ORIGINAL ARTICLE

Effect of IGF-1 Gene Therapy in Acute Cutaneous Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Fereshteh Beygom Talebpour Amiri[1],
Mahnaz Mahmoudirad[2],
Mehri Mirhoseini[3],
Mansoureh Mirzaei[4]

[1] Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Skin Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Amol Faculty of Nursing & Midwifery, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MSc in Anatomy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 19, 2014 ; Accepted September 17, 2014)

Abstract

Background and purpose: Delayed wound healing is a common complication of diabetes mellitus. However, less is known about the cause of this pathology. Types of skin cells, extracellular matrix and variety of growth factors are involved in wound healing. The use of recombinant growth factors in researches and production of skin substitutes are still a challenge. Much research has been done on the effects of gene therapy and cell therapy in wound healing. This experimental study assessed the effect of insulin-like growth factor (IGF-1) over expression in combination with fibroblast cells therapy to diabetic wounds in rats.

Material and methods: Diabetes was induced in rats using Streptozotocin. Fibroblasts were cultured and transfected with IGF-1. Lipofectamine 2000 was used as reagent transfection and transgene expression levels were measured by ELIZA. To study the in vivo, rats (weighing 170-200g) were randomly divided into three groups (5/group) and full-thickness wounds were created on the dorsum region. Suspensions of transfected fibroblast and native fibroblast cells were injected into the wound and were compared with the wounds treated with normal saline. For microscopic examination, biopsy was performed on day 8.

Results: In in vitro, the maximum expression of IGF-1 in transfected fibroblast cells (96.95 pg/ml) was 24 h after gene transfer. In vivo, IGF-1 gene therapy increased the number of fibroblast and keratinocyte cells in wound healing process. Granulation tissue formation in transfected fibroblast and native fibroblast cells groups compared with the normal saline group were found to be more organized.

Conclusion: The expression of IGF-1 increased by optimization of gene transfer. High concentrations of IGF-1, in combination with cell therapy, had a significant effect on delayed wound healing in diabetic rats.

Keywords: IGF-1, gene therapy, Diabetic, wound healing

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 1-11 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۷ مهر سال ۱۳۹۳ (۱۱-۱)

بررسی اثر فاکتور رشد انسولینی در روند ترمیم زخم های حاد پوستی در رت های دیابتی شده به وسیله استرپتوزوتوسین

فرشته بیگم طالب پور امیری[۱]
مهناز محمودی راد[۲]
مهری میر حسینی[۳]
منصوره میرزایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: تاخیر در ترمیم زخم افراد دیابتی یک پدیده شایع است که پاتولوژی آن کم‌تر شناخته شده است. انواع سلول‌های پوستی، ماتریکس خارج سلولی و انواع فاکتورهای رشد در ترمیم زخم دخالت دارند. تحقیقات زیادی در خصوص اثرات ژن درمانی و سلول درمانی در بهبود زخم انجام شده است. در این مطالعه تجربی، اثرات انتقال سلول فیبروبلاست ترنسفکته شده با ژن IGF-1 بر روی زخم‌های دیابتیک در رت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، دیابت در موش‌های صحرایی با استرپتوزوتوسین القا شد. فیبروبلاست‌ها کشت داده شدند و با IGF-1 ترنسفکته شدند. از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان معرف ترنسفکشن استفاده شد. میزان بیان IGF-1 ترنس‌ژن شده به وسیله الایزا اندازه‌گیری شد. جهت مطالعه در محیط In Vivo حیوانات (با وزن ۲۰۰-۱۷۰ گرم) به طور تصادفی به سه گروه (۵ رت/گروه) تقسیم شدند و زخم‌هایی با ضخامت کامل پوست در ناحیه پشت گردن ایجاد شد. سوسپانسیونی از سلول‌های فیبروبلاست ترنسفکته و ترنسفکته نشده به لبه زخم تزریق شد و با زخم‌های درمان شده با نرمال سالین مقایسه گردید. برای آزمایشات میکروسکوپی، بیوپسی در روز ۸ انجام شد.

یافته‌ها: در محیط آزمایشگاهی، حداکثر بیان IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست ترنسفکته (۹۶/۹۵ پیکوگرم/میکرولیتر)، ۲۴ ساعت بعد از ترنسفر ژن بود. همچنین در محیط In Vivo، ژن درمانی باعث افزایش فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها در فرایند ترمیم زخم شد. بافت گرانوله تشکیل شده در زخم‌های ترمیم شده با فیبروبلاست ترنسفکته و فیبروبلاست ترنسفکته نشده در مقایسه با گروه کنترل سازمان یافته تر بود.

استنتاج: این مطالعه نشان داد که با بهینه‌سازی انتقال ژن، بیان IGF-1 افزایش یافت و انتقال سلول فیبروبلاست ترنسفکته شده به محیط زخم، دارای اثرات قابل توجهی در بهبود زخم‌های حاد دیابتی در موش‌های صحرایی بود.

واژه های کلیدی: فاکتور رشد انسولینی، ژن درمانی، دیابتی، ترمیم زخم

مقدمه

دیابت یک بیماری متابولیک مزمن است که شیوع آن به سرعت در سرتاسر جهان رو به افزایش است و تخمین زده می‌شود که اکنون ۱۹۰ میلیون نفر در جهان به دیابت مبتلا می‌باشند و پیش‌بینی می‌شود که این تعداد

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۱- ۹۱ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: مهناز محمودی راد- تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی E-mail: mahnazrad@gmail.com
۱. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استادیار، دانشکده پرستاری و مامایی حضرت زینب آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. کارشناسی ارشد آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۱/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۲/۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۶/۱۷

تا سال ۲۰۳۰ به ۳۶۶ میلیون نفر برسد. درایران هم حدود ۸ درصد از جمعیت کشور یعنی معادل پنج و نیم میلیون نفر مبتلا به دیابت هستند و بیش از نیمی از آن‌ها از بیماری خود اطلاع ندارند(۱-۳).

یکی از عوارض جدی و خطرناک دیابت، زخم پای دیابتیک می‌باشد که ۲۵ درصد از بیماران دیابتی در طول عمرشان از آن رنج می‌برند(۴). در بیش از ۲۴-۱۴ در صد از این افراد، بیماری پیشرونده بوده و در نهایت منجر به قطع عضو می‌گردد(۵). مرگ و میر در بیماران با قطع عضو اندام‌های بزرگ ۳۱ درصد می‌باشد(۶).

بهبود زخم یک فرایند پیچیده است که شامل چهار مرحله انعقاد، التهاب، تکثیر و بازسازی است که با هم تداخل دارند(۷). اختلال در ترمیم زخم یک موضوع مهم در بیماران دیابتی است(۸). درمان‌های مناسب برای این زخم‌ها با توجه به علت زخم شامل دبریدمان پیشرفته، درمان عفونت، درمان با اکسیژن پر فشار، بای پس جراحی برای عروق دار کردن و پانسمان موضعی می‌باشد(۹). برای بهبود و تسریع ترمیم زخم‌های آزاردهنده افراد دیابتی دارو و یا درمان مشخصی وجود ندارد و عوارض ناشی از این زخم‌های پوستی مشکلات زیادی از قبیل عفونت‌های مکرر، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، قطع عضو و هزینه‌های سنگین درمان و جراحی را برای بیماران دیابتی ایجاد می‌کند(۱۱،۱۰). بنابراین پیدا کردن راه درمانی مناسب برای این بیماران توصیه می‌گردد.

ترمیم زخم‌های سطحی یک پروسه دینامیک است که انواع سلول‌های خونی، سلول پارانشیمال، ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد در آن دخالت دارند(۱۲). فیبروبلاست فراوان‌ترین سلول بافت همبنددر تمام مراحل ترمیم زخم به خصوص در فاز تکثیر، با تولید کلاژن نقش فعالی دارد(۱۴،۱۳). مورفولوژی این سلول در بیماران دیابتی تغییر یافته و کاهش در فعالیت آنها در حین ترمیم زخم دیده می‌شود(۱۶،۱۵). سلول-درمانی یکی از راه‌های جدید کلینیکی است که امروزه برای ترمیم بافت آسیب دیده به کار می‌رود. سلول-درمانی با استفاده از سلول‌های فیبروبلاست اتولوگوس و آلوژنیک یک راه درمانی برای ترمیم زخم‌های Full-Thickness پوست می‌باشد(۱۷-۱۹). فیبروبلاست به عنوان سلول پیام دهنده (signaling cell)، فاکتورهای رشد را ترشح می‌کند که برای ارتباط بین سلولی در طی فرآیند التیام نقش موثری دارد(۲۱،۲۰).

IGF-1 سیتوکینی است که توسط فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپیدرمی بیان می‌شود و نشان داده شده که در اپیتلیالیزه شدن مجدد و تشکیل بافت گرانوله در حین مراحل ترمیم زخم نقش دارد(۲۲). در پوست نرمال میزان ترشح IGF-1 در لایه گرانولوزای اپی‌درم و سلول‌های درم ناچیز است. اما ترشح آن در پوست ضایعه دیده به مقدار بیشتری می‌باشد، جایی‌که نقش مهمی در ترمیم زخم درمال و اپی‌درمال دارد. همچنین میزان IGF-1 در مایع زخم نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد(۲۳). اما میزان بیان mRNA و ترشح پروتئین IGF-1 در بیماران دیابتی و موش دیابتی کاهش می‌یابد(۲۵،۲۴،۱۵). Grazul-Bilska و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند در افراد دیابتی تکثیر سلول فیبروبلاست غیر طبیعی بوده و بیان داشتند فاکتور رشد اگزوژنوس تکثیر فیبروبلاست اندوژنوس را تحریک کرده و ترمیم زخم را تسهیل می‌کند(۲۶).

هم اکنون برای درمان بیماری‌ها از ژن‌درمانی استفاده می‌کنند و تاثیر مثبت فاکتورهای رشد بر روی تسریع تمایز و بهبود زخم‌های مزمن و حاد در افراد دیابتی و حتی غیر دیابتی یک امر ثابت شده در پزشکی مدرن می‌باشد(۲۸،۲۷). به دلیل طول عمر پایین پروتئین‌ها از جمله فاکتورهای رشد در محیط زخم(۲۹)، تزریق آن‌ها به محیط زخم تاثیر زیادی نخواهد داشت. بنابراین هدف ما در تحقیق حاضر ترنسفر ژن به سلول‌های فیبروبلاست درمال و به دنبال آن انتقال سلول‌های ترنسفکته شده به محیط زخم می‌باشد تا به این صورت افزایش بیان IGF-1 را در ترمیم زخم‌های حاد دیابتیک در محیط in vivo بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

قبل از شروع مطالعه تمام آزمایشات حیوانی توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران تایید شده است. در این مطالعه تجربی از ۱۵ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar با وزن حدود ۲۰۰-۱۷۰ گرم استفاده شد. جهت خو گرفتن با محیط آزمایشگاه برای مدت یک هفته با دمای ۲۱±۱ °C و شرایط تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته در حیوان‌خانه نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد داشتند.

حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: ۱) زخم‌هایی که با ۳×۱۰^{۵} سلول فیبروبلاست ترنسفکته درمان شدند. ۲) زخم‌هایی که با ۳×۱۰^{۵} سلول فیبروبلاست غیر ترنسفکته درمان شدند. ۳) زخم‌هایی که با نرمال سالین ۰/۹ درصد درمان شدند.

در مطالعه حاضر از استرپتوزوتوسین برای القاء دیابت استفاده شده است. استرپتوزوتوسین در آب مقطر حل و به میزان ۵۵mg/Kg پس ازتحمل ۱۲ ساعت بی‌غذایی، به صورت داخل صفاقی طی یک نوبت تزریق شد. هفت روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین،از ناحیه دم حیوان خون‌گیری انجام و میزان قند خون با دستگاه مربوطه مورد سنجش قرارگرفت و در صورتی‌که قند خون آن‌ها بالای ۲۵۰ mg/dl بود، این حیوانات دیابتی محسوب می‌شدند. در غیر اینصورت تزریق فقط یکبار دیگر تکرار می‌شد. سپس به مدت یک ماه تامل شد تا شرایط هیپرگلیسمی در آن‌ها تثبیت شود. هر هفته قند خون آنها ثبت می‌شد، در صورتی‌که قندخون آن‌ها کم‌تر از ۲۵۰ mg/dl بود، رت ها از برنامه تحقیق حذف می‌شدند. در مدتی که حیوانات دیابتی بودند، علائم مشترکی نظیر پرخوری، پرنوشی، پر ادراری و کاهش وزن را نشان دادند.

جهت تهیه و کشت سلول فیبروبلاست، بعد از القاء بیهوشی، ناحیه شکم رت تراشیده شد و پوست کاملا" ضد عفونی گردید. یک نوار کوچک از پوست با تمام ضخامت به ابعاد ۲×۲cm با یک اسکالپل برداشته شد. زخم ایجاد شده توسط گاز وازلین و پانسمان استریل پوشیده شد. نمونه در محیط کشت DMEM (Invitrogen, UK) حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین)، ضد قارچ و سرم قرار داده و به اطاق کشت منتقل شد. تمام مراحل جداسازی بافت از پوست مورد نظر زیر هود لامینار و با استفاده از مواد، معرف‌ها و وسایل استریل انجام گرفت.

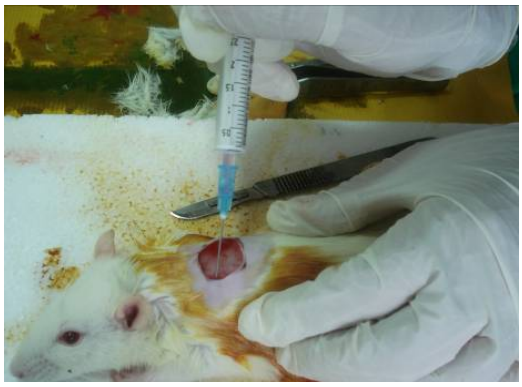
ابتدا نمونه پوست را یک بار با اتانل ۷۰ درصد و ۳ بار با PBS شستشو داده، سپس بااستفاده از Trypsin-EDTA (1X) (Gibco®) ۲۵ درصد درم از اپی درم جدا شد. درم با قیچی استریل به قطعات ۱ میلی‌متری قطعه قطعه گردید و با روش explantation در فلاسک‌های کشت ۵۰ میلی‌لیتری کشت داده و در انکیباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با ۵ درصد دی اکسیدکربن قرار داده شد. سپس محیط کشت کامل شامل محیط کشت DMEM (Gibco, Cat.No.31966021) با ۱۰ درصدسرم جنین گاوی (Invitrogen) FBS، (Sigma) L-gluamine، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، فونژیزون ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به فلاسک اضافه گردید. سپس هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض گردید. در زمانی که به هم پیوستگی کلنی‌ها به ۹۰-۸۵ درصد رسید، با تریپسینه کردن، فیبروبلاست‌ها از کف فلاسک جدا شده و پس از تهیه سوسپانسیون و سانتریفیوژ، فیبروبلاست‌ها جهت پاساژ به فلاسک های جدید منتقل شدند. سلول‌ها بعد از ۵ مرحله پاساژ در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد جهت مصرف ذخیره گردیدند.

برای ترنسفر ژن IGF-1 در این تحقیق از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان معرف ترنسفکشن استفاده شد. جهت به دست آوردن بالاترین بازده ترنسفکشن و پایین بودن سمیت (cytotoxicity) روش‌های ترنسفکشن با تغییر دانسیته سلولی، غلظت cDNA و Lipofectamine 2000 بهینه شدند. برای این منظور

فیبروبلاست‌های پاساژ ۵ با دانسیته ۴×۱۰^{۴} سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. زمانی که بهم پیوستگی کلنی‌های سلول‌های کشت داده شده به ۹۵-۸۵ درصد رسید، ترنسفکشن با دو متد مستقیم و معکوس و با نسبت‌های مختلف $(\frac{۱}{۱/۵}، \frac{۱}{۲}، \frac{۱}{۳}، \frac{۱}{۴}، \frac{۱}{۵}، \frac{۱}{۶}، \frac{۱}{۷}، \frac{۱}{۸})$ غلظت Igf1 (NM_001082477) Rat cDNA Clone (Origene, Cat No. RN200508) (در میکروگرم) به لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen-Cat. No. 11668-027) (در میکرولیتر) انجام شد. محلول ترنسفکشن در محیط کشت فاقد سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک به سلول اضافه شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه و در CO_2 ۵ درصد اینکوبه شدند و هر یک ساعت سلول‌ها زیر میکروسکوپ چک شدند. در صورت مشاهده تغییرات در مورفولوژیکی سلول‌ها، محیط ترنسفکشن توسط محیط حاوی سرم جایگزین می‌شد. محیط کشت سلول بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت آنالیز کمی پروتئین IGF-1 جمع‌آوری شد.

برای سنجش میزان پروتئین IGF-1 تولید شده توسط سلول‌های فیبروبلاست ترنسفکته شده و سلول‌های فیبروبلاست ترنسفکته نشده (کنترل) در محیط In vitro، مایع رویی کشت با روش ELISA ارزیابی گردید. برای این منظور از کیت Quantikine Eliza Mouse/Rat IGF-1 Immunoassay (Cat. No. MG100) طبق دستور شرکت سازنده استفاده شد.

برای ایجاد مدل زخم به ضخامت کامل پوست، ابتدا حیوان مورد نظردر Restrainer با تزریق داخل عضلانی Ketamine به میزان ۵۰ mg/kg و xylezine به میزان ۵ mg/kg بیهوش شدند. پس از مهار نمودن حیوان به کمک تخته جراحی، ناحیه پشت حیوان با استفاده از کلیپر تراشیده شده و به وسیله بتادین و الکل طبی سفید ۷۰ درصد ضدعفونی شد و با رعایت شرایط استریل پس از علامت‌گذاری ناحیه برش با استفاده از خط‌کش و ماژیک، به کمک اسکالپل برشی یک برش پوستی مربع شکل با ضخامت کامل پوست به ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ سانتی‌متر برش داده شد. بعد از شمارش سلول‌ها با استفاده از trypan blue exclusion test، سلول‌های فیبروبلاست ترنسفکته و ترنسفکته نشده پاساژ ۵ در دو سرنگ مجزا حاوی مدیوم با سرم و بدون آنتی‌بیوتیک به اتاق جراحی منتقل گردیدند. در روز صفر که روز جراحی است حیوانات در اتاق جراحی بیهوش شدند و بعد از ایجاد مدل زخم حاد، سلول‌های ترنسفکته و غیر ترنسفکته مجددا سوسپانسیون شده و با سرنگ به صورت intradermaly در اطراف لبه زخم در ۴ ناحیه به گروه‌های ۱ و ۲ تزریق شد و در گروه ۳ هم حجم آن نرمال سالین دریافت کردند (تصویر شماره ۱). بعد از عمل موش‌ها به صورت جداگانه در قفس نگهداری شدند.



تصویر شماره ۱: تزریق سوسپانسیون سلولی به داخل لبه زخم

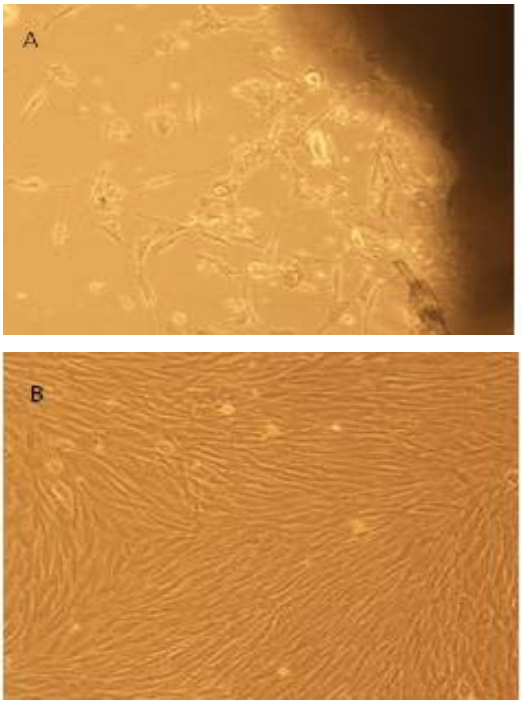
جهت مطالعات بافت شناسی با برداشتن نوار کوچکی از پوست حاوی بخشی از منطقه زخم و منطقه سالم (unwound) تهیه شد. سپس نمونه‌ها را در بافر پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس کرده و پس از ثبوت بافت مراحل آماده‌سازی به وسیله دستگاه اتوتکنیکون به صورت خودکار انجام شد. پس از قالب‌گیری با پارافین برش‌های سریال به ضخامت ۵میکرومتر با فاصله ۱۵ میکرومتر تهیه شد و رنگ‌آمیزی لام‌ها با استفاده از رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین انجام گردید. ملاک‌های ارزیابی ترمیم بافت که شامل اپی‌تلیالیزه شدن، میانگین کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها و شدت التهاب می‌باشد، توسط پاتولوژیست به صورت Blind بررسی گردید.

داده‌های کمی گروه‌های شاهد و تجربی با نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۵ ارزیابی شد و تمام داده‌ها با تست‌های ANOVA، One-Way ANOVA و Tukey بیان شد. تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها تجزیه و تحلیل شدند. اختلاف میانگین بین گروه‌ها تعیین شد و $p<۰/۰۵$ معنادار محسوب شد.

یافته ها

۱- یافته‌های کشت سلول فیبروبلاست:

بعد از جداسازی بخشی از درم ناحیهٔ شکم رت و سپس کاشت آن در فلاسک به روش Explantation، فیبروبلاست‌ها به صورت شعاعی در اطراف درم کاشته شده رشد کردند و این رشد در ۷۲ ساعت اولیه بعد از کشت قابل مشاهده بود (تصویر شماره ۲-A). سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده تکثیر یافته و بعد از ۱۹ روز به هم پیوستگی کلنی‌ها به ۹۵-۹۰ درصد رسیدند (تصویر شماره ۲-B).



تصویر شماره ۲: A) رشد فیبروبلاست‌ها در اطراف درم کاشته شده بعد از گذشت ۷۲ ساعت (بزرگنمایی ۱۰۰×) –B) فیبروبلاست های کشت داده شده بعد از ۱۹ روز (بزرگنمایی ۱۰۰×)

۲- بهینه سازی ترنسفر ژن در محیط in vitro به سلول فیبروبلاست رت Optimization of in vitro gene transfer to rat fibroblast

در تحقیق حاضر برای بهینه‌سازی روش ترنسفکشن از غلظت‌های مختلف معرف ترنسفکشن از دو روش مستقیم و معکوس استفاده شد. نتایج نشان داد بیان IGF-1 در روش معکوس بیشتر از روش مستقیم بود.

استفاده از ۰/۲ میکروگرم از IGF-1 با ۱ میکرولیتر از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در پلیت ۹۶ خانه و با استفاده از متد معکوس بعد از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌دار در بیان فیبروبلاست‌های ترنسفکته، تقریبا ۵/۷ برابری (۱/۱۲± ۹۶/۹۵ پیکوگرم/ میلی‌لیتر)، در مقایسه با گروه کنترل (۱/۷۶±۱۶/۹ پیکوگرم/ میلی‌لیتر) داشت. در حالی‌که در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترنسفکشن، این میزان به تدریج کاهش یافته است (به ترتیب ۳/۴ برابر و ۱/۳ برابر در مقایسه با گروه کنترل) (تصویر شماره ۳).

نمودار شماره ۱: آنالیز کمی میزان پروتیین IGF1 در محیط In vitro در سلول‌های فیبروبلاست ترنسفکته شده نسبت به سلول‌های ترنسفکته نشده (گروه کنترل) به روش ترنسفکشن معکوس در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترنسفکشن در محیط آزمایشگاهی

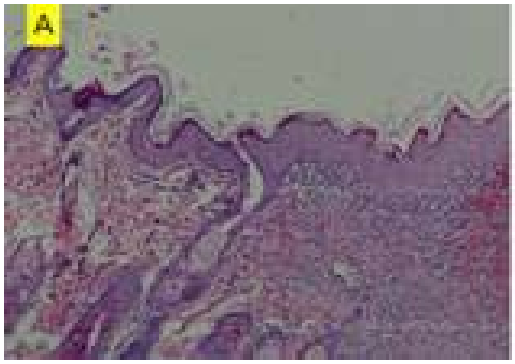
۳- یافته‌های ماکروسکوپیک

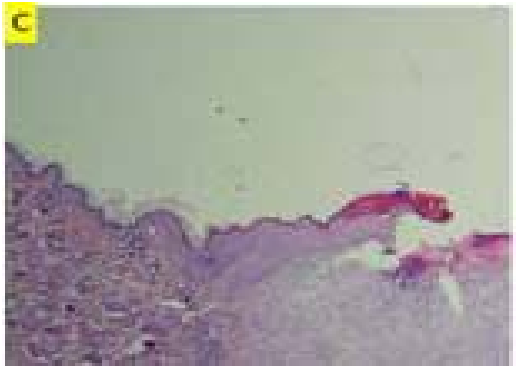
۲۴ ساعت بعد از ترنسفکشن سلول‌ها، سوسپانسیون حاوی سلول‌های Native و ترنسفکته شده به روی زخم‌های تمام ضخامت منتقل شدند. به هم پیوستگی لبهٔ بریدگی و تراکم و تغلیظ محتویات و خشکی زخم از اواخر روز دوم در گروه تجربی قابل مشاهده بود. در حالی‌که در گروه کنترل این مشخصات در اواخر روز سوم قابل مشاهده بود. هنگام بیوپسی از محل زخم‌های ترمیم یافته به‌منظور بررسی بافت‌شناسی، بافت فیبروزه با قوام غیرطبیعی و سفت در زخم گروه شاهد به خوبی قابل مشاهده بود.

۴- یافته میکروسکوپی

۸ روز بعد از عمل، بیوپسی از محل زخم رت‌ها انجام شد. تأثیر سلول درمانی و ژن درمانی روی

شاخص‌های کمی ترمیم زخم به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است و ارزیابی هیستوپاتولوژیکی از بیوپسی زخم نشان داده است اپیتلیالیزیشن زخم در گروه تجربی تقریبا به‌طور کامل بدون علایم کلینیکی، التهابی یا نقص اپی‌تلیالی صورت گرفت. ارزیابی میکروسکوپ نوری نشان داد ضخامت اپی‌درم در گروهی که فیبروبلاست ترنسفکته دریافت کردند با ۱/۶۴±۷۴/۲ میکرومتر افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل با ۱/۹۴±۴۴/۴ میکرومتر دارند (p=۰/۰۰۰). به علاوه در این گروه بافت گرانوله، متراکم تر، فیبروزه تر و با التهاب کم‌تر بود (تصویر شماره ۳. A). در زخم‌هایی که سلول Native دریافت کردند، اپی‌تلیوم تازه تشکیل شده در مقایسه با زخم‌هایی که سلول ترنسفکته دریافت کردند، کم‌تر سازمان یافته است (تصویر شماره ۳. B). در زخم‌هایی که نرمال سالین دریافت کردند تعداد سلول‌های لنفوسیت افزایش معنی داری در مقایسه با گروهی که فیبروبلاست ترنسفکته دریافت کردند داشتند (p=۰/۰۰۰) (تصویر شماره ۳. C). همچنین در گروه کنترل شدت التهاب نسبت به گروه تجربی بیش‌تر بود.





تصویر شماره ۳: تصویری از ناحیه زخم به همراه بخشی از پوست سالم ۸ روز بعد از جراحی. A) ساختمان بافتی زخم درمان شده با فیبروبلاست ترنسفکته B) ساختمان بافتی زخم درمان شده با فیبروبلاست ترنسفکته نشدهC) ساختمان بافتی زخم درمان شده با نرمال سالین (رنگ آمیزی H&E، با بزرگنمایی ۱۰×۴)

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از آنالیز آماری (One-way ANOVA, Tukey) فاکتورهای شمارش شده در ناحیه زخم رت های دیابتی بر اساس MEAN±SEM در روز هشتم. میزان شاخص های کمی زخم در سه گروه: A) زخم های درمان شده با فیبروبلاست ترنسفکته (n=5)، B) زخم های درمان شده با فیبروبلاست ترنسفکته نشده (n=5)، C) زخم های درمان شده با نرمال سالین (n=5)

گروه ها	پهنای اپی درم (میکرومتر)	فیبروبلاست ×۱۰۰۰	کراتینوسیت ×۱۰۰۰	لنفوسیت ×۱۰۰۰
A	۱/۶۴±۷۴/۲	۱/۷۸±۳۴/۸	۰/۸۳±۳۷/۸	۱/۵۱±۳۲/۶
B	۴/۳۹±۸۶/۶	۱/۱۴±۳۰/۴	۲/۹۶±۳۱/۶	۱/۱۴±۳۵/۶
C	۱/۹۴±۴۴/۴	۱/۵۱±۲۴/۶	۱/۴۸±۲۴/۸	۳/۵۶±۴۰/۸
A & B	p=۰/۹۷۶	p=۰/۰۱۶	p=۰/۰۰۵	p=۰/۴۹۶
A & C	p=۰/۰۰۰	p=۰/۰۰۰	p=۰/۰۰۰	p=۰/۰۰۰
B & C	p=۰/۰۰۰	p=۰/۰۰۰	p=۰/۰۰۱	p=۰/۰۱۱

بحث

سلول‌های فیبروبلاست نقش مهمی درفاز تکثیر

بهبود زخم حاد دارند. آن‌ها به محل زخم مهاجرت کرده، کلاژن و سایر پروتئین‌های ضروری برای ماتریکس خارج سلولی را سنتز می‌کنند(۱۶). نتیجه مطالعه حاضر هم نشان داد که فیبروبلاست آلوژنیک کشت داده شده نقش مهمی در افزایش ضخامت اپی‌درم دارد.

اثرات مفید پیوند سلول‌های فیبروبلاست وکراتینوسیت به شکل سوسپانسیون در بهبود زخم اثبات شد(۱۸). سلول‌های فیبروبلاست بسیاری از سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد را تولید می‌کنند، که تکثیر و تمایز سلول‌ها را در بستر زخم تحریک می‌کنند(۳۰). فاکتورهای رشد نقش مهمی در روند بهبود زخم دارند. علاوه بر این، کاهش غلظت فاکتورهای رشد در زخم‌های دیابتی مشاهده شده است و تصور می‌شود غلظت غیرطبیعی فاکتورهای رشد در روند بهبود زخم اثر می‌گذارد(۳۱،۲۴).

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در خصوص انتقال ژن به بافت صورت گرفته است، اما همچنان برای رسیدن به غلظت‌های بالای ترانس ژن در داخل بدن دشواری‌هایی وجود دارد. این مشکل به ویژه در پوست، جهت به دست آوردن حداکثر بیان ژن- بدون ایجاد عارضه- به منظور بهبود زخم مطرح می‌باشد(۲۸). همچنین با توجه به طول عمر کوتاه فاکتورهای رشد در محیط زخم(۳۲،۲۹)، ژن درمانی به همراه سلول درمانی اهمیت دارد.

در این تحقیق، انتقال ژن nonviral را در سلول‌های فیبروبلاست آلوژنیک ارزیابی و بهینه‌سازی شد. سپس بیان IGF-1 در شرایط آزمایشگاهی اندازه‌گیری گردید. لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان یک معرف ترانسفکشن با بیان ژن بالا با cDNA مخلوط شد. cDNA/ لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بانسبت۱ به ۵ و با تراکم سلول ۴×۱۰^{۴} دارای بازدهی بالایی در ترنسفکشن است. بیان ژن IGF-1 پس از ۲۴ ساعت به ۹۶/۹۵ پیکوگرم/ میلی لیتر رسید.

مطالعات نشان داده که با ترنسفر ژن IGF-1، بیان فاکتورهای رشد و کلاژن نوع ۴ افزایش می‌یابد و اپی‌تلیالیزه شدن تسهیل می‌گردد. ژن IGF-1 برونزاد پاسخ داخل سلولی مشابه‌ای همانند ژن درونزاد دارد. IGF-1 در پلاسما (در گردش خون) نقشی در بهبود زخم ندارد، اما IGF-1 موضعی نقش بسیار موثری در روند بهبود زخم دارد(۳۳).

در این مطالعه نشان داده شد که فیبروبلاست‌های ترانسفکته باعث افزایش معنی داری در ضخامت اپی‌درم و تعداد کراتینوسیت‌ها نسبت به گروه کنترل شده‌اند. همچنین فیبروبلاست‌های غیر ترنسفکته توانستند افزایش قابل توجهی در ضخامت اپی درم وتعداد کراتینوسیت‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد کنند. هر چند این میزان کم‌تر از گروه قبل بود. مشابه این کار Jeschke و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که IGF-1، مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت را درماتریکس خارج سلولی افزایش می‌دهد(۳۴).

پیوند فیبروبلاست‌های ترنسفکته تعداد سلول‌های فیبروبلاست در ماتریکس خارج سلولی را نسبت به هر دو گروه پیوند فیبوبلاست غیر ترانسفکته و کنترل به طور معنی‌داری افزایش داده است.در دیگر مطالعات هم نشان داده شد کاهش IGF-1 در افراد دیابتی باعث اختلال در ترمیم زخم می‌شود(۱۸). همچنین Grazul-Bilska و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند تکثیر سلول فیبروبلاست در افراد دیابتی غیر طبیعی بوده و بیان داشتند فاکتور رشد برونزاد، تکثیر فیبروبلاست درونزاد را تحریک کرده و ترمیم زخم را تسهیل می‌کند(۲۶،۲۳). به نظر می‌رسد در مطالعه حاضرافزایش بیان IGF-1 سبب تحریک تکثیر فیبروبلاست درونزاد شده و باعث بهبود زخم شده است.

فاکتورهای زیادی از جمله عفونت، هیپوکسی بافتی، نکروز، اگزودا و سطوح بالای سیتوکین‌های التهابی می‌توانند در ترمیم زخم‌ها به ویژه زخم‌های دیابتی اختلال ایجاد کنند(۳۵). اساس ترمیم بر کاهش التهاب، تشکیل بافت گرانولر حیاتی و افزایش تکثیر سلولی می‌باشد. بررسی هیستوپاتولوژیک لام‌های میکروسکوپی در این مطالعه نشان داده است که

زخم‌های تحت درمان با فیبروبلاست‌های ترنسفکته و غیر ترانسفکته به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل سلول‌های التهابی کم‌تری دارند.

در مطالعه حاضر، مطالعه وسعت ضایعه و نتایج مربوط به آزمایشات میکروسکوپ یک اثرات مثبت ژن درمانی و سلول درمانی را در درمان زخم‌ها نشان داد. علاوه بر این می‌توان گفت که فیبروبلاست‌ها، همانند کراتینوسیت‌ها(۲۸)، به عنوان یک حامل موثر در انتقال ژن به محیط زخم می‌باشند. بنابراین به نظر می‌رسد IGF-1 اگزوژنوس به همراه سلول درمانی بهبود زخم را تسهیل کرده و باعث کوتاه شدن زمان بهبودی زخم می‌شود.

بسیاری از دانشمندان روش‌های مختلف برای تسریع در ترمیم زخم به کار گرفته‌اند(۱۸،۱۹،۳۶). اما هنوز یک روش ایده‌آل که به طور گسترده قابل قبول باشد وجود ندارد. سلول درمانی یک روش درمانی امیدوارکننده برای درمان زخم‌های مزمن است. اما اثرات سیستمیک و طولانی مدت سلول درمانی هنوز اثبات نشده است. برای دستیابی به نتایج ارزشمندتر آماری در ارتباط با سلول درمانی و ژن درمانی، لازم است مطالعات در حیوانات بیش‌تری انجام شود. از آن‌جا که پوست خوک از لحاظ فیزیولوژیکی به انسان شباهت بیش‌تری دارد(۳۷) و همچنین چند زخم را می‌توان در یک مدل حیوانی ایجاد کرد، در نتیجه تحقیق بر روی خوک‌ها توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و ریاست محترم مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به دلیل تأمین اعتبارات مالی پروژه و امکانات و تجهیزات مورد نیاز تشکر می‌نماییم.

References

1. Azizi F, Gouya MM, Vazirian P, Dolatshahi P, Habibian S. The diabetes prevention and control programme of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2003; 9(5-6): 1114-1121.
2. Khanolkar MP, Bain SC, Stephens JW. The diabetic foot. QJM 2008; 101(9): 685-695.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27(5):1047-1053.
4. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. JAMA 2005; 293(2): 217-28.
5. American Diabetes Association. Consensus development conference on diabetic foot wound care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts. Diabetes Care 1999; 22(8): 1354-1360.
6. Faglia E, Clerici G, Clerissi J, Gabrielli L, Losa S, Mantero M, et al. Early and five-year amputation and survival rate of diabetic patients with critical limb ischemia: data of a cohort study of 564 patients. Eur J Vasc Endovasc Surg 2006; 32(5): 484-490.
7. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet 2005; 366(9498): 1736-1743.
8. Malhotra S, Bello E, Kominsky S. Diabetic foot ulcerations: biomechanics, charcot foot, and total contact cast. Semin Vasc Surg 2012; 25(2): 66-69.
9. Apelqvist J. Diagnostics and treatment of the diabetic foot. Endocrine 2012; 41(3): 384-397.
10. Vuorisalo S, Venermo M, Lepäntalo M. Treatment of diabetic foot ulcers. J Cardiovasc Surg (Torino) 2009; 50(3): 275-291.

11. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. Lancet 2005; 366(9498): 1725-1735.
12. Kanzler MH, Gorsulowsky DC, Swanson NA.. Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. J Dermatol Surg Oncol 1986; 12(11): 1156-1164.
13. Lorenz HP. TGF-beta isoform and receptor expression during scarless wound repair. J Craniofac Surg 2001; 12(4): 387-388.
14. Cochrane CA, Shearwood C, Walker M, Bowler Ph, Knottenbelt DC. The application of a fibroblast gel contraction model to assess the cytotoxicity of topical antimicrobial agents. WOUNDS: A Compendium of Clinical Research and Practice 2003; 15(8): 265-271.
15. Yu DH, Mace KA, Hansen SL, Boudreau N, Young DM. Effects of decreased insulin-like growth factor-1 stimulation on hypoxia inducible factor 1-alpha protein synthesis and function during cutaneous repair in diabetic mice. Wound Repair Regen 2007; 15(5): 628-635.
16. Loots MA, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, 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(2-3): 93-99.
17. Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. Diabetes 2001; 50(7): 1627-1635.
18. Velander P, Theopold C, Bleiziffer O, Bergmann J, Svensson H, Feng Y, et al. Cell suspensions of autologous keratinocytes or autologous fibroblasts accelerate the healing of full thickness skin wounds in a diabetic porcine wound healing model. J Surg Res 2009; 157(1): 14-20.
19. Vranckx JJ, Hoeller D, Velander PE, Theopold CF, Petrie N, Takedo A, et al. Cell suspension cultures of allogenic keratinocytes are efficient carriers for ex vivo gene transfer and accelerate the healing of full-thickness skin wounds by overexpression of human epidermal growth factor. Wound Repair Regen 2007; 15(5): 657-664.
20. Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. J Dermatol Sci 2000; 24(Suppl 1): S70-77.
21. Mansbridge JN, Liu K, Pinney RE, Patch R, Ratcliffe A, Naughton GK. Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. Diabetes Obes Metab 1999; 1(5): 265-279.
22. Singer AJ, Clark RA.. Cutaneous wound healing. N Engl J Med 1999; 341(10): 738-746.
23. Todorović V, Peško P, Micev M, Bjelović M, Budeč M, Mićić M, et al. Insulin-like growth factor-I in wound healing of rat skin. Regul Pept 2008; 150(1-3): 7-13.
24. Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. Diabet Med 2006; 23(6): 594-608.
25. Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. Clin Plast Surg 2003; 30(1): 37-45.
26. Grazul-Bilska AT, Luthra G, Reynolds LP, Bilski JJ, Johnson ML, Adbullah SA, et al. Effects of basic fibroblast growth factor (FGF-2) on proliferation of human skin fibroblasts in type II diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2002; 110(4): 176-181.
27. Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. BMC Cell Biol 2009; 10: 1.

28. Hirsch T, Spielmann M, Velander P, Zuhaili B, Bleiziffer O, Fossum M, et al. Insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation in diabetic wounds. J Gene Med 2008; 10(11): 1247-1252.
29. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84(21): 7696-7700.
30. Streit M, Braathen LR. Apligraf--a living human skin equivalent for the treatment of chronic wounds. Int J Artif Organs 2000; 23(12): 831-833.
31. Bitar MS, Al-Mulla F. ROS constitute a convergence nexus in the development of IGF1 resistance and impaired wound healing in a rat model of type 2 diabetes. Dis Model Mech 2012; 5(3): 375-388.
32. Cross SE, Roberts MS. Defining a model to predict the distribution of topically applied growth factors and other solutes in excisional full-thickness wounds. J Invest Dermatol 1999; 112(1): 36-41.
33. Jeschke MG, Schubert T, Krickhahn M, Polykandriotis E, Klein D, Perez-Polo JR, et al. Interaction of exogenous liposomal insulin-like growth factor-I cDNA gene transfer with growth factors on collagen expression in acute wounds. Wound Repair Regen 2005; 13(3): 269-277.
34. Peplow PV, Chatterjee MP. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. Cytokine 2013; 62(1): 1-21.
35. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. Stem Cells Transl Med 2012; 1(2): 142-149.
36. Semenova E, Koegel H, Hasse S, Klatte JE, Slonimsky E, Bilbao D, et al. Overexpression of mIGF-1 in keratinocytes improves wound healing and accelerates hair follicle formation and cycling in mice. Am J Pathol 2008; 173(5): 1295-1310.
37. Montagna W, Yun JS. The Skin of the Domestic Pig. J Invest Dermatol 1964; 43(1): 11-21.