

آسیب‌شناسی بافتی تأثیر ژل سیکلوسپورین بر پیوند آزاد تمام ضخامت

پوست (آلوگرافت) در موش صحرایی

ارغوان مفیدی^۱، علیرضا جهان‌دیده^{۲*}، سعید حصارکی^۳

چکیده

امروزه از پیوند پوست به میزان گسترده در ترمیم جراحات‌های پوستی استفاده می‌شود. سیکلوسپورین یکی از پرمصرف‌ترین و موثرترین داروهای سرکوبگر ایمنی است که در عین حال استفاده سیستمیک از آن دارای عوارض جانبی و سمیبر روی سیستم عصبی، کلیه و کبد می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر ژل ۰/۵٪ سیکلوسپورین در رد پیوند آزاد تمام ضخامت پوست در موش صحرایی است. در این مطالعه تجربی از ۴۵ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به عنوان گیرنده‌ی پیوند و ۱۵ موش نر بالغ اسپراگودالی (SD) به عنوان دهنده‌ی پیوند با محدوده سنی ۱۴ تا ۱۵ هفته و محدوده وزنی 10 ± 200 گرم استفاده شد. پس از بیهوشی عمومی، برش تمام ضخامت پوست دایره‌ای شکل به قطر ۱/۵ سانتی‌متر شامل لایه‌های اپیدرم و درم از موش‌های دهنده اسپراگودالی به محل وسط کتف گیرنده‌ی ویستار پیوند زده شد. پس از پیوند، موش‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۵ تایی (شاهد، کنترل مثبت و تیمار با ژل ۰/۵٪ سیکلوسپورین تقسیم شده سپس هر کدام خود به ۵ گروه ۳ تایی (گروه‌های نمونه‌برداری در روزهای ۳، ۷ و ۱۵) تقسیم شدند. در گروه شاهد هیچ درمانی صورت نگرفت. گروه کنترل، سیکلوسپورین داخل صفاقی با دوز 10 mg/kg/day دریافت کرد و در گروه تحت درمان روزانه به محل پیوند ژل ۰/۵٪ سیکلوسپورین مالیده شد. سپس در روزهای ۳، ۷ و ۱۵ پس از پیوند از محل کاشت (پیوند) نمونه‌برداری انجام شد و آسیب‌شناسی بافتی انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری کروسکال والیس (kruskalwallis) و نرم‌افزار SPSS مورد واکاوی آماری قرار گرفت. در مشاهدات ریزینی استفاده از ژل سیکلوسپورین موجب کاهش معنی‌دار $p < 0/05$ میزان واسکولیت، فولیکولیتیس، التهاب درم و دژنره شدن اپیدرم در روزهای سوم و هفتم بعد از پیوند در مقایسه با گروه کنترل شد در حالیکه مانع از رد پیوند در روز پانزدهم پس از پیوند نگردید. به نظر می‌رسد استفاده از ژل سیکلوسپورین اثرات قابل قبولی بر روند پذیرش بافت پیوندی پوست دارد اگرچه استفاده از آن به تنهایی مانع از رد پیوند نمی‌شود. برای پذیرش موثرتر پیوند پوست می‌توان از ژل سیکلوسپورین به همراه سایر داروهای ایمنوسا پرسی و به صورت ترکیبی استفاده کرد. **واژگان کلیدی:** ژل سیکلوسپورین، پیوند آزاد تمام ضخامت پوست، موش صحرایی.

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۳

مقدمه

پوست به عنوان وسیع‌ترین و خارجی‌ترین عضو بدن همواره در معرض آسیب‌های مکانیکی و شیمیایی قرار گرفته و در

طول مدت حیات بیشترین روند آسیب و بازسازی را تجربه می‌کند. پیوند پوست یک روش ارزشمند در التیام و درمان زخم‌ها به شمار می‌رود و می‌تواند به عنوان یک روند نجات‌دهنده حیات یا افزایش‌دهنده‌ی کیفیت زندگی تلقی شود^(۲).

در میان پیوندهای پوستی رایج در انواع جراحات، پیوند پوستی آزاد تمام ضخامت به دلیل وسعت عمل و توانایی پوشش‌دهی مناسب در محل آسیب دیده، جایگاه خاصی دارد و در بسیاری از موارد توصیه می‌گردد. پیشرفت تکنیک‌های جراحی پیوند، موجب برطرف شدن یکی از سدهای موجود در انجام یک پیوند موفق گردیده است، اما مانع قوی دیگر جهت کاربرد پیوند بعنوان یک روش درمانی معمول، سیستم ایمنی می‌باشد. رد پیوند حاد یک پاسخ طبیعی است، زیرا عضو پیوند زده شده توسط سیستم ایمنی فرد دریافت‌کننده به عنوان یک بیگانه تلقی می‌شود. میزان پاسخ ایمنی به یک پیوند، با توجه به نوع پیوند و بافت مورد نظر متغیر می‌باشد. به صورت کلی، رد پیوندهای پوست سریع‌تر از بقیه ارگان‌ها مانند قلب یا کلیه صورت می‌گیرد^(۷ و ۱).

طیفی از داروهای سرکوب کننده ایمنی (Immunosuppressive) که قادرند روند رد پیوند را به تأخیر انداخته یا از آن ممانعت به عمل آورند، شامل داروها و آنتی‌بادی‌های اختصاصی بوده که موجب کاهش حمله سیستم ایمنی می‌گردند. در پیوند ارگان‌های توپر (Solid organ) بیمار باید داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی را به صورت مادام‌العمر مصرف کند و عملکرد مناسب گرافت نیازمند درمان سرکوب‌گر ایمنی در سراسر عمر است^(۳ و ۲).

۱- دانش آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه جراحی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (dr.jahandideh@gmail.com)
۳- گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

از طرفی دریچه درمانی سیکلوسپورین (یعنی مرز ناکافی بودن اثر سرکوب‌گر سیستم ایمنی و دوز سمی آن) بسیار محدود می‌باشد (۳)، بنابراین پایش غلظت سطح سیکلوسپورین جهت تعیین دوز مؤثر دارو برای هر پیوند کاملاً ضروری بوده که این روش علاوه بر هزینه‌بر بودن، زمان‌بر نیز می‌باشد.

در حال حاضر در کشور ما فرآورده‌های جلدی سیکلوسپورین جهت درمان وجود ندارد و اطلاعات کمی در مورد مقایسه کیفیت و اثربخشی فرمولاسیون‌های مختلف موضعی این دارو در دست می‌باشد. نظر به اینکه اشکال موضعی دارویی با اثرات محدود به اپیدرم و درم عوارض بسیار کمتری داشته و همچنین عدم تداخلات دارویی در آنها مطرح می‌باشد، در تحقیق حاضر تلاش شده است با توجه به عوارض سیکلوسپورین با روش‌های تجویزی موجود، فرم دارویی ژل از این داروی موثر ساخته شده و اثربخشی ژل ۰/۵٪ سیکلوسپورین دررد پیوند آزاد تمام ضخامت پوست در موش صحرایی برای اولین بار در ایران ارزیابی شود.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و در آن کلیه ملاحظات اخلاقی کار روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردیده است. حیوانات مورد مطالعه: در این پژوهش از ۴۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به عنوان گیرنده و ۱۵ سر موش نر بالغ اسپراگودالی (SD) به عنوان دهنده پیوند پوست با محدوده سنی ۱۵-۱۴ هفته و محدوده وزنی 200 ± 10 گرم استفاده شد. این حیوانات جهت انجام آزمایش در قفس‌های استاندارد نگهداری موش تحت شرایط نوردهی کنترل شده ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ثابت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. حیوانات قبل از انجام مطالعات به مدت یک هفته دوره تطابق را گذراندند تا تأثیر منفی استرس ناشی از محیط ناآشنا بر نتایج مطالعه‌ی مورد نظر

داروی سیکلوسپورین یکی از موثرترین و پرمصرف‌ترین داروها در پیشگیری از رد پیوند اعضا است که پس از ورود به عرصه درمان تحولات شگرفی را در بقای بیماران پیوندی ایجاد نموده است. این دارو همچنین در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون نیز کاربرد فراوان دارد. سیکلوسپورین در کشور ما نیز از سالیان قبل مورد استفاده بوده و بویژه با توجه به تعداد قابل توجه بیماران پیوند کلیه سالانه نیاز به مقادیر متناهی از داروی مذکور می‌باشد (۵ و ۲).

در سال ۱۹۷۲ برای اولین بار Borel از مرکز تحقیقاتی ساندوز سویس ثابت کرد حاصل متابولیسم نوعی قارچ به نام (Tolypocladium inflatum gams) دارای اثرات ایمنوساپرسیو می‌باشد (۹). سنتز آزمایشگاهی انواع سیکلوسپورین از قبیل A, E, D, C, G تا سال ۱۹۸۰ کامل شد و از میان آنها نوع A به عنوان داروی اختصاصی و موثر تضعیف‌ایمی در جراحی پیوند اعضا مورد استفاده قرار گرفت (۵). پایش درمانی سیکلوسپورین - آ برای رسیدن به حداکثر اثر تضعیف‌ایمی، ایمنی بیشتر و سمیت کمتر، بیش از ۲۵ سال است که مورد بحث است و همچنان به نتیجه قطعی نرسیده است اگرچه رایج‌ترین سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در بیماران پیوندی است (۸). در تحقیقات گذشته مناسب‌ترین دوز سیکلوسپورین که بتواند با موفقیت سیستم ایمنی را سرکوب و همچنین از عوارض سمی دارو جلوگیری نماید بسته به مدت زمان بعد از پیوند متفاوت گزارش شده است (۳).

اکثر درمان‌های سرکوب‌ایمی موجود دارای معایبی مثل غیراختصاصی بودن می‌باشند که منجر به سرکوب عمومی ایمنی در بدن می‌شود. مداخله در سیستم ایمنی از یک سو و عوارض جانبی سیکلوسپورین از سوی دیگر سبب ایجاد پیامدهایی می‌شود که از جمله‌ی آن می‌توان به سمیت کلیوی مزمن، سمیت کبدی، نئوپلازی، افزایش فشار خون و هایپرپلازی لته اشاره کرد (۱۷).



نگاره ۱- برداشت پوست ناحیه پیوند از موش صحرایی گیرنده



نگاره ۲- نگهداری گرافت‌ها در ظرف استریل حاوی نرمال سالین ۱۰٪



نگاره ۳- بخیه پوست پیوندی با بستر گیرنده

به حداقل برسد. موش‌ها با پلت تغذیه شده و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند.

روش بیهوشی و پیوند پوست آلوگراف

به منظور انجام عمل جراحی، حیوانات دوباره وزن‌کشی شدند. بیهوشی جراحی با استفاده از داروهای القاء بیهوشی با ترکیب زایلازین هیدروکلراید ۲٪ (۱۰ mg/kg/IP) و کتامین هیدروکلراید ۱۰٪ (۶۰ mg/kg/IP) به صورت داخل صفاقی انجام شد.

پس از بیهوشی، حیوانات روی میز جراحی به شکم خوابانده و بعد از آماده‌سازی و اسکراب با بتادین رقیق شده و الکل ۷۰٪ در ناحیه پستی و جوانب، شان‌گذاری در محل جراحی انجام شد. برای مدل پیونداز یک موش دهنده نژاد اسپراگودالی (SD) سه گرفت از پوست برداشته و به صورت تصادفی به سه موش گیرنده نژاد ویستار هرکدام یک گرفت داده شد. به این صورت که ابتدا توسط ماژیک مخصوص دایره‌هایی به قطر ۱/۵ سانتی‌متر در محل بین دو کتف موش دهنده علامت‌گذاری، سپس با استفاده از یک پنس دندان موشی و اسکالپل استریل با برش تمام ضخامت (شامل لایه‌های اپیدرم و درم)، پوست جدا شد و توسط فیچی چربی‌ها و بافت زیرجلدی با دقت برداشته شد تا حداقل آسیب به فولیکول‌های مو وارد شود. موش دهنده معدوم و گرافت‌های دریافتی پوست تا موقع پیوند در ظرف استریل حاوی نرمال سالین ۱۰٪، نگهداری شد (نگاره ۲). در موش گیرنده ناحیه پیوند در محل بین دو کتف، ابتدا توسط سرم فیزیولوژی استریل شستشو و با بتادین رقیق ضدعفونی شد و یک بار دیگر محل با سرم فیزیولوژی استریل شستشو و موضع آماده پذیرش پیوند گردید. محل پیوند پوست به اندازه گرفت و به صورت تمام ضخامت، برداشته شد (نگاره ۱). سپس در شرایط استریل و با در نظر گرفتن دقیق جهت رشد مو، گرفت دریافتی و لبه‌های پوست اطراف با نخ ۰-۴ بخیه شد (نگاره ۳).

گروه‌بندی و نگهداری موش‌ها طی مطالعه

پس از جراحی، ۴۵ موش گیرنده به‌طور تصادفی به ۳ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. در گروه ۱ (شاهد) هیجدرمانی صورت‌نگرفت. گروه ۲ (کنترل مثبت) سیکلوسپورین داخل صفاقی با دوز ۱۰ mg/kg/day دریافت کرد (7) و در گروه ۳ (تیمار با ژل سیکلوسپورین) روزانه به محل پیوند ژل ۰/۵٪ سیکلوسپورین مالیده شد. حیوانات با توجه به تیمار خود در قفس‌های مشخص شده جداگانه نگهداری شده و تا پایان روز نمونه‌برداری مربوطه، روزانه به همین ترتیب مورد مراقبت قرار گرفتند. لازم به ذکر است تزریق سیکلوسپورین و مالیدن ژل در محل گرفت بدون بیهوشی و روزانه (حدود ساعت ۸ تا ۹ صبح) انجام گرفت، همچنین محل پیوند به شکل باز نگهداری شد. ساخت ژل سیکلوسپورین توسط دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شد.

روش ساخت ژل ۰/۵٪ سیکلوسپورین

تهیه محلول تری اتانول آمین ۱۰٪ (W/V): پس از کالیبره کردن ترازو مقدار ۱۰ گرم تری اتانول آمین توزین شد و در بالون ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری با آب دیونیزه به حجم رسانده شد که در نهایت غلظت ۴۰ mg/ml حاصل شد. تهیه محلول سیکلوسپورین ۵۰۰ mg/ml: ۵۰۰ mg سیکلوسپورین A با درجه خلوص ۹۹/۷۶٪ توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین و به بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری حاوی ۶/۵ گرم کروموفور EL اضافه و با افزودن اتانول (۲/۳ میلی لیتر) و استفاده از سونیکاتور (جهت حل کردن) محلول یکنواخت با غلظت ۵۰ mg/ml بدست آمد. وزن خالص محلول به کمک ترازو و انجام محاسبات لازم برابر ۹/۵ گرم تعیین گردید.

۷۵۰ میلی گرم پودر کربومر توزین و به ۷۰ میلی لیتر آب دیونیزه موجود در یک بشر کم کم اضافه و توسط سیستم استیرر (هیتر همزن) به هم زده شد تا محلول کلوییدی یکنواختی حاصل گردد. سپس ۹/۵ گرم محلول ۵۰ mg/ml سیکلوسپورین (حاوی ۵۰۰ میلی گرم ماده موثره) به آهستگی اضافه و به هم زده شد تا به طور یکنواخت پراکنده شود. آن گاه مقدار کافی از محلول تری اتانول مین ۱۰٪ لازم تا رسیدن pH به ۸/۰±۰/۱۰ و ایجاد ژل یکنواخت اضافه شد. در پایان مقدار کافی از آب دیونیزه اضافه شد تا وزن کل فرآورده به ۱۰۰ گرم برسد و هم زدن تا ایجاد ژل یکنواخت ادامه داده شد.

در پایان روزهای ۳، ۷ و ۱۵ (۱۱) به منظور بررسی‌های آسیب‌شناختی، بافت پیوندی پوست به همراه قسمتی از بستر پیوند توسط تیغ جراحی برداشته شد، سپس موش‌ها معدوم گردیدند. نمونه‌های اخذ شده با سرم فیزیولوژی شستشو و سپس در فرمالین ۱۰٪ پایدار شدند (در ۲۴ ساعت اول فرمالین تعویض گردید). سپس در آزمایشگاه بافت‌شناسی، مراحل آماده‌سازی بافتی انجام و بعد از برش زدن (با ضخامت ۵ میکرونی)، آماده رنگ‌آمیزی اختصاصی هماتوکسلین - ائوزین شدند. در مطالعه ریزینی روند پذیرش بافت پیوندی با در نظر گرفتن ضمام پوست پیوندی (عروق درم، حجم کلاژن و نحوه قرارگیری آنها) انجام گردید.

درجه‌بندی آسیب‌شناختی

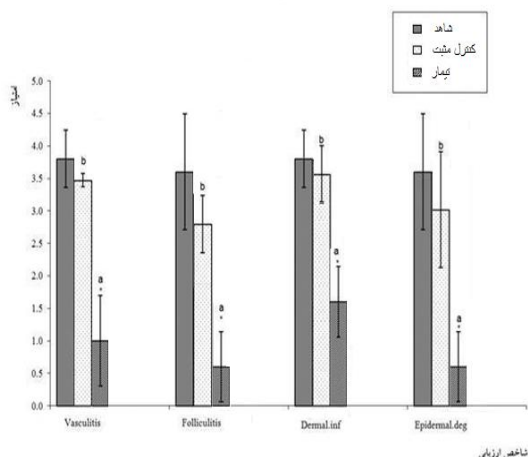
یافته‌های میکروسکوپی با شمارش سلول‌های نکروتیک و شدت حضور لکوسیت‌ها در اپیدرم، میزان و شدت التهاب درم و عروق ناحیه پیوندی مطابق جدول ۱ ارزیابی و درجه‌بندی گردید (۲۱).

جدول ۱- درجه‌بندی آسیب‌شناسی رد پیوند حاد

تغییرات دژنراتیو اپیدرم	التهاب پوست	التهاب فولیکول	التهاب عروق	درجه آسیب‌شناسی
هیچ	هیچ	هیچ	هیچ	۰
هیچ / ملایم	ملایم	هیچ / ملایم	هیچ / ملایم	۱
ملایم	متوسط / ملایم	متوسط / ملایم	متوسط / کانونی	۲
متوسط *	متوسط	متوسط	متوسط / منتشر	۳
شدید / نکروز	شدید / نکروز	شدید / نکروز	شدید / نکروز	۴

* نکروز کانونی ممکن است وجود داشته باشد.

روش آنالیز آماری داده‌های به دست آمده از مطالعات آسیب‌شناسی بافت به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۷ و آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (kruskalwallis) در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ از لحاظ آماری مورد واکاوی قرار گرفت.



نمودار ۲- نمودار مربوط به روز هفتم

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. a,b حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

ج- نتایج آماری حاصل از بررسی آسیب‌شناختی در روز پانزدهم

در روز ۱۵ همه پوست‌های پیوندی غیر از موش‌های گروه سیکلوسپورین تزریقی رد پیوند شدند. لذا نمونه روز ۱۵ در مورد پارامترهای مورد ارزیابی نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نیست.

د- نتایج حاصل از بررسی‌های هیستوپاتولوژی

روز سوم

در نمونه‌های گروه شاهد پوست پیوند شده التهاب مشاهده گردید و سطح پوست زخم بود. بافت جوانه گوشتی مشاهده گردید و دستجات کلاژن اولیه و مواج بودند.

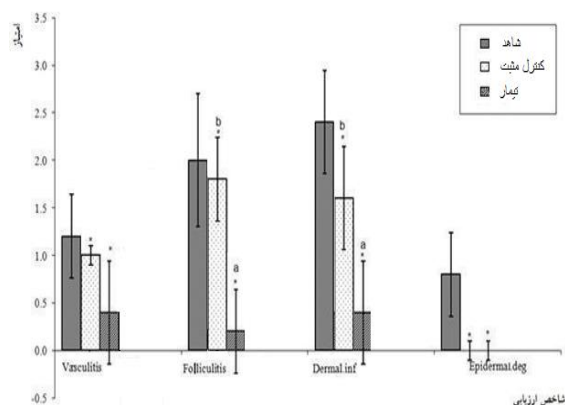
در نمونه‌های گروه کنترل مثبت لبه پیوندی با وجود التهاب و ادم روند ترمیمی خوبی داشته و ادم و ارتشاح سلول‌های آماسی چند هسته‌ای زیاد نبود. اپیدرم و ضمام پوستی کمی تحلیل رفته ولی یکپارچگی خود را حفظ کرده بود.

نتایج الف- نتایج آماری حاصل از بررسی آسیب‌شناختی در روز سوم

نتایج الف- نتایج آماری حاصل از بررسی آسیب‌شناختی در روز سوم

در مشاهدات ریزینی گروه کنترل مثبت سیکلوسپورین و در گروه تیمار ژل سیکلوسپورین، موجب کاهش معنی‌دار $p < 0/05$ میزان واسکولیت، فولیکولیتیس، التهاب درم و دژنره شدن اپیدرم در روز سوم بعد از پیوند در مقایسه با گروه کنترل شده بود (نمودار ۱).

در مشاهدات ریزینی گروه کنترل مثبت سیکلوسپورین و در گروه تیمار ژل سیکلوسپورین، موجب کاهش معنی‌دار $p < 0/05$ میزان واسکولیت، فولیکولیتیس، التهاب درم و دژنره شدن اپیدرم در روز سوم بعد از پیوند در مقایسه با گروه کنترل شده بود (نمودار ۱).



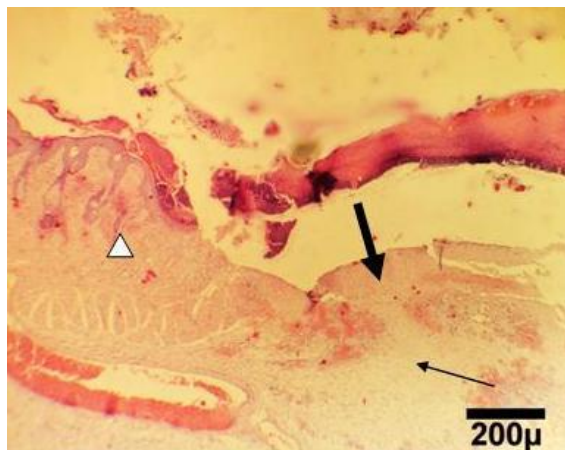
نمودار ۱- نمودار مربوط به روز سوم

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. a,b حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

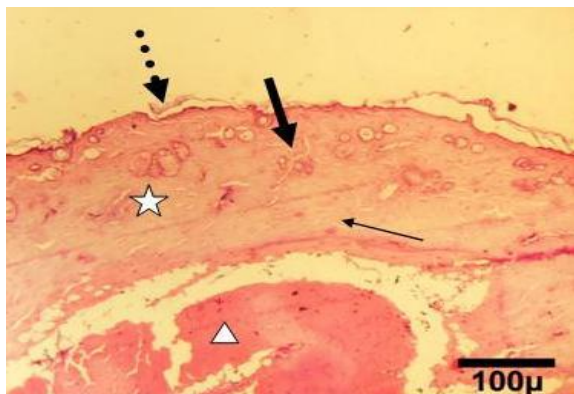
ب- نتایج آماری حاصل از بررسی آسیب‌شناختی در روز هفتم

در مشاهدات ریزینی گروه کنترل مثبت سیکلوسپورین و در گروه تیمار ژل سیکلوسپورین موجب کاهش معنی‌دار

نشد. باندهای کلاژن کاملاً سازمان یافته بودند (نگاره‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲).



نگاره ۴- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه شاهد در روز سوم پس از پیوند. اثری از پوست پیوندی در مقایسه با پوست گیرنده (مثلث) نیست و سطح پیوند شده دچار التهاب و خونریزی است. لبه پیوندی بدلیل التهاب و نکروز زخم شده است. اپیدرم و ضمامم (فلش قطور) بکلی نابود شده و عروق درم خونریزی دارد. بافت جوانه گوشتی در حال ترمیم محل است. دستجات کلاژن (فلش نازک) اولیه و موج هستند (H&E).



نگاره ۵- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه سیکلوسپورین تزریقی در روز سوم پس از پیوند. در پوست پیوندی (ستاره) اپیدرم (فلش منقطع) و ضمامم (فلش قطور) طبیعی و فاقد سلول‌های التهابی است. دستجات کلاژن (فلش نازک) دژنره نشده و حالت طبیعی دارد (H&E).

در نمونه‌های گروه تیمار پوست پیوندی چهره بافتی مطلوبی در کنار پوست گیرنده داشت. پری فولیکولیت و پری واسکولیت کمی به چشم می‌خورد. دستجات کلاژن طبیعی بود (نگاره‌های ۴، ۵ و ۶).

روز هفتم

در نمونه‌های گروه شاهد سطح پیوند شده دارای التهاب چرکی و واسکولیت شدید همراه با دژنره شدن رشته‌های کلاژن التهاب و خونریزی بود. لبه پیوندی بدلیل التهاب و نکروز زخم شده بود. اپیدرم و ضمامم پوستی ملتهب شده و سطح پوست زخم بود. بافت جوانه گوشتی مشاهده گردید. دستجات کلاژن اولیه و موج بودند.

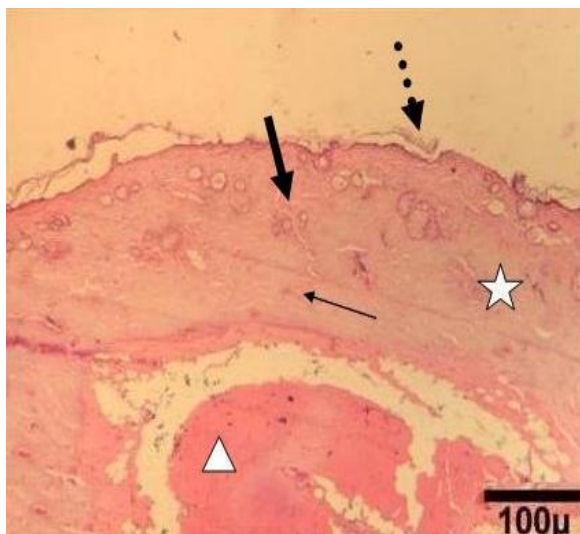
در نمونه‌های گروه کنترل اپیدرم طبیعی عروق درم بدون التهاب بود. دستجات کلاژن دارای حالت طبیعی و فاقد سلول‌های التهابی در دیواره بود. دستجات کلاژن دژنره نشده و حالت طبیعی داشت.

در نمونه‌های گروه درمان پوست پیوندی چهره بافتی مطلوبی در مقایسه با پوست گیرنده داشت. لبه پیوندی التهاب و ادم متوسطی داشت ولی روند ترمیم خوب بود و سلول‌های آماسی چند هسته‌ای زیاد نبودند. اپیدرم و ضمامم پوستی کمی تحلیل رفته ولی یکپارچگی خود را حفظ کرده بودند. پری فولیکولیت و پری واسکولیت ناچیز بود. دستجات کلاژن کمی دژنره شده و ائوزینوفیلیک تر از حالت طبیعی بود (نگاره‌های ۷، ۸ و ۹).

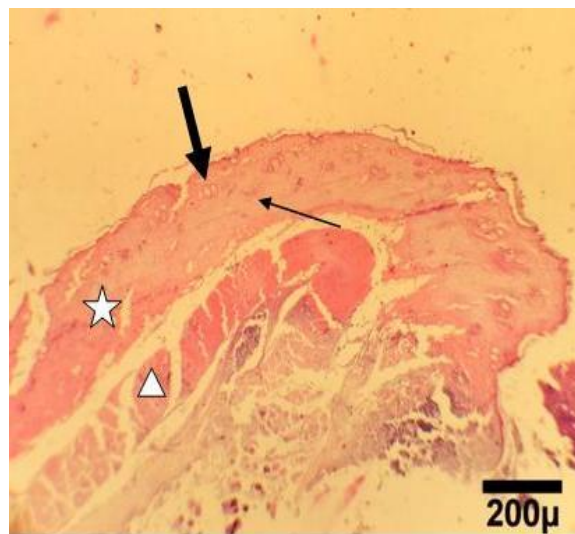
روز پانزدهم

در نمونه‌های گروه شاهد و درمان اثری از پوست پیوندی نبود. محل پیوند به جای پوست پیوندی فقط سطح زخم در حال ترمیم را نشان میداد. عروق تازه تشکیل زیاد بوده و دستجات کلاژن قطور بودند. روند ترمیم مطلوب نبوده و اپیتلیوم نازک شده بود.

در نمونه‌های گروه کنترل مثبت‌روند ترمیم بهتری وجود داشت و عروق ناچیزی بدون واسکولیت مشاهده شد. اپیدرم به حالت طبیعی رسیده و هیچ‌گونه تغییرات دژنراتیو و نکروز مشاهده



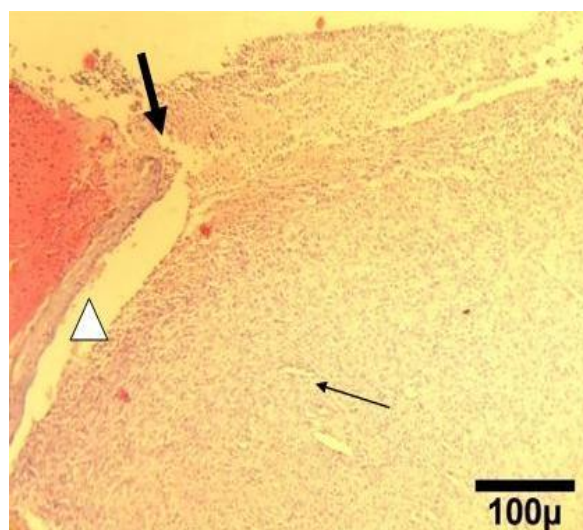
نگاره ۸- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه سیکلوسپورین تزریقی در روز هفتم پس از پیوند. در پوست پیوندی (ستاره) اپیدرم (فلش منقطع) و ضمام پوست (فلش قطور) طبیعی و فاقد سلول‌های التهابی است. دستجات کلاژن (فلش نازک) دژنره نشده و حالت طبیعی دارد (H&E).



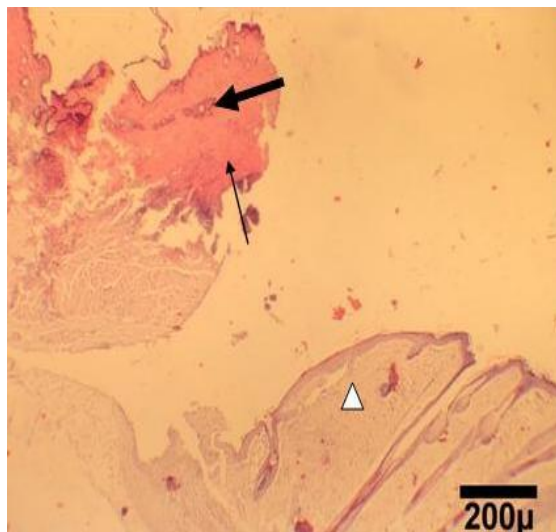
نگاره ۶- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه تیمار با ژل سیکلوسپورین در روز سوم پس از پیوند. پوست پیوندی (ستاره) چهره بافتی مطلوبی در مقایسه با پوست گیرنده (مثلث) دارد. ضمام پوست پیوندی (فلش قطور) ظاهر بافتی مطلوبی دارد. اپیدرم سالم است و عروق درم التهاب ندارد. دستجات کلاژن (فلش نازک) دارای حالت طبیعی است (H&E).



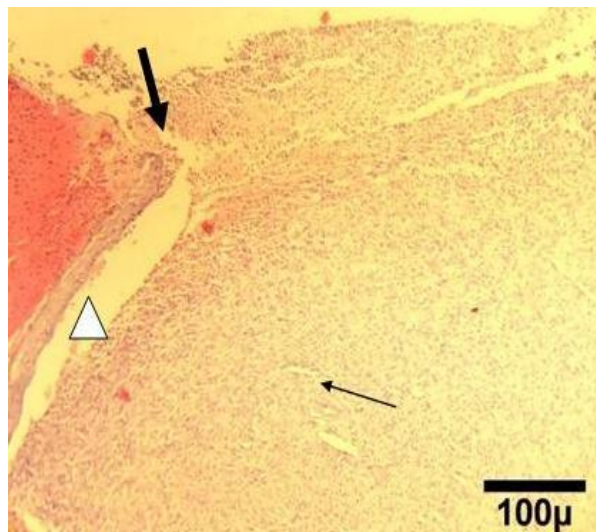
نگاره ۹- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه تیمار با ژل سیکلوسپورین در روز هفتم پس از پیوند. ضمام پوست پیوندی (فلش قطور) تعداد و ظاهر بافتی مطلوبی دارد. اپیدرم سالم است و عروق درم التهاب ندارد. دستجات کلاژن (فلش نازک) طبیعی است (H&E).



نگاره ۷- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه شاهد در روز هفتم پس از پیوند. اثری از پوست پیوندی در کنار پوست گیرنده (مثلث) نیست. محل پیوند (فلش قطور) بجای پوست سطح زخم در حال ترمیم را نشان می‌دهد. عروق تازه تشکیل و دستجات کلاژن اولیه و موج است. بافت جوانه گوشتی (فلش نازک) دیده می‌شود (H&E).



نگاره ۱۲- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه تیمار با ژل سیکلوسپورین در روز پانزدهم پس از پیوند. پوست پیوندی چهره بافتی مطلوبی در مقایسه با پوست گیرنده (مثلت) ندارد. لبه پیوندی بدلیل التهاب و ادم برگشته است. اپیدرم و ضمام (فلش قطور) تحلیل رفته و عروق درم التهاب کمی دارد دستجات کلاژن (فلش نازک) دژنره شده و اتوزینوفیلیک تر از حالت طبیعی است (H&E).

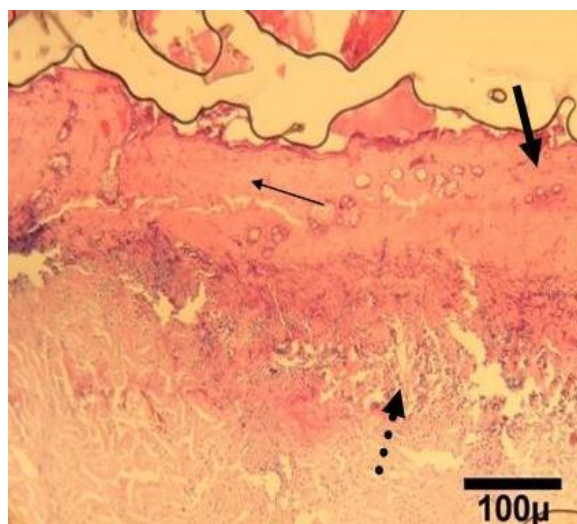


نگاره ۱۰- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه شاهد در روز پانزدهم پس از پیوند. اثری از پوست پیوندی در کنار پوست گیرنده (مثلت) نیست. محل پیوند (فلش قطور) بجای پوست سطح زخمی در حال ترمیم را نشان میدهد. عروق تازه تشکیل و دستجات کلاژن اولیه و موج بیانگر بافت جوانه گوشتی (فلش نازک) دیده می شود (H&E).

بحث

در تحقیقات گذشته مناسب ترین دوز سیکلوسپورین که بتواند با موفقیت سیستم ایمنی را سرکوب و همچنین از عوارض سمی دارو جلوگیری نماید، بسته به مدت زمان بعد از پیوند، متفاوت گزارش شده است (۳).

برای روشن شدن چگونگی مکانیسم جذب سلولی سیکلوسپورین بررسی های مختلفی انجام گردیده است. مهمترین آنان نظریه چگونگی جذب دارو توسط گیرنده اختصاصی (سلول های-T) واقع در سطح خارجی سلول می باشد، که به این وسیله از غشا عبور و وارد سیتوپلاسم می گردد. در داخل سیتوپلاسم، سیکلوسپورین به گیرنده پروتئینی به نام سیکلوفیلین (که جز ترکیبات همه سلول ها بوده و از گروه ایمونوفیلین هاست) متصل می گردد. نتیجه فعالیت آنزیمی فوق تغییر ساختار فضایی ریشه های اسیدهای آمینه



نگاره ۱۱- نمای ریزبینی از بافت پوست موش در گروه سیکلوسپورین تزریقی در روز پانزدهم پس از پیوند. در پوست پیوندی اپیدرم و ضمام پوست (فلش قطور) تعداد مطلوبی داشته و سلول های التهابی کمی در دیواره دارد. دستجات کلاژن (فلش نازک) دژنره نشده و حالت طبیعی دارد. ارتشاح پلی مورف ها (فلش منقطع) بصورت منتشر دیده می شود (H&E).

استفاده از قطره چشمی سیکلوسپورین به همراه تاکرو لیموسرا برای درمان موارد شدید VKC توصیه و استفاده از این دو دارو را در طولانی مدت بدون عوارض ارزیابی کردند(۱۸). Gauss و Hornecker و همکاران در سال ۲۰۱۵ قطره ی سیکلوسپورین ۰.۲٪، ۰.۵٪ و ۰.۰۵٪ را در بیماران پیوند قرنیه استفاده کردند و هیچ اثر درمانی مشاهده نکرده و عوارض این دارو را قرمزی، خارش و احساس سوزش اعلام کردند(۱۲). Oqe' LK و همکاران در سال ۲۰۱۵ عنوان کردند برای روزاسه چشمی می‌توان از سیکلوسپورین موضعی استفاده کرد(۱۴). Yang و همکاران در سال ۲۰۱۵ مقایسه ای بین قطره چشمی ۰.۰۵٪ سیکلوسپورین و محلول ۰.۳٪ سیکلوسپورین برای درمان بیماری چشم خشک (Dry Eye) انجام دادند و اعلام کردند یک ماه پس از درمان گروه محلول سیکلوسپورین، اختلاف معنی‌داری با قطره سیکلوسپورین دارد، اگرچه بعد از ۳ ماه درمان اختلاف معنی‌داری در دو گروه مشاهده نشد(۲۰). Aoki و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که سیکلوسپورین سیستمیک می‌تواند درمان موثری برای التهاب صلیبه (Scleritis) شدید باشد(۴). در هر یک از روش‌های پیوند پوست تغییرات محل پیوند در نظر اول ممکن است دلسرد کننده باشد، چراکه تشخیص بافت پوششی مرده از پوست پیوند شده مشکل می‌باشد. از آنجا که از ارکان اصلی موفقیت در پیوند پوست رعایت شرایط آسپسی هنگام عمل استلذادر بررسی حاضر به این نکته توجه فراوان شد. بر اساس نتایج حاصل در روزهای نمونه برداری مشخص گردید استفاده از ژل سیکلوسپورین در روز ۳ و ۷ بعد از پیوند باعث اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل شده است و از ژل سیکلوسپورین در تکنیک پیوند آزاد پوست میتوان بهره جست. نتایج در روز ۱۵ پس از پیوند نشان می‌دهد که استفاده از ژل سیکلوسپورین به تنهایی مانع از رد پیوند پوست نمی‌شود. یکی از چالش‌های پیش رو در این مطالعه، علاوه بر عدم امکانات ساخت ژل سیکلوسپورین توسط کارخانه‌های

پرولین موجود در پروتئین است که برای عملکرد بیوستز پروتئین‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است(۲). Wassef و همکاران در سال ۱۹۸۵ روش‌های مختلف تجویز سیکلوسپورین و دوزهای آن را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند سیکلوسپورین با روش‌های زیر جلدی، داخل عضلانی و داخل وریدی می‌تواند به غلظت مناسب در پلاسما برسد و همچنین در تجویز SC علاوه بر آسان بودن روش استفاده، غلظت پایداری را طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق در پلاسما ایجاد می‌کند(۱۹). Midha و همکاران در سال ۱۹۹۲ سیکلوسپورین خوراکی را به صورت محلول تهیه و روش تزریق SC و خوراکی سیکلوسپورین را مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که غلظت سیکلوسپورین خون در هر دو گروه مساوی است(۱۳).

Bourges JL و همکاران با مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ انجام دادند نشان داده‌که استفاده از سیکلوسپورین موضعی به شکل قطره چشمی می‌تواند به اندازه‌ی استفاده از سیکلوسپورین تزریقی با دوز ۱۰ mg/kg/day در جلوگیری از رد پیوند حاد قرنیه مؤثر باشد(۶). Ebihara N. و همکاران در سال ۲۰۰۹ روی محلول چشمی ۰.۱٪ سیکلوسپورین نوظهور برای درمان آلرژی‌های التهاب‌های ملتحمه کار کردند و علائم بیماری به طرز معنی‌داری از یک تا شش ماه کاهش پیدا کرد به طوری که در ۳۰٪ بیماران استفاده موضعی از استروئیدها قطع شد(۱۰). Pucci N و همکاران در سال ۲۰۱۰ تأثیر قطره‌ی چشمی سیکلوسپورین ۱٪ و ۲٪ را در ۱۵۶ کودک مبتلا به VKC (vernal keratoconjunctivitis) بررسی کردند و ضمن عدم تغییر در عملکردهای کبد، کلیه و آنزیم‌های کبدی، تأثیر و ایمنی قطره ی سیکلوسپورین رادر استفاده طولانی مدت (۷-۲ سال) تایید کردند(۱۵). Sinha و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر قطره ی چشمی سیکلوسپورین ۲٪ را در جلوگیری از رد پیوند در جراحی پیوند قرنیه بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مانع از رد پیوند نمی‌شود(۱۶). Vich و همکاران در سال ۲۰۱۳

- host disease induced by cyclosporine-a reappraisal. 46(2 Suppl):107S-112S.
8. Citterio, F. (2004) Evolution of the therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant. Proc.* 36(2 Suppl):420S-425S.
 9. Colombo, D., Ammirati, E. (2011) Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 25(4): 493-504.
 10. Ebihara, N., Ohashi, Y., Uchio, E., Okamoto, S., Kumagai, N., Shoji, J., Takamura, E., Nakagawa, Y., Nanba, K., Fukushima, A., Fujishima, H. (2009) A large prospective observational study of novel cyclosporine 0.1% aqueous ophthalmic solution in the treatment of severe allergic conjunctivitis. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 25(4):365-72.
 11. Fábio, R., Carramaschi, Gilles Landman, Rosangely C. C. Corsi, Luiz P. M. Vana and Marcus C. Ferreira. (2002) Rat allotransplantation of epigastric microsurgical flaps: A study of rejection and the immunosuppressive effect of Cyclosporin A. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.* 55 (1):21-28.
 12. KaussHornecker, M., Charles Weber, S., BrandelyPiat, ML., Darrodes, M., Jomaa, K., Chast, F. (2015) Cyclosporine eye drops: A 4-year retrospective study(2009-2013). *J. Fr. Ophtalmol.* 38(8):700-8.
 13. Midha, R., Mackinnon, SE., Evans, PJ., Best, TJ., Wong, PY. (1992) Subcutaneous injection of oral cyclosporin A solution. *Microsurgery.* 13(2):92-4.
 14. Oqe', LK., Muncie, HL., Phillips-savory, AR. (2015) Rosacea : Diagnosis and Treatment. *Am. Fam. Physician.* 92(3):187-96.
 15. Pucci, N., Caputo, R., Mori, .F, De Libero, C., Massai, C., Bernardini, R., Novembre, E. (2010) Long-term safety and efficacy of topical cyclosporine in 156 children with vernal kerato conjunctivitis. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* 23(3):865-71.
 16. Silva, HC., Coletta, RD., Jorge, J., Bolzani, G., de Almeida, OP., Graner, E. (2001) The effect of cyclosporin A on the activity of matrix metalloproteinases during the healing of rat molar extraction wounds. *Arch. Oral. Biol.* 46(9):875-9.
- داروسازی، هزینه‌ی بالای تولید ژل سیکلوسپورین با توجه به قیمت گزاف ماده موثره ی سیکلوسپورین بود.
- با نتایج متفاوت و چالش‌هایی که این آزمایشات به ما نشان می‌دهند، شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که می‌توان از ژل سیکلوسپورین در پیوندهای پوستی استفاده کرد ولی برای پذیرش موثر و قابل اطمینان پیوند پوست بایستی از ژل به همراه سایر داروهای ایمنوساپرسیو به صورت ترکیبی استفاده کرد.
- ### فهرست منابع
۱. بهار، م.ع. (۱۳۹۰): کتاب ایمنولوژی کوبای. چاپ. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران: ۸۰۰-۸۰۸.
 ۲. خرازی، ه.، خوش سرور، غ. (۱۳۷۸): اهمیت تعیین دوز درمانی سیکلوسپورین - آ پس از جراحی پیوند اعضا. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان: ۶ (۳): ۱۷۳-۱۸۳.
 ۳. خرازی، ه.، عباسی، م.ر.، رئیسی، د. (۱۳۸۴): رابطه سطح خونی سیکلوسپورین - آ با دوز تجویزی دارو در بیماران مرکز پیوند کلیه استان کرمانشاه. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان: ۱۶۵-۱۷۳ (۳): ۱۲.
 4. Aoki, H., Hiraoka, K., Hashimoto, M., Ohquro, H. (2015) Systemic Cyclosporine Therapy for Scleritis : A Proposal of a Novel System to Assess the Acticity of Scleritis. *Case. Rep. Ophthalmol.* 6(2):149-57.
 5. Bain, JR., Mackinnon, SE., Hudson, AR., Wade, J., Evans, P., Makino, A., Hunter, D. (1992) The peripheral nerve allograft in the primate immunosuppressed with cyclosporine A: I. Histologic and electrophysiologic assessment. *Plast. Reconstr. Surg.* 90(6):1036-46.
 6. Bourges, JL., Lallemand, F., Agla, E., Besseghir, K., Dumont, JM., BenEzra, D., Gurny, R., Behar-Cohen, F. (2006) Evaluation of a topical cyclosporine A prodrug on corneal graft rejection in rats. *Mol. Vis.* 2;12:1461-6.
 7. Chow, LH., Mosbach-Ozmen, L., Ryffel, B., Borel, JF. (1988): Syngeneic graft-versus-

17. Sinha, R., Jhanji, V., Verma, K., Sharma, N., Biswas, NR., Vajpayee, RB. (2010) Efficacy of topical cyclosporine A 2% in prevention of graft rejection in high-risk keratoplasty: a randomized controlled trial. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 248(8):1167-72.
18. Vichyanond, P., Kosrirukvongs, P. (2013) Use of cyclosporine A and tacrolimus in treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.* 13(3):308-14.
19. Wassef R, Cohen Z, Langer B. (1985). Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation.* 40(5):489-93.
20. Yang, JM., Choi, W., Kim, N., Yoon, KC. (2015) Comparison of Topical Cyclosporine and Diquafosol Treatment in Dry Eye. *Optom. Vis. Sci.* 92(9):e296-302.
21. Zdichavsky, M., Jones, JW., Ustuner, T., Ren, X., Edelstein, J., Maldonado, C., Breidenbach, W., Gruber, SA. Ray, M. and Barker, JH. (1999) Scoring of Skin Rejection in a Swine Composite Tissue Allograft Model. *Journal of Surgical Research.* VOL. 85.NO 1. 1- 8.

