همان‌طور که مشاهده می‌شود دوز لیزر ۰/۵ ژول بر سانتی‌متر مربع به‌طور معناداری موجب افزایش تکثیر فیبروبلاستها شده است. به طوری که میزان جذب نوری این گروه  $0.13 \pm 0.06$  بود، درحالی‌که جذب نوری گروه تیمار نشده با لیزر  $0.11 \pm 0.03$  است. نتایج مربوط به سه بار تکرار است، داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده و علامت ستاره نشانه اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد  $p <$  است.

دریافت نمی‌کردند. گروه دیابتی تیمار شده با لیزر HG+L سه بار به صورت یک روز در میان پرتوی لیزر را به میزان ۰/۵ میلی ژول بر سانتی‌متر در یافت می‌کردند. گروه دیابتی تیمار شده با محیط کشت بهینه HG+CM، سه بار به صورت یک روز در میان، میزان ۱۰ درصد محیط کشت بهینه ۲۰ برابر تغلیظ شده را (به صورت حجمی/حجمی) دریافت می‌کردند. گروه دیابتی تیمار شده با لیزر و محیط کشت بهینه HG+L+CM، سه بار به صورت یک روز در میان، پرتوی لیزر را به میزان ۰/۵ میلی ژول بر سانتی‌متر و همچنین میزان ۱۰ درصد محیط کشت بهینه را دریافت می‌کردند. سپس همه گروه‌ها در روز ششم نمونه‌برداری شدند.

#### بررسی بیان ژن‌های bFGF و TGF- $\beta$ ۲ با آزمایش RT-PCR

برای آماده‌سازی سلول‌ها جهت استخراج RNA، محیط کشت سلولها به وسیله پیپت سرولوژی تخلیه شده و سلولها دوبار با PBS شست و شو داده شدند. سپس سلولها با محلول تریسین/EDTA از کف ظروف کشت جدا شده و در لوله فالکون (SPL, Korea) به مدت پنج دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن، طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) سلولها در بافر RNX-PLUS (سیناژن، ایران) لیز شده و استخراج RNA از نمونهها در شرایط عاری از RNase و DNase انجام شد. سپس RNAهای استخراج شده، با آنزیم DNase ThermoScientific, USA تیمار شد و با استفاده از کیت سنتز cDNA ThermoScientific, USA مقدار دو میکروگرم از آن به cDNA تبدیل شد.

واکنش PCR در محلولی به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت که شامل ۱۰ میکرولیتر Mastermix (Ampliqon, Denmark)، یک میکرولیتر پرایمر پیشرو و یک میکرولیتر پرایمر پیرو (پیشگام، ایران)، یک میکرولیتر cDNA و ۷ میکرولیتر آب مقطر بود. شرایط حرارتی دستگاه ترموسایکلر Eppendorf, Germany برای انجام واکنش PCR به این شرح بود. داتوره شدن اولیه در دمای ۹۵ $^{\circ}$ C به مدت سه دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل مرحله داتوره شدن در دمای ۹۴ $^{\circ}$ C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۷ $^{\circ}$ C برای ژن GAPDH (به‌عنوان کنترل داخلی)، دمای ۵۷ $^{\circ}$ C برای ژن bFGF و در دمای ۶۲ $^{\circ}$ C برای ژن TGF- $\beta$ ۲ به مدت ۲۵ ثانیه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ $^{\circ}$ C به مدت ۲۵ ثانیه و در آخر، مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ $^{\circ}$ C به مدت پنج دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول آورده شده است.

پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل‌آگاروز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و جدول ۱، مشخصات پرایمرهای استفاده شده در آزمایش‌های مولکولی.

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول PCR (جفت باز)
FGF2	F: 5'TGGCTTCTAAATGTGTTACGG 3' R: 5'CGAATAAAGCAAATGCGTG 3'	476
TGF- $\beta$ 2	F: 5'GATTGTCAGGTATTGATGGC 3' R: 5'TCATCGTTGTCGTCGTCATC 3'	560
GAPDH	F: 5'TTGGTATCGTGAAGGACTC 3' R: 5'TGGGTGTCGCTGTTGAAG 3'	450

F: پرایمر پیشرو

با ولتاژ ۸۵ ولت بارگذاری شد (الکتروفورز پدیده نوزن، ایران). ژل‌ها با رنگ DNA Green Viewer (آریاتوس، ایران) رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه ژل داگ (آران تجهیز، ایران) عکسبرداری شدند (شکل ۳A). سرانجام دانسیته باندهای حاصله با نرم‌افزار Image J (NIH) اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه دانسیته باند ژن هدف به دانسیته باند GAPDH همان نمونه نرمال شده و دانسیته‌های نهایی به‌دست آمده گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شد.

#### روش تحلیل داده‌ها:

همه آزمایش‌های این مطالعه به صورت سه بار تکرار انجام و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد. به این صورت که ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با آزمون One-sample

۵ درصد  $P <$  معنادار بود. در این بین بیشترین میزان بیان این ژن در گروه تیمار همزمان با لیزر و محیط کشت بهینه مشاهده شد. به نحوی که بیان bFGF در این گروه حتی نسبت به گروه کنترل طبیعی و همچنین نسبت به گروه تیمار شده با محیط کشت بهینه نیز افزایش معناداری یافته بود (شکل B۳).

برخلاف تفاوت‌های ذکر شده در میزان بیان bFGF، نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن TGF- $\beta$ 2 در گروه‌های تحت بررسی حاکی از نبود اختلاف معنادار بین گروه‌ها بود. با این وجود کمترین میزان بیان این ژن در گروه کنترل دیابتی ( $0.59 \pm 0.33$ ) و بیشترین میزان آن در گروه تیمار همزمان با لیزر و محیط کشت بهینه ( $0.92 \pm 0.39$ ) ثبت شد که از این لحاظ، روند تغییر های ژن TGF- $\beta$ 2 نیز با ژن bFGF همخوانی داشت.

### بحث:

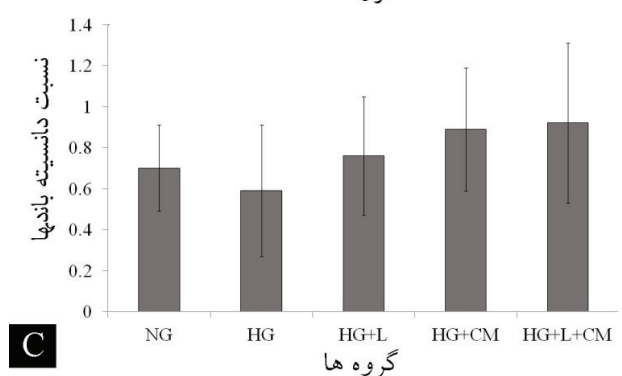
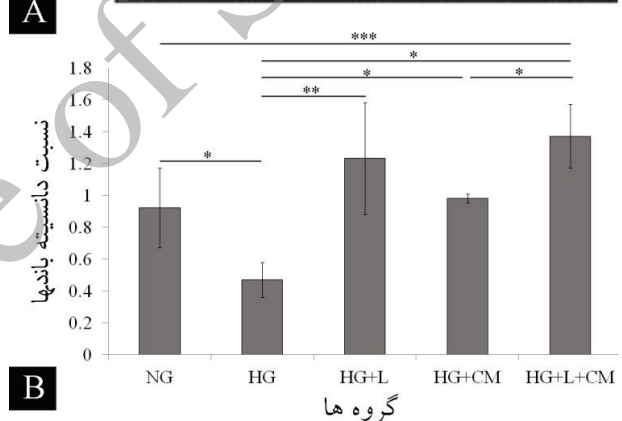
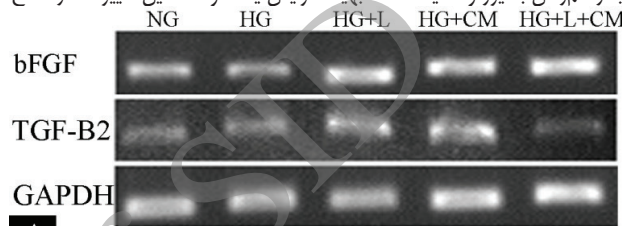
نتایج به دست آمده از آزمایش‌های مولکولی این مطالعه، بیانگر آن بود که در فیبروبلاست‌های کشت شده در غلظت بالای گلوکز (مدل فیبروبلاست دیابتی) نسبت به فیبروبلاست‌های کشت شده در شرایط طبیعی، بیان ژن bFGF کاهش معنادار و بیان ژن TGF- $\beta$ 2 کاهش غیر معنادار می‌یابد. در حالی که تیمار این سلول‌ها با لیزر یا محیط کشت بهینه و همچنین هردوی این عوامل منجر به افزایش بیان معنادار ژن bFGF و افزایش بیان غیر معنادار TGF- $\beta$ 2 شده بود. به نحوی که در هر دو ژن تحت بررسی بیشترین میزان بیان مربوط به گروهی بود که هر دو عامل پرتوی لیزر و محیط کشت بهینه را به صورت همزمان دریافت کرده بود. جالب آنکه این افزایش بیان برای ژن bFGF به حدی بود که اختلاف معنادار با گروه کنترل طبیعی داشت. بنابراین این یافته نشان می‌دهد که هر چند لیزر یا محیط کشت بهینه به تنهایی می‌توانند نقصان بیان ژن bFGF را در شرایط غلظت بالای گلوکز جبران کرده و آن را به حد طبیعی برگردانند اما تأثیر توأم آنها اثر هم‌افزایی داشته و میزان بیان را به سطحی بالاتر از حالت طبیعی افزایش می‌دهند. علاوه بر ژن bFGF، بیان ژن TGF- $\beta$ 2 نیز در همه گروه‌های مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش یافته بود، اما این افزایش از نظر آماری غیر معنادار بود. Hawkins و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که غلظت بالای گلوکز در محیط کشت نوعی شرایط استرس‌زا را برای سلول‌ها فراهم می‌کند. چنین شرایطی موجب می‌شود تا سلول‌ها نسبت به تحریکات ایجاد شده در پی تابش لیزر یا کاربرد محیط کشت بهینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاسخ‌های سریع‌تری را نشان دهند (۳۵). البته انتخاب پارامترهای مناسب نظیر طول موج، دوز و زمان تابش لیزر یا میزان تغلیظ کافی و مناسب محیط کشت بهینه دارای اهمیت است. در مطالعه حاضر با انجام آزمون دوزیابی و همچنین توجه به یافته‌های مطالعه‌های پیشین (۱۷ و ۳۶)، سعی کردیم با انتخاب دوزهای مؤثر، تعادل و کفایت تحریک‌های ایجاد شده را مورد توجه قرار دهیم.

ژن bFGF به عنوان یکی از اجزای خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، نقش مهمی را در ترمیم زخم‌های پوستی بر عهده دارد (۳۸). bFGF با تحریک نفوذ و تکثیر سلول‌های اندوتلیال مویرگی، به رگ‌زایی در بافت گرانوله کمک می‌کند. این ژن همچنین مهاجرت فیبروبلاست‌ها را پیش برده و آنها را برای تولید کلاژن به عنوان یکی از اجزای اصلی ماتریکس خارج سلولی تحریک می‌کند (۳۹). bFGF حتی در تبدیل سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌های میوفیبروبلاست (که با قابلیت انقباض خویش در محل زخم نقش مؤثری در ترمیم زخم بر عهده دارند) مؤثر است (۴۰). اسماعیل‌نژاد و Saygun در مطالعه‌های جداگانه به ترتیب تأثیر تابش لیزر را بر بیان ژن bFGF در فیبروبلاست‌های کشت شده در غلظت‌های بالای گلوکز و زخم‌های پوستی ایجاد شده در مدل‌های حیوانی آزمودند و نشان دادند که تابش لیزر کم توان توانست موجب افزایش معناداری در بیان این ژن نسبت به گروه‌های کنترل شود (۲۴ و ۴۱). این یافته‌ها با آنچه در مطالعه حاضر حاصل شد، مشابه است. کاظمی‌خو و همکارانش نیز فیبروبلاست‌های موش‌های دیابتی را تحت تابش لیزر قرار داده و بیان bFGF را اندازه گرفتند که نتایج به دست آمده همچون سایر تحقیق‌ها افزایش معنادار بیان این ژن را در پی داشت (۴۲). برای انجام موفقیت‌آمیز ترمیم زخم و بازسازی بافت، پاسخ التهابی باید در محیط

### تأثیر تیمار لیزر و محیط کشت بهینه بر بیان ژن‌های bFGF و TGF- $\beta$ 2 در فیبروبلاست دیابتی

داده‌های آزمایش مولکولی نشان داد که بیان هر دو ژن bFGF و TGF- $\beta$ 2 در گروه کنترل دیابتی، نسبت به گروه کنترل سالم کاهش می‌یابد. به نحوی که میزان بیان نسبی ژن bFGF در گروه کنترل سالم  $0.92 \pm 0.25$  و در گروه کنترل دیابتی  $0.47 \pm 0.11$  بود، همچنین میزان بیان نسبی ژن TGF- $\beta$ 2 در گروه کنترل سالم  $0.7 \pm 0.21$  و در گروه کنترل دیابتی  $0.59 \pm 0.33$  بود و این کاهش بیان برای ژن bFGF در سطح  $p < 0.05$  معنادار و برای ژن TGF- $\beta$ 2 غیر معنادار بود.

بررسی میزان بیان ژن bFGF در سایر گروه‌ها نشان داد که بیان این ژن در هر سه گروه تیمار با لیزر، تیمار با محیط کشت بهینه و تیمار همزمان با لیزر و محیط کشت بهینه، نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معناداری یافته است. به نحوی که میزان بیان نسبی ژن bFGF از  $0.47 \pm 0.11$  در گروه دیابتی به  $1.23 \pm 0.35$  در گروه تیمار شده با لیزر،  $0.98 \pm 0.28$  در گروه تیمار شده با محیط کشت بهینه و  $1.37 \pm 0.2$  در گروه تیمار همزمان با لیزر و محیط کشت بهینه افزایش یافت و همه این تغییر ها در سطح



شکل ۳: نتایج حاصل از آزمایش‌های مولکولی. (A) تصویر باندهای حاصل از واکنش RT-PCR که بیان ژن‌های bFGF و TGF- $\beta$ 2 را در گروه‌های تحت بررسی نشان می‌دهد. (B) نمودار بیان ژن C و bFGF (نمودار بیان ژن TGF- $\beta$ 2). نتایج مربوط به سه بار تکرار است، داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده و علامت یک، دو و سه ستاره به ترتیب نشانه اختلاف معنادار در سطح  $P < 0.01$ ،  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$  است. گروه کنترل طبیعی: NG، گروه کنترل دیابتی: HG، گروه دیابتی تیمار شده با لیزر: HG+L، گروه دیابتی تیمار شده با محیط کشت بهینه: HG+CM، گروه دیابتی تیمار شده با لیزر و محیط کشت بهینه: HG+L+CM.

دریافت کرده بودند، اثر مثبت این روش‌های درمانی را نشان داد. نکته قابل توجه دیگر در این مطالعه واکنش بهتر گروهی بود که هر دو تیمار محیط کشت بهینه و تابش لیزر را به صورت همزمان دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه‌هایی که هر تیمار را به تنهایی دریافت کرده بودند. با این وجود برای تأیید قطعی تأثیر این تیمارها لازم است سایر جنبه‌های عملکردی سلول‌ها در محیط کشت و همچنین درون بدن مطالعه شده و آثار جانبی آن نیز مورد توجه قرار گیرد.

#### نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از محیط کشت بهینه مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان و تابش لیزر کم‌توان به صورت جداگانه و همزمان می‌تواند تأثیر مثبتی بر بیان فاکتور تروفیک دخیل در ترمیم زخم توسط سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان که در غلظت بالای گلوکز کشت داده شده‌اند، داشته باشد. ضمن آنکه کاربرد این دو عامل به همراه همدیگر موجب می‌شود که آن دو اثر هم‌افزایی داشته باشند.

#### تشکر و قدردانی:

مقاله حاضر حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۶۲۹۹ است. نویسندگان، از مسئولان این معاونت به دلیل حمایت مالی قدردانی به عمل می‌آورند. همچنین از مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان برای اهدای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان کمال تشکر را دارند.

#### منابع:

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes Diabetes Care. 2008;31 (1 Suppl): S12-S4.
- McAdam Marx C. Economic implications of type 2 diabetes management. Am J Manag Care. 2013 Jun;19 (8 Suppl): S143-8.
- Dall TM, Zhang Y, Chen YJ, Quick WW, Yang WG, Fogli J. The economic burden of diabetes. Health Aff (Millwood) 2010;29 (2): 297-303.
- Goodson WH, Hunt TK. Wound healing and the diabetic patient. Surg Gynerol Obstet 1997;19: 600-608.
- Greenhalgh DG. Wound healing and the diabetes mellitus. Clin Plast Surg 2003;30: 37-45.
- 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. Int Wound J 2008; 5: 453-463.
- Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. J Burn Care Rehabil. 2005;26: 306-319.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair and Regeneration. 2008;16 (5): 585-601.
- Jack W Penn, Adriaan O Grobbelaar, Kerstin J Rolfe, The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review, Int J Burn Trauma 2012;2 (1): 18-28.
- Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. The Lancet 2005; 366: 1736-1743.
- Brown DL, Kane CD, Chernausk SD, Greenhalgh DG. Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II in cutaneous wound. Am J Pathol 1997; 151: 715-724.
- Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T, Hamann A, Schwarzloh B, Greten H, et al. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia Diabetes 2003;52: 542-549.
- Loots M, Lamme E, Mekkes J, Bos J, Middelkoop E. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. Arch Dermatol Res 1999; 291: 93-99.
- Benazzoug Y, Borchellini C, Labat-Robert J, Robert L, Kern P. Effect of high-glucose concentration on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in

بدن تنظیم شود (۴۳). در زخم‌های دیابتی، نفوذ لکوسیت‌ها در مراحل ابتدایی ترمیم، دچار اختلال می‌شود اما پس از شروع التهاب، نفوذ مداوم لکوسیت‌ها باعث ایجاد پاسخ التهابی طولانی مدت شده و این امر به طور بالقوه مانع از التیام طبیعی زخم می‌شود (۴۴). ژن TGF- $\beta$ 2 با تأثیر بر مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست‌ها و تنظیم عملکرد گروهی از ژن‌های خانواده MMP به ترمیم سریعتر زخم کمک می‌کند (۴۵). بیان این ژن در مراحل سه‌گانه ترمیم زخم دارای فراز و فرودهایی است. به طوری که افزایش بیان آن در ۲۴ ساعت نخست پس از ایجاد زخم علاوه بر تأثیرهایی که در بالا ذکر شد، می‌تواند موجب به راه افتادن سریعتر واکنش‌های التهابی شود و لیگاند کموتاکتیک بسیار نیرومندی برای مونوسیت‌های خون محیطی انسان باشد (۴۶). Badillo و همکارانش در مطالعه خود افزایش بیان این ژن را تا سه روز اول بعد از ایجاد زخم در پی استفاده محیط کشت بهینه سلول‌های بنیادی نشان دادند و سپس مشاهده کردند که بیان این ژن از روز سوم تا پنجم کاهش و دوباره از روز پنجم تا هفتم افزایش می‌یابد (۲۵). داده‌های خیرجو و همکارانش نیز تأییدکننده این تغییرها در بیان TGF- $\beta$ 2 است (۳۷). نتایج مطالعه ما نیز در باره افزایش بیان این ژن با مطالعه‌های پیشین دارای همخوانی است، هرچند که این افزایش بیان از نظر آماری غیر معنادار بود.

به طور کلی با مقایسه داده‌های مربوط به گروه کنترل دیابتی با گروه کنترل نرمال، می‌توان تأثیر کاهنده غلظت گلوکز را بر عملکرد سلول‌ها تأیید کرد. همچنین مقایسه این گروه با گروه‌هایی که تیمار لیزر یا محیط کشت بهینه سلول‌های بنیادی را

culture. Exp Gerontol 1998; 33: 445-455.

- Yevdokimova NY. High glucose-induced alterations of extracellular matrix of human skin fibroblasts are not dependent on TSP-1-TGF  $\beta$  1 pathway. J Diabetes Complications 2003; 17: 355-364.
- Deveci M, Gilmont R, Dunham W, Mudge B, Smith D, Marcelo C. Glutathione enhances fibroblast collagen concentration and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. Br J Dermatol 2005;152: 217-224.
- Ganji R, Piryaei A, Bayat M, Rajabi Bazl M, Mohsenifar Z, Kheirjoo R. The effect of human bone marrow-mesenchymal stem cells secretoms on diabetic wound healing. Pejouhesh 2014; 38: 10-18.
- Wang C. Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats. Tissue Eng Regen Med 2011; 461: 461.
- Chen L, Tredget E, Philip Y. G. Wu, Yaojiong W. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PLoS One 2008; 3: e1886.
- Evans DH, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. Photodermol Photoimmunol Photomed 2008; 24: 199-210.
- Piryaei A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. Differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. Stem Cell Rev 2011; 1: 103-118.
- Burt RK, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr W, Craig R, et al. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. JAMA 2008; 299: 925-936.
- Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. Hum Gene Ther 2010; 12: 1641-1655.
- Esmaelinejad M, Bayat M. Effect of low-level laser therapy on the release of interleukin-6 and basic fibroblast growth factor from cultured human skin fibroblasts in normal and high glucose mediums. J Cosmet Laser Ther 2013;15: 310-317.
- Badillo AT, Redden RA, Zhang L, Doolin EJ, Liechty KW. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. Cell Tissue Res 2007; 329: 301-311.
- Fiorina P, Pietramaggiore G, Scherer SS, Jurewicz M, Mathews JC, Vergani

- A, et al. The mobilization and effect of endogenous bone marrow progenitor cells in diabetic wound healing. *Cell Transplant* 2010; 19: 1369–1381.
27. Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, Gautam SC. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *J Surg Res* 2006; 136: 336–341.
28. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25: 2648–2659.
29. Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128: 872–880.
30. Phadnis SM, Ghaskadbi SM, Hardikar AA, Bhonde RR. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic patients portrait unique markers influenced by the diabetic microenvironment. *Rev Diabet Stud* 2009; 4: 260–270.
31. Walter M, Wright KT, Fuller H, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Experimental cell research* 2010;316: 1271-1281.
32. Yew T-L, Hung Y-T, Li H-Y, Chen HW, Chen LL, Tsai KS. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell transplantation* 2011;20: 693-706.
33. Lee SH, Jin SY, Song JS, Seo KK, Cho KH. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Annals of dermatology*2012;24: 136-143.
34. Chen L, Xu Y, Zhao J et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS one* 2014; 9: 96-161.
35. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine* 2006;38: 74-83.
36. Kheirjou R, Heidari MH, Bayat M, Rajabi Bazl M, Ganji R, Piryaei A. Evaluation of the effect of human bone marrow-mesenchymal stem cells secretome on KGF and TGF- $\beta$ 1 genes expression in diabetic rats wound, *Arak Medical University Journal* (AMUJ)2015;18 (5): 49-58.
37. Xuan YH1, Huang BB2, Tian HS1, Chi LS1, Duan YM1, Wang X3, Zhu ZX1, et al, High-Glucose Inhibits Human Fibroblast Cell Migration in Wound Healing via Repression of bFGF-Regulating JNK Phosphorylation, *PLoS One journal* 2014;9 (9): e108182.
38. Barrientos S, Stojadinovic O, S. Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg*2008; 16: 585–601.
39. Sasaki T. The effect of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblast: relevance to wound healing. *J Dermatol* 1992; 19: 664-666.
40. Bin Li, James H-C. Wang. Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J Tissue Viability* 2011; 20, 108–120.
41. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ugar Ural A, Sencimen M, Kurtis B, Effect of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Laser Med Sci* 2008;23: 211-215.
42. Kazemi khoon N, Shokrgozar MA, Ragerdi Kashani I, Amanzadeh A, Mostafavi E, Sanati H, et al. In vitro Therapeutic Effects of Low Level Laser at mRNA Level on the Release of Skin Growth Factors from Fibroblasts in Diabetic Mice. *Avicenna J Med Biotech* 2014; 6 (2): 113-118.
43. Yasunori S, Tohru O, Toshikazu K. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 265: 194-9.
44. Oscar O, Francis M. T, and Paula K. S. Chemokines and Diabetic Wound Healing. *Vascular* 2007; 6: 350–355.
45. Won-Serk Kim, Byung-Soon Park, Jong-Hyuk Sung, Jun-Mo Yang, Seok-Beom Park, Sahng-June Kwak, Jeong-Soo Park. Wound healing effect of adipose-derived stem cells. A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts, *Journal of Dermatological Science* 2007;48: 15–24.
46. Werner S, Breeden M, Hubner G, Greenhalgh DG, Longaker MT. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *The Journal Of Investigative Dermatology* 1994; 103: 469–473.