

بررسی اثر کشت فیبروبلاست اتولوگ به همراه لیزر کم توان در ترمیم زخم های سوختگی درجه ۳ در بیماران مبتلا به دیابت

خلاصه

مقدمه: سلول درمانی درمان جدیدی است که در شاخه های مختلف از جمله ترمیم زخم می تواند کاربردهای بسیاری داشته باشد. اساس این درمان استفاده از سلول های بنیادی جنینی و سوماتیک در ترمیم بافت می باشد. از سلول های فیبروبلاست و کراتینوسیت به-عنوان سلول های بنیادی بالغ می توان در ترمیم زخم استفاده کرد. بیش از ۳۰ سال است که از لیزرهای کم توان در درمان زخم های مختلف از جمله زخم های دیابتی، فشاری و زخم بستر استفاده می شود. در این مطالعه از این دو روش در کنار هم جهت ترمیم زخم های سوختگی درجه ۳ در بیماران دیابتی استفاده شده است.

روش بررسی: ۱۰ بیمار دیابتی دچار سوختگی درجه ۳ که کاندید انجام جراحی پیوند پوست بودند، به صورت داوطلبانه در این مطالعه شرکت کردند. پس از انجام بی حسی یک سانتی متر مربع از پوست پشت گوش بیماران با استفاده از پانچ بیوپسی شدند و فیبروبلاست های آن پس از استخراج کشت داده شدند. تا زمان آماده شدن کشت سلولی بیماران به مدت ۱۰-۷ جلسه یک روز در میان تحت درمان با لیزر کم توان قرار گرفتند. برای بستن زخم از نور لیزر قرمز ۶۵۰ نانومتر یک ژول بر سانتی متر مربع و برای بستن زخم از نور لیزر مادون قرمز ۸۰۸ نانومتر، ۶ ژول بر سانتی متر مربع استفاده شد. ۳-۴ هفته بعد، پس از آماده شدن سلول های کشت داده شده، سلول ها به صورت سوسپانسیون روی محل زخم منتقل شد.

یافته ها: تمامی ده بیمار در مدت ۱۰-۱۲ جلسه بهبود کامل پیدا کردند. هیچ عارضه جانبی در این درمان گزارش نشد.

نتیجه گیری: از این روش می توان به عنوان یک روش مؤثر و بی عارضه در ترمیم زخم های سوختگی به ویژه در بیماران مبتلا به دیابت استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سلول درمانی، لیزر کم توان، زخم سوختگی، دیابت

نوش آفرین کاظمی خو^۱
سونا زارع^{۲،۱}
سهیلا مکملی^۳
مصطفی ده مرده ای^۳
رضا وقر دوست^۳
مهنوش مؤمنی^۳
فرشته انصاری^۴
محمدعلی نیلفروش زاده^۱

۱. مرکز تحقیقات پوست و سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
۳. مرکز لیزر و اپتیک کانادا، بریتیش کلمبیا، کانادا
۴. مرکز تحقیقات سوختگی، دپارتمان جراحی پلاستیک و ترمیمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: محمدعلی نیلفروش زاده، تلفن: ۰۲۱۲۲۲۱۲۵۳۷
پست الکترونیک: dr_nilfroush@yahoo.com

مقدمه

سالیانه میلیون‌ها بیمار به‌علت سوختگی در بیمارستان‌های سراسر دنیا بستری می‌شوند و بیش از ۳۰۰۰۰۰ نفر به‌علت عوارض ناشی از سوختگی جان خود را از دست می‌دهند [۱]. پروسه ترمیم در این بیماران به‌علت اختلالات خون‌رسانی و عفونت دچار مشکل می‌باشد [۲] و بسیاری از زخم‌ها پس از ترمیم منجر به تشکیل اسکار می‌شوند. درمان استاندارد در سوختگی‌های عمیق استفاده از آلو یا اتوگرافت می‌باشد که از محدودیت‌های آن می‌توان به آنتی‌ژن‌سیسته و محدودیت پوست کافی جهت پیوند اشاره کرد [۳].

روش‌های درمانی متعددی برای افزایش سرعت ترمیم و کاهش احتمال ایجاد اسکار به کار می‌رود که از این میان می‌توان به انواع پانسمان‌ها، فاکتورهای رشد، روش‌های جراحی و غیره اشاره کرد [۴ و ۵].

طب بازساختی یک درمان جدید و چندجانبه با تمرکز بر سلول‌های انسانی شامل سلول‌های بنیادی سوماتیک، بالغ و جنینی می‌باشد [۶]. سلول‌های اتولوگ فیبروبلاست یا کراتینوسیت به‌عنوان سلول‌های بنیادی سوماتیک می‌توانند در درمان بیماران مبتلا به زخم از جمله زخم‌های ناشی از سوختگی یا زخم‌های وریدی مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های فعال‌شده فیبروبلاستی می‌توانند با تولید فاکتور رشد فیبروبلاستی، پلاکتی و اندوتلیال عروقی، نقش مهمی در تشکیل ماتریکس خارج سلولی، پرولیفراسیون و تمایز اپیدرمی ایفا کند [۷]. یک مشکل اساسی در استفاده از سلول‌درمانی زمان حداقل ۳-۴ هفته است که طول می‌کشد تا سلول‌ها به حد کافی تکثیر شوند [۸].

بیش از ۴ دهه است که از لیزر کم‌توان به‌عنوان یک روش مؤثر، بی‌عارضه و غیرتهاجمی در درمان زخم استفاده شده است. این لیزرها فاقد اثرات حرارتی می‌باشند و از طریق فعال کردن فیبروبلاست‌ها، افزایش سنتز کلاژن، تقویت میکروسیرکولاسیون و تولید بافت گرانوله و تأثیر بر سیستم ایمنی باعث تسریع روند ترمیم زخم می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند که لیزر کم‌توان باعث تقویت پروسه‌های متابولیک سلولی و تقویت توان رژنراسیون بافت می‌شود [۹ و ۱۰].

مطالعات پیشین ما نشان‌دهنده تأثیر لیزر کم‌توان در درمان زخم‌های دیابتی [۱۱]، سوختگی [۱۲]، فشاری [۱۳]، بهبود نروپاتی [۱۴] و وضعیت متابولیکی بیماران دیابتی [۱۵] و تأثیر بر سرعت بهبود پس از جراحی سزارین [۱۶] و جراحی پیوند عروق کرونر [۱۷] می‌باشد.

در این مطالعه ما اثر دو روش نوین، ۱- لیزر کم‌توان (برای مرحله اول، ۳-۴ هفته‌ای که طول می‌کشد تا سلول‌های کشت‌داده‌شده آماده شوند) و ۲- کشت فیبروبلاست اتولوگ (برای مرحله دوم) را در بیماران دیابتی دچار سوختگی درجه ۳ کاندید جراحی پیوند پوست گزارش می‌کنیم.

روش بررسی

ده بیمار دیابتی (۵۰-۲۸ساله) دچار سوختگی درجه سه براساس سیستم طبقه‌بندی زخم دانشگاه تگزاس [۱۸]، که در بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری بستری بودند و کاندید انجام جراحی پیوند پوست بودند یا یک‌بار تحت جراحی قرار گرفته بودند و به‌علت بازشدن محل پیوند کاندید جراحی مجدد بودند، در طرح شرکت داده شدند. خانم‌های باردار، حساس‌به‌نور، مبتلا به بیماری‌های مزمن و بدخیمی از مطالعه خارج شدند. پس از پرکردن فرم پرسشنامه و رضایت‌نامه، در شرایط استاندارد از بیماران عکس گرفته شد. پس از انجام بی‌حسی با تزریق لیدوکائین با استفاده از پانچ، یک سانتی‌متر مربع از پوست پشت گوش بیماران برای کشت فیبروبلاست بیوپسی شد و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین (ATOCEL, Austria, ATRA-010) در شرایط استریل به کلین‌روم مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی انتقال داده شد. در مدت ۳-۴ هفته‌ای که کشت سلول‌ها به طول می‌انجامد، بیماران تحت لیزر درمانی قرار گرفتند. برای لیزر درمانی بستر زخم از نور قرمز ۶۵۰ نانومتر، ۱۵۰ میلی‌وات، با سطح مقطع ۱ سانتی‌متر مربع، ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع (Optic & Laser Center)، و برای حاشیه زخم از نور لیزر مادون قرمز، ۸۰۸ نانومتر، ۲۰۰ میلی‌وات، با سطح مقطع ۱ سانتی‌متر مربع (3LLaser, Iran) استفاده شد.

کشت سلول

پس از انتقال سلول‌ها به کلین‌روم مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، نمونه‌ها سه‌بار با محلول DMEM (ATOCEL, Austria, ATCDH883)، حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین شسته می‌شدند و پس از جدا کردن لایه چربی، با استفاده از تیغ بیستوری به قطعات کوچک تقسیم می‌گردیدند و به لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری منتقل می‌شدند. پس از اضافه کردن کلاژناز تیپ یک ۰/۱ درصد (ATOCEL, Austria) دو ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده می‌شدند.

سپس با دور RPM ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب حاصل در پلیت ۶ خانه‌ای ریخته شد و به آن سرم گاوی ۱۰ درصد اضافه گردید. محیط کشت هر ۲ روز در میان تعویض می‌شد. پس از اینکه سلول‌ها ۹۰-۸۰ درصد فضا را پر می‌کردند، سلول‌ها با استفاده از تریپسین ۲۵ درصد (ATOCEL, Austria, and ATRE) 10810) جدا شده و در فلاسک‌های ۲۵ میلی‌لیتری کشت مجدد داده می‌شدند. پس از اینکه سلول‌ها ۹۰-۸۰ درصد فضای فلاسک را پر می‌کردند، سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری از نظر آلودگی میکروبی چک شده و پس از بررسی از نظر عدم آلودگی به میکوپلازما و قارچ‌ها، حدود

جدول ۱: مشخصات بیماران شرکت کننده در طرح

	Sex	Age (Year)	Initial size of ulcer (cm ²)	Time to healing (week)
1	m	30	21.30	10
2	m	32	8.54	11
3	m	40	28.78	12
4	m	42	9.40	11
5	m	68	14.61	12
6	f	67	31.03	12
7	f	50	22.75	11
8	f	54	8.59	10
9	m	43	8.20	11
10	m	44	9.60	11

بحث

در این مطالعه ما برای اولین بار تأثیر لیزر کم توان را به همراه کشت فیبروبلاست اتولوگ در درمان بیماران دیابتی دچار سوختگی درجه ۳ که کاندید جراحی پیوند پوست بودند یا یکبار جراحی شده بودند و به علت باز شدن محل جراحی کاندید جراحی مجدد یا جراحی قطع عضو بودند، گزارش کردیم. تمامی بیماران در طول حداکثر سه ماه بهبود کامل پیدا کردند.

مطالعات پیشین ما نشان دهنده تأثیر لیزر کم توان به تنهایی در ترمیم زخم های دیابتی در بیماران کاندید آمپوتاسیون بود [۱۱]. اگرچه تمامی بیماران بهبود کامل پیدا کردند، ولی مدت درمان طولانی و ۶-۲۴ ماه بود. ما در مطالعه بعدی برای کاهش مدت درمان از جراحی پیوند

۲۰ میلیون سلول فیبروبلاست کشت داده شده در ۱ میلی لیتر PBS جهت انتقال به بافت آماده سازی می شد.

انتقال سلول های کشت داده شده به بافت

ابتدا با استفاده از محلول تری کلورواستیک اسید (TCA) ۵۰ درصد بخش های هیپرکراتوتیک اطراف زخم به صورت شیمیایی دبرید می گردید [۱۹] و بستر زخم با استفاده از تیغ بیستوری خراش داده می شد تا خونریزی های سر سوزنی ایجاد شود. سپس منطقه با نرمال سالین شسته شده و یک لایه نازک از سوسپانسیون حاوی فیبروبلاست با استفاده از سمپلر روی منطقه زخم ریخته می شد. منطقه با استفاده از پانسما پلی وینیل تگادرم (3M, America) که مانع خروج سلول ها می شد پانسمان شده و جهت جلوگیری از عفونت ثانویه برای بیماران آنتی بیوتیک سفالکسین ۵۰۰ میلی گرم به مدت ۷ روز تجویز می شد. پس از ۷ روز پانسمان برداشته شده و بیماران یکروز درمیان ارزیابی و مجدداً پانسمان می شدند. درانتها، پس از بهبود کامل از بیماران عکس گرفته شده و با استفاده از نرم افزار Pictzar آنالیز می شدند.

یافته ها

ده بیمار شامل ۷ مرد (۷۰ درصد) و ۳ زن (۳۰ درصد) ۳۰-۶۸ ساله با میانگین سنی ۴۷ سال ($SD=12/96$) در مطالعه وارد شدند. حداقل سایز زخم بیماران $8/20$ سانتی متر مربع و حداکثر $31/03$ سانتی متر مربع (میانگین $16/28=$ سانتی متر مربع و $SD=8/94$) بود. دو بیمار (۲۰ درصد) پس از ۱۰ هفته، ۵ بیمار (۵۰ درصد) پس از ۱۱ هفته و ۳ بیمار (۳۰ درصد) پس از ۱۲ هفته بهبود کامل پیدا کردند. مشخصات بیماران در جدول ۱ موجود است.

آنالیز آماری با استفاده از IBM SPSS (version 21) انجام شد. عکس های قبل و بعد بیماران با استفاده از نرم افزار pictzar آنالیز شد.

هیچ ارتباط خطی بین سن بیماران ($Pearson's r=0.511, p=0.131$) و سایز اولیه زخم ($Pearson's r=0.476, p=0.165$) و زمان بهبود یافت نشد



شکل ۱: الف: بیمار دیابتی که به علت سوختگی درجه ۳ تحت جراحی آمپوتاسیون قرار گرفته محل جراحی مجدداً باز شده است. ب: بعد از ۱۰ جلسه درمان با لیزر کم توان ج: درمان با فیبروبلاست اتولوگ د: پانسمان با تگادرم: ه: درمان کامل

لیزر کم‌توان باعث تسریع روند ترمیم و ایجاد لایه اپیتلیال در موش‌ها می‌شود [۳۲ و ۳۳]. Dantas و همکاران از پوشش‌های سدیم آلگینات/ کیتوزان به‌همراه لیزر کم‌توان در درمان زخم سوختگی در موش استفاده کردند. گزارش آن‌ها نشان داد که استفاده همزمان از این دو روش باعث تسریع تشکیل لایه اپیتلیال، کلاژن‌سازی و نئوواسکولاریزاسیون می‌شود [۳۴]. Brayat و همکاران از لیزر کم‌توان در درمان سوختگی درجه ۲ در موش استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که لیزر کم‌توان احتمال ابتلا به عفونت با استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیس را کاهش می‌دهد [۳۵]. مطالعه عزتی و همکاران نشان‌دهنده تأثیر لیزر کم‌توان در تسریع زخم سوختگی درجه ۳ در موش می‌باشد [۳۶]. تنها مطالعه گزارش شده در درمان زخم سوختگی در انسان مطالعه پیشین ما، استفاده از لیزر کم‌توان به‌همراه جراحی پیوند پوست در درمان بیماران دچار زخم سوختگی می‌باشد [۱۲]. Gaida و همکاران نیز از لیزر کم‌توان در درمان اسکارهای ناشی از سوختگی استفاده کردند [۳۷].

نتیجه‌گیری

از آنجاکه تأخیر در ترمیم زخم‌های ناشی از سوختگی باعث افزایش درد و ناراحتی بیمار می‌شود و احتمال ابتلا به عفونت را نیز افزایش می‌دهد، استفاده از کشت فیبروبلاست اتولوگ به‌همراه لیزر کم‌توان با تسریع روند ترمیم ممکن است موربیدیتی را کاهش دهد و می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر در درمان بیماران دچار سوختگی کاندید جراحی که به انجام جراحی رضایت نمی‌دهند و یا انجام جراحی برای آن‌ها ریسک بالا دارد، استفاده شود.

تشکر و قدردانی

با سپاس از پرسنل مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی و بیمارستان سوانح و سوختگی مطهری که در انجام این طرح ما را یاری کردند.

پوست به‌همراه لیزر کم‌توان در درمان زخم‌های سوختگی درجه ۳ در بیماران دیابتی کاندید جراحی پیوند پوست استفاده کردیم. این روش مدت درمان را به ۱۲ هفته کاهش داد [۲۰]. اگرچه جراحی پیوند پوست درمان استاندارد در سوختگی‌های با عمق زیاد (درجه ۲ عمیق و درجه ۳) می‌باشد، ولی از مشکلات آن می‌توان به بستری شدن در بیمارستان، خطرات مربوط به بیهوشی و جراحی، ایجاد اسکار در محل برداشت پوست و محل پیوند پوست و نبود پوست کافی جهت پیوند در سوختگی‌های وسیع اشاره کرد [۲۱]. در این مطالعه به‌جای برداشتن بخش وسیعی از پوست سالم جهت پیوند، تنها ۱ سانتی‌متر مربع از پوست پشت گوش بیمار جهت استخراج سلول‌های فیبروبلاست بیوسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از این روش به‌همراه لیزر کم‌توان می‌تواند در بهبود زخم‌های سوختگی عمیق در بیماران دچار اختلال ترمیم از جمله بیماران دیابتی مؤثر باشد. اگرچه مدت‌زمان این درمان در مقایسه با درمان ترکیبی لیزر کم‌توان و جراحی پیوند پوست طولانی‌تر است (۱۲ هفته در مقایسه با ۱۰ هفته) ولی از مزیت‌های آن می‌توان به عدم نیاز به بستری شدن در بیمارستان و انجام جراحی اشاره کرد.

از جمله مطالعات سلولی ما در گذشته، تابش لیزر مادون قرمز ۸۱۰ نانومتر به سلول‌های فیبروبلاست کشت‌داده شده پوست موش‌های دیابتی و غیر دیابتی بود. نتایج نشان داد که تابش لیزر به‌میزان قابل ملاحظه‌ای بیان فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) را در موش‌های دیابتی افزایش می‌دهد. اگرچه تابش لیزر بیان فاکتور رشد پلاکتی را نیز افزایش می‌داد، ولی در مطالعه ما این میزان از نظر آماری قابل ملاحظه نبود [۲۲].

از سال ۱۹۷۵، از سلول‌درمانی در درمان زخم‌های سوختگی استفاده شده است [۲۳]. جایگزین کردن سلول‌های فیبروبلاست در دم با ایجاد یک ماتریکس سلولی به رگزائی، تشکیل بافت گرانوله و ایجاد لایه اپیتلیال کمک می‌کند [۲۴]. Braye و همکاران از کشت اپیتلیوم اتوگرافت برای درمان سوختگی در کودکان استفاده کردند [۲۵]. Wissler و همکاران گزارش کردند که می‌توان از کشت کراتینوسیت و فیبروبلاست اتولوگ در درمان سوختگی با موفقیت استفاده کرد [۲۷]. Owen و همکاران از پوست تهیه شده به‌روش مهندسی بافت که حاوی فیبروبلاست پوست نوزاد بود در درمان زخم ناشی از نکروبیوزیس لیپوئیدیکا استفاده کردند [۲۶]. نیلفروش‌زاده و همکاران از سوسپانسیون فیبروبلاست اتولوگ در درمان سوختگی در بیمار دیابتی استفاده کردند [۱۹]. آن‌ها از این روش جهت افزایش حجم بافت نرم جهت درمان اسکار نیز استفاده کردند [۲۷].

مطالعات متاآنالیز و مروری متعددی نشان‌دهنده تأثیر لیزر کم‌توان در درمان زخم می‌باشد [۳۰-۲۸]. بیشتر این مطالعات بر روی زخم‌های دیابتی، عروقی و زخم بستر می‌باشد [۱۳ و ۳۱-۲۹]. تأثیر لیزر کم‌توان در درمان زخم‌های سوختگی بیشتر در مدل‌های حیوانی بررسی شده است. Mester بنیان‌گذار استفاده از لیزر کم‌توان در درمان زخم نشان داد که

References:

1. Ghanassia E, Villon L, dit Dieudonné J-FT, Boegner C, Avignon A, Sultan A. Long-Term Outcome and Disability of Diabetic Patients Hospitalized for Diabetic Foot Ulcers A 6.5-year follow-up study. *Diabetes care*. 2008; 31(7): 1288-92.
2. Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, Mohler MJ, Wendel CS, Lipsky BA. Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes care*. 2006; 29(6): 1288-93.
3. Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. *Burns*. 2001; 27(5): 517-22.
4. Taheri A, Mansoori P, Al-Dabagh A, Feldman SR. Are corticosteroids effective for prevention of scar formation after second-degree skin burn? *Journal of Dermatological Treatment*. 2014; 25(4): 360-2.
5. Wong T, McGrath J, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology*. 2007; 156(6): 1149-55.
6. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. 2008.
7. Wissner D, Steffes J. Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. *Burns*. 2003; 29(4): 375-80.
8. Llanos S, Danilla S, Barraza C, Armijo E, Pinos JL, Quintas M. Effectiveness of negative pressure closure in the integration of split thickness skin grafts: a randomized, double-masked, controlled trial. *Annals of surgery*. 2006; 244(5): 700.
9. Bihari I. The biostimulative effect of low level laser therapy of long-standing crural ulcers using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers, and noncoherent light. *Laser therapy*. 1989; 1(2): 97-8.
10. Almeida-Lopes L, Rigau J, Amaro Zângaro R, Guidugli-Neto J, Marques Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in surgery and medicine*. 2001; 29(2): 179-84.
11. Kazemi-Khoo N. Successful treatment of diabetic foot ulcers with low-level laser therapy. *The Foot*. 2006; 16(4): 184-7.
12. Dahmardehei M, Kazemikhoo N, Vaghardoost R, Mokmeli S, Momeni M, Nilforoushzadeh MA. Effects of low level laser therapy on the prognosis of split-thickness skin graft in type 3 burn of diabetic patients: a case series. *Lasers in medical science*. 2016: 1-6.
13. Kazemikhoo N, Rahbar MR, Akrami SM. Low-Level Laser Therapy Along With Intravascular Laser in Deep Pressure Ulcer Resistant to Conventional Therapies. *Journal of Skin and Stem Cell*. 2015; 2(4).
14. Khamseh ME, Kazemikho N, Aghili R, Forough B, Lajevardi M, Dabaghian FH. Diabetic distal symmetric polyneuropathy: effect of low-intensity laser therapy. *Lasers in medical science*. 2011; 26(6): 831-5.
15. KazemiKhoo N, Ansari F. Blue or red: which intravascular laser light has more effects in diabetic patients? *Lasers in medical science*. 2015; 30(1): 363-6.
16. Mokmeli S, Khazemikho N, Niromanesh S, Vatankhah Z. The application of low-level laser therapy after cesarean section does not compromise blood prolactin levels and lactation status. *Photomedicine and laser surgery*. 2009; 27(3): 509-12.
17. Khoo NK, Babazadeh K, Lajevardi M, Dabaghian FH, Mostafavi E. Application of low-level laser therapy following coronary artery bypass grafting (CABG) surgery. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2014; 5(2): 86-91.
18. Lavery LA, Armstrong DG, Harkless LB. Classification of diabetic foot wounds. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 1996; 35(6): 528-31.
19. Nilforoushzadeh MA, Jaffary F, Siavash M, Ansari N, Siadat AH, Heidari A. Autologous fibroblast suspension for the treatment of refractory diabetic foot ulcer. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2016; 82(1): 105.
20. Dahmardehei M, Kazemikhoo N, Vaghardoost R, Mokmeli S, Momeni M, Nilforoushzadeh MA. Effects of

low level laser therapy on the prognosis of split-thickness skin graft in type 3 burn of diabetic patients: a case series. *Lasers in medical science*. 2016; 31(3): 497-502.

21. Isitt CE, McCloskey KA, Caballo A, Sharma P, Williams A, Leon-Villalpalos J. An analysis of surgical and anaesthetic factors affecting skin graft viability in patients admitted to a Burns Intensive Care Unit. *Scars, Burns & Healing*. 2016; 2: 2059513116642089.

22. Khoo NK, Shokrgozar MA, Kashani IR, Amanzadeh A, Mostafavi E, Sanati H. In vitro therapeutic effects of low level laser at mRNA level on the release of skin growth factors from fibroblasts in diabetic mice. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2014; 6(2): 113.

23. Leclerc T, Thepenier C, Jault P, Bey E, Peltzer J, Trouillas M. Cell therapy of burns. *Cell proliferation*. 2011; 44(s1): 48-54.

24. Burke JF, Yannas IV, Quinby Jr WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of surgery*. 1981; 194(4): 413.

25. Braye F, Oddou L, Bertin-Maghit M, Belgacem S, Damour O, Spitalier P. Widely meshed autograft associated with cultured autologous epithelium for the treatment of major burns in children: report of 12 cases. *European journal of pediatric surgery: official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery= Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 2000; 10(1): 35-40.

26. Owen C, Murphy H, Yates V. Tissue-engineered dermal skin grafting in the treatment of ulcerated necrobiosis lipoidica. *Clinical and experimental dermatology*. 2001; 26(2): 176-8.

27. Nilforoushzadeh MA, Siadat AH, Arianrad M, Moulavi F, Baradaran EH, Esfahani MHN. Soft tissue augmentation by autologous cultured fibroblasts transplantation for treatment of wrinkles and scars: a case series of 20 patients. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2010; 15(3): 167.

28. Beckerman H, de Bie RA, Bouter LM, De Cuyper

HJ, Oostendorp RA. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. *Physical Therapy*. 1992; 72(7): 483-91.