

مقایسه فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها (۱ و ۲) در مدل‌های مختلف کشت فیبروبلاست

محمد رضا خرمی زاده Ph.D.*^۱، محمد پزشکی Ph.D.*^۲، فرناز صفوی فر M.D.*^۳

عزیز قهاری Ph.D.*^۴

^۱ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، بخش بیوتکنولوژی

^۲ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، بخش ایمونولوژی

^۳ دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات خون و انکولوژی بیمارستان شریعی

^۴ دانشگاه آلبرتای کانادا، گروه جراحی بیمارستان

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی

چکیده

دریافت مقاله: ۸۰/۱۲/۶، پذیرش مقاله: ۸۲/۹/۲۴

✱ **هدف:** مقایسه بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در مدل کشت فیبروبلاستی حاصل از بافت‌های نوزادان و بزرگسالان با مدل کشت در پلاستیک

✱ **مواد و روشها:** برای این منظور فیبروبلاست‌های به دست آمده از پوست دور ریز جراحی زیبایی ناحیه شکم ۵ نفر فرد سالم بزرگسال (AS) و همچنین ۸ نمونه پوست ختنه‌گاه جنین تازه تولد یافته (FS) در دو محیط پلاستیک و 3-D gel کشت داده شدند. کشت سلول‌های جدا شده از دو گروه مطالعه، تحت شرایط استریل از نظر رشد همزمان شده و به انبوهی ۷۰٪ الی ۸۰ درصد رسانده شد. سپس فعالیت دو آنزیم کلاژناز ۱ (MMP-1) و ژلاتیناز (MMP-2) در رده‌های سلولی مختلف مشتق شده از این افراد در دو محیط بررسی و مقایسه گردید.

✱ **یافته‌ها:** نتایج حاکی از آن است که اولاً فیبروبلاست‌های AS در محیط پلاستیک بطور معنی داری بیشتر از رده‌های FS کلاژناز ۱ تولید می‌کنند (۱۴/۳۸ ± ۱/۳۳ در مقابل ۹/۷۹ ± ۲/۲۷ در محیط پلاستیک و ۲۷/۰۵ ± ۱/۲۸ در مقابل ۲۵/۲ ± ۲/۹۷ در محیط ژل) ثانیاً، هر چند که اختلاف معنی داری از نظر تولید این آنزیم توسط رده‌های AS و FS در محیط 3-D gel مشاهده نگردید لیکن ترشح کلاژناز در هر دو رده فوق در ژل، به طور معنی داری بیشتر از پلاستیک بود ($p < 0.05$). در مورد تولید ژلاتیناز علیرغم افزایش نسبی تولید این آنزیم در محیط 3-D gel در مقایسه با پلاستیک، رده‌های FS در محیط بافت مهندسی شده مقادیر بیشتری ژلاتیناز در مقایسه با رده‌های تولید می‌کنند.

✱ **نتیجه‌گیری:** به طور کلی این مطالعه بیانگر تفاوت‌های فیزیولوژیک در جزای ساختمانی ماتریکس پوست بوده که می‌تواند ناشی از تفاوت‌های فنوتیپی باشد که سلول‌های پوستی در پاسخ به شرایط متفاوت نظیر سن ایجاد می‌کند. با وجود یافته‌های فوق، هنوز اطلاعات ما در مورد پارامترهای ملکولی تنظیم کننده فرآیندهای فوق در سنین و افراد مختلف ناچیز است و بررسی‌های بیشتر را طلب می‌کند.

کل واژگان: ماتریکس متالوپروتئیناز، کلاژناز، ژلاتیناز، فیبروبلاست پوست، کشت سلول، ژل سه بعدی

مقدمه

به دنبال ایجاد زخم در پوست، فرآیند التیام به صورت مراحل برنامه ریزی شده آغاز می‌گردد و در نهایت منجر به بازگشت وضعیت سلولی و ملکولی بافت آسیب دیده به حالت طبیعی می‌شود. فرآیندهای آنزیمی در محیط زخم نقش مهمی در حذف بافتهای مرده، تسریع آن در کنشهای بین سلولی، بازسازی عروق بافت، و همچنین آرایش نهایی فیبرهای کلاژن برای بازسازی ساختمان طبیعی پوست دارند. مهمترین این آنزیمها از خانواده ماتریکس متالوپروتئینازهای ختنی (MMPs) است که براساس سوبسترای اختصاصی و تشابه ساختمانی به چهار گروه کلاژنازاها، ژلاتینازها، استروملیزینها، و متالوآنزیمهای غشایی تقسیم می‌شوند (۱).

در فرآیند التیام زخم، کلاژناز ۱ باعث شکسته شدن کلاژن تیپ ۱ و ۲ که به عنوان عمده‌ترین ماتریکس اپیدرم می‌گردد. ژن این آنزیم تحت تأثیر کنترنلهای مختلف ژنتیکی در خلال مراحل مختلف ترمیم زخم، روشن و یا خاموش می‌گردد. این آنزیم به شکل غیر فعال ۵۲kDa وزن داشته و عمدتاً توسط فیبروبلاستهای پوست ترشح می‌گردد و پس از تأثیر تریپسین به فرم فعال با حدود ۴۲kDa وزن در می‌آید (۲).

ژلاتیناز یا کلاژناز IV توسط فیبروبلاستها به صورت فرم غیر فعال ۷۲kDa ترشح گردیده و پس از فعال شدن حدود ۶۶kDa می‌گردد (۳). سوبسترای این آنزیم کلاژنهای IV، V، VII، فیبرونکتین، الاستین و پروتوگلیکانها هستند. علاوه بر اینها، ژلاتیناز بر روی ژلاتین نیز اثر گذاشته و آن را به صورت قطعات کوچک در می‌آورد. این قطعات کوچک توسط سایر سلولها از بافت حذف می‌گردند.

از حدود ۴۰ سالی که از کشف این آنزیمها می‌گذرد تحقیقات زیادی در مورد ارتباط این آنزیمها با انواع زخمها و عوارض ناشی از آنها و مکانیسمهای کنترل کننده آنها انجام شده است. به طور مثال دیده شده که در بافتهای hypertrophic scarring که مهمترین عارضه سوختگی‌های شدید است و یا در فیروز کید، میزان بسیار کمتری کلاژناز در مقایسه بافتهای طبیعی ترشح می‌گردد (۴، ۵، ۶). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فیبروبلاستیایی که از افراد سنین مختلف جدا می‌شوند مقادیر متفاوتی کلاژناز ترشح می‌کنند که مستقل از فعالیت ترشحي TIMP-1 و TGF-B1 است ولی در عوض با تولید کلاژن رابطه معکوس دارد (۷).

در یک بررسی دیگر به نقش فعالیت ژلاتیناز در ترمیم بافت اسکار پوستی اشاره گردیده است (۸).

لذا به نظر می‌رسد: دیرجوش خوردن و یا مزمن شدن زخمها در افراد مسن احتمالاً به دلیل فعالیت بیش از حد کلاژناز و تخریب سریع رشته‌های کلاژن باشد. همچنین در بررسی اخیر نشان داده شده است که میزان پرولیفراسیون سلولی و تولید ژلاتیناز توسط سلولهای فیبروبلاست جدا شده از زخمهای مزمن ناحیه درمانیت تماسی آلرژیک نسبت به سلولهای پوست نرمال به میزان معنی داری بیشتر بوده است (۹، ۱۰). مسئله‌ای که در اینجا باید به آن اشاره کرد این است که تا چه حد می‌توان نتایج حاصل از کشت فیبروبلاستها را در شرایط in vitro و محیط پلاستیک (منظور ظرف کشت سلول است که از جنس ترکیبات

پلاستیک ساخته شده است) به شرایط in vivo تعمیم داد؟

بررسی‌ها نشانگر آن است که کلاژناز بیشترین اثر آنزیماتیک خود را بر روی کلاژن فیبرلاز مونومریک اعمال می‌کند، یعنی همان شکلی که در ماتریکس موجود در پوست دیده می‌شود. کلاژنی که توسط فیبروبلاستها در محیط پلاستیک تولید می‌شود تا حدودی به شکل دایمر و یا مرکب در می‌آید که با افزایش این حالت میزان دسترسی آنزیم به ملکول کاهش و زمان تأثیر آن افزایش یافته و در نهایت به دلیل اثر بازخوراند منفی (negative feed back) فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. اضافه می‌گردد که عملکرد فیبروبلاستها شدیداً متأثر از مورفولوژی آنها است. و به طور اختصاصی‌تر، فعالیت این سلولها در زمینه تولید کلاژن و کلاژناز مرتبط با آرایش فضایی ماتریکسی است که سلولها در آن استقرار یافته‌اند (۱۱). همان طور که می‌دانیم کلاژن در لایه‌های فوقانی پوست به صورت رشته‌های مونومر به طور منظم پراکنده شده است و سلولهای پوستی از جمله فیبروبلاستها لابلای این رشته‌های و در ارتباط مستقیم با آنها قرار دارند. این سلولها مرتباً در اندرکنش و feed back با این محیط و تحت تأثیر عوامل شیمیایی مانند ماکرومولکولها و سائوکانینها و عوامل فیزیکی مانند گرادبان مولکولی، درجه حرارت، pH و فشار مکانیکی، پاسخهای متناسب با ترومای بافتی را ایجاد می‌کنند (۱۲).

از طرف دیگر زمانی که فیبروبلاستها در محیط کشت قرار می‌گیرند به سرعت شروع به تشکیل لایه تک سلولی روی پلاستیک نموده و با دریافت مواد مغزی، کلاژن و کلاژناز ترشح می‌کنند.

با تنظیم شرایط محیطی می‌توان چنین گفت که این فعالیتها تا حدی می‌تواند نشانه‌ای از آنچه که در in vivo اتفاق می‌افتد باشد. اما بررسیهای انجام شده حاکی از آن بوده که این سلولها در یک ماتریکس سه بعدی با ایجاد مورفولوژی متفاوت با آنچه که در پلاستیک است، اندرکنش فعال‌تری با محیط داشته‌اند (۱۱).

در این مطالعه با ابداع یک مدل ۳ بعدی مشابه بافت، فیبروبلاستهای سنین مختلف را از نظر فعالیت کلاژناز و ژلاتیناز بررسی و نتایج را با نتایج حاصله از فعالیت آنها در محیط پلاستیک مقایسه نمودیم.

مواد و روشها

* کشت سلولهای فیبروبلاست از پوست انسان
Fibroblast Explantation

در این بررسی نمونه‌های پوستی از پوستهای دور ریز حراجیهای زیبایی ناحیه شکم ۵ فرد بزرگسال براساس روشهای قبلی جدا و کشت شد (۷). این افراد در رده‌های سنی ۶۵-۳۰ سال بودند. علاوه بر این هشت نمونه از پوست دور ریز ختنه‌گاه نوزادان نیز در این مطالعه بررسی شد. نمونه‌های پوستی در محیط کشت سلولی استریل و در شرایط خشک به آزمایشگاه کشت سلول انتقال یافته و براساس روشهای قبلی (۷) سلولهای فیبروبلاست آنها جداسازی و کشت داده می‌شد.

رده‌های سلولی مورد نیاز پس از تعیین هویت برای آزمایشات بعدی در نیروژن مایع نگهداری شد. به هنگام آزمایش پس از فرار



مواد اضافی عاری گردید. این محیط یا سریعا مورد استفاده قرار گرفت و یا برای استفاده بعدی به مدت کوتاه در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

* اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کلاژناز (Collagenase activity assay)

در این بررسی فعالیت کلاژنولیتیک فیروپلاستهای جدا شده از پوست انسان براساس روش Solution Assay (۱۵) و با اعمال تغییراتی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه:

پروتئینهای محیط کشت حاصل از مرحله قبل با استفاده از سولفات آمونیوم رسوب داده شد و رسوب حاصله پس از حل کردن در بافر Assay شامل: 0.05 mol/L Tris+ 0.02 mol/L NaCl+ 0.05% CaCl₂+ 0.02% Na₃ PH 7.4 به مدت یک شب در مقابل بافر Assay دیالیز شد. حجم نهایی نمونه‌های دیالیز شده مطابق با تعداد سلولهای شمارش شده در مرحله قبل، تنظیم شد. پروکلاژناز موجود در نمونه‌ها با استفاده از تریپسین (Worthington, Freeland, NJ) 10mg/ml در مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در حرارت اتاق فعال گردید. سپس با استفاده از محلول (Sigma) Soybean trypsin inhibitor 100 mg/ml واکنش متوقف شد.

* محلول اسیدی کلاژن

محلول اسیدی کلاژن استخراج شده از پوست گاو (Sigma, St. Louis, Mo) 2mg/ml در محاورت گلوکز 6 mol/L به تمامی نمونه‌ها اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت یک شب در حرارت اتاق نگهداری شد.

سپس با استفاده از ژل ۶ درصد پلی اکریلامید حاوی SDS (SDS-PAGE) محصولات حاصل از هضم آنزیماتیک نمونه‌ها الکتروفورز شد. ژل سپس با رنگ کوماسی بلو (R-250) رنگ آمیزی شده و قطعات کلاژن حاصله ($\alpha_1(3/4)$), ($\alpha_2(3/4)$) با استفاده از دستگاه اسکنر کامپیوتری (Color One Scanner, Apple Inc, NY) و نرم‌افزار آنالیز تصاویری به صورت کمی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. (National Inst. of Health Image Program, NIH, Bethesda, USA) به کمک این نرم‌افزار سطح زیر منحنی حاصل از دانسیتمتری براساس معیار استاندارد (grey scale) تحت عنوان چگالی تام (total density) و به صورت کمیتهای اسکالر نمایش داده می‌شود. این اعداد نمایانگر فعالیت آنزیم بوده و جهت مقایسه مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

* زایموگرافی Zymography

این کار براساس روش معرفی شده توسط

1. Lactalbumin Hydrolystate
2. Betaminopropionitrile

دادن سلولهای فریز شده در محیط کشت و با پاساز دادن و تعیین شرایط فیزیکی کشت، رده‌های سولی از نظر آهنگ رشد با یکدیگر هماهنگ شده و از سلولهای سالم در پاساژهای ۷-۳ جهت بررسی استفاده گردید. به اختصار رده‌های بزرگسال AS و رده‌های سولی نوزادان FS نامگذاری گردید. مستذکر می‌گردد که برای کشت سلولها در این مرحله از فلاسکهای متداول در کار کشت سلول که از جنس ترکیبات پلاستیکی مثل پلی استیرن می‌باشند، استفاده گردیده است. این محیط به طور اختصار تحت عنوان محیط پلاستیک نامگذاری شده است.

* تهیه بافت مهندسی شده سه بعدی 3-D gel

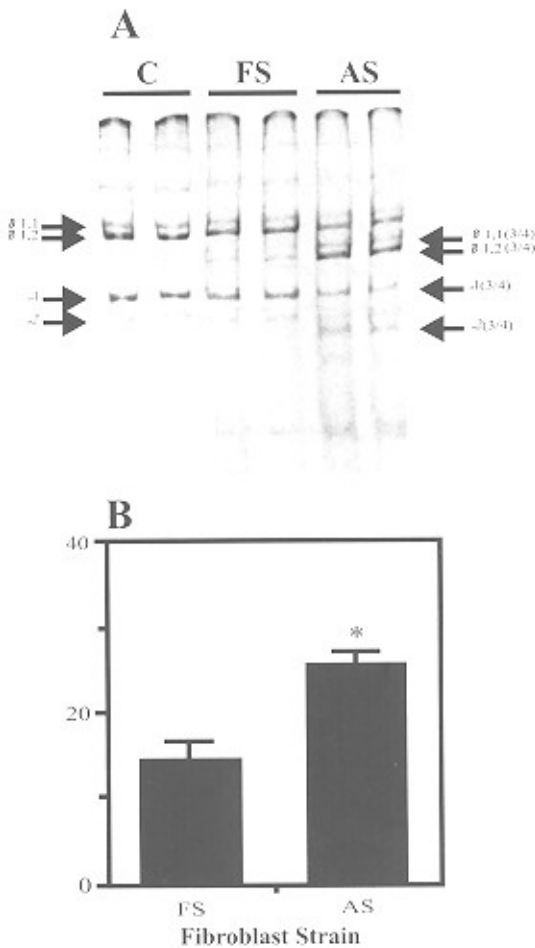
با مطالعه‌ای که روی روشهای معرفی شده توسط Hansborough (۱۳) و Boyce (۱۴) انجام شد یک روش بینه برای بررسی حاضر انتخاب شد. بطور خلاصه ابتدا محلول اسیدی کلاژن 2mg/ml (Sigma Biochomal Co.) بصورت استریل تهیه و در (cold room) به مدت یک تا دو شب کاملا مخلوط شد. سلولهایی که در پلاستیک کشت داده شدند پس از رسیدن به ۸۰ درصد انبوه (confluent) و همزمان کردن رشد، شمارش و به صورت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت DMEM+3% FBS قرار داده شدند. مقدار مورد لزوم محلول کلاژن برای قرار دادن در ظرف محیط کشت برداشته شد و پس از خنثی کردن اسیدیته آن با کمک محلول 0.04 M NaOH، با سوسپانسیون سلولی به آرامی مخلوط شده و در محیط کشت قرار گرفت. پس از یک شب، محیط به صورت ژل در آمده و سلولها مورفولوژی مخصوص در بافت را پیدا کرده و شروع به رشد کردند.

* ایجاد شرایط اختصاصی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم Collagenase

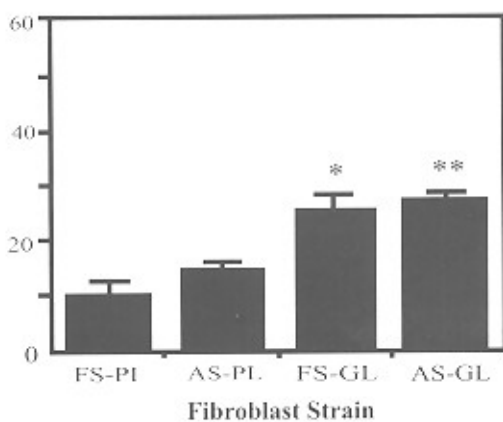
این کار به صورت سه تایی (triplicate) و براساس روشهای قبلی با اعمال تغییراتی انجام گردید (۸).

به طور خلاصه: رده‌های سلولی در محیط کشت DMEM به همراه 10% FBS در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شده تا میزان ۸۰-۷۰ درصد انبوه برسند. سپس محیط کشت دور ریخته شده و محیط مخصوص شامل: DMEM+50µg/ml Bamp+50µg/ml ascorbic acid+0.1mmol proline+10% dialyzed FBS به فلاسکهای حاوی سلول اضافه گردید. سلولها در این حالت به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه کشت داده شدند. سپس محیط کشت دور ریخته شد و فلاسکها ۳-۵ بار با PBS استریل (بدون تریپتست کردن) شستشو داده شد. یک سری فلاسکها به عنوان کنترل برای مراحل بعدی شمارش گردید. این محیط شامل:

DMEM+0.5%w/v LH¹+50µg/ml ascorbic acid+0.1mmol Proline+50µg/ml Bamp²+25µg/ml conA این حالت به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در گرمخانه کشت داده شدند. سپس محیط کشت جدا شده و پس از سانتریفیوژ در 10000rpm به مدت ۳۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد از سلولها و



شکل ۱: پاتل آنالیز فعالیت کلاژنولیتیک روی ژل اکریلامید (SDS-PAGE) - پاندهای آلفا و بتا ۱ به ترتیب نشان دهنده زنجیره‌های منومریک و دپرمریک کلاژن تایپ ۱ می‌باشند. کلاژناز در یک محل اختصاصی (۳/۴ طول) زنجیره را می‌شکند. کنترل منفی (C= Negative Control) نشان دهنده عدم فعالیت کلاژناز است. فعالیت کلاژنولیتیک در فیبروبلاستهای نوزاد و بزرگسال در این محیط به ترتیب با F و A نشان داده شده‌اند. پاتل B: آنالیز آماری دانسیتمتری فعالیت کلاژناز در پلاستیک، FS - فیبروبلاست نوزاد (چنین تازه تولد یافته) - AS - فیبروبلاست بزرگسال Error Bar = Standard Error Mean (SEM). ستاره نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف دو گروه از نظر آماری است.



شکل ۲: مقایسه فعالیت کلاژناز بین فیبروبلاستهای نوزاد و بزرگسال در محیط پلاستیک و بافت مهندسی شده. FS-PI - فیبروبلاستهای نوزاد در پلاستیک، AS-PI - فیبروبلاستهای بزرگسال در پلاستیک، FS-GL - فیبروبلاستهای نوزاد در بافت مهندسی، AS-GL - فیبروبلاستهای بزرگسال در بافت مهندسی. Error Bar = Standard Error Mean (SEM). ستاره نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف دو گروه از نظر آماری است.

Heussen & Dowdle (۱۶) با اعمال برخی تغییرات انجام گردید. در این روش فعالیت ژلاتیناز (MMP-2) توسط فیبروبلاستهای پوست انسان ردیابی شد.

به طور خلاصه: پس از کشت فیبروبلاستها در محیط DMEM+10%FBS و همزمان کردن رشد و رساندن آنها به ۸۰-۹۰ درصد انبوه، محیط کشت جدا گردیده و بعد از سانتریفوژ کردن (3000 RPM) جهت آنالیز زایموگرافی مورد استفاده قرار گرفت. این نمونه‌ها در مقادیر مساوی در ژل مخصوص زایموگرام که مخلوطی از ژل پلی اکریلامید و ژلاتین بود تحت شرایط غیر دناتوره (non-denaturing) الکتروفورز شد. سپس ژلها به مدت یک ساعت در محلول ۲/۵ درصد شستشو داده شد. ژلها در بافر فعال سازی ژلاتیناز به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. این بافر شامل 0.02% NaN3+ 0.005M CaCL2+ 0.2M NaCL+ 0.5M Tris بود. روز بعد ژلها در محلول رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و سپس آنقدر در محلول رنگبر قرار داده شدند تا باند شفاف ژلاتیناز در زمینه آبی تیره ژل دیده شد. ژلها سپس با استفاده از دستگاه اسکنر و آنالیز تصاویر (مطابق آنچه که در مورد کلاژناز اشاره گردید) مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری Statistical Analyses:

کلیه بررسیهای آماری انجام شده بر روی دانسیته باندهای حاصل از فعالیت کلاژناز و ژلاتیناز با استفاده از نرم‌افزار آماری InStat 2.0 و با روش t-student انجام گردید و $p\text{Value} < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۱- بررسی فعالیت کلاژناز در شرایط invitro: فعالیت این آنزیم در تمامی نمونه‌های مورد آزمایش قابل اندازه‌گیری بود.

اما همان‌طور که در شکل ۱ دیده شد در محیط پلاستیک کلاژناز در بزرگسالان بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) فعال‌تر از نوزادان است.

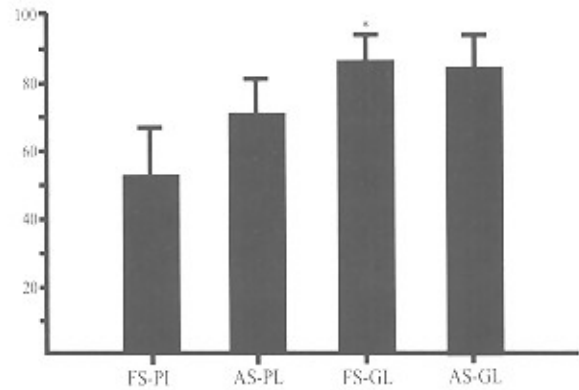
همچنین همان‌طوری که در شکل ۲ دیده می‌شود تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت کلاژناز بین فیبروبلاستهای بزرگسالان AS و نوزادان FS در محیط بافت مهندسی شده دیده نمی‌شود. با این وجود، کلاژنازی که از فیبروبلاستهای کشت داده شده در بافت مهندسی شده جدا شده، در مورد سویه‌های AS کمتر از دو برابر و در مورد سویه‌های FS تقریباً سه برابر فعال‌تر از کلاژنازی بوده که از نمونه‌های کشت داده شده در پلاستیک جدا گردیده است ($p < 0.05$).

۲- آنالیز زایموگرافی ژلاتیناز: با توجه به نمودار ۳، بررسی‌های انجام شده نشان دهنده فعالیت بیشتر ژلاتیناز در فیبروبلاستهای بزرگسالان در مقایسه با نوزادان بوده است. همچنین محیط کشت حاصل از رشد فیبروبلاستها در سیستم ۳ بعدی، نشاندهنده حدود ۳۰ درصد فعالیت بیشتر در محیط ژل در مقایسه با محیط پلاستیک بوده است.

فعالیت کلاژنازی بسیار بیشتری را در مقایسه با فیروپلاستهای نوزادان نشان می‌دهند. این یافته در کنار اطلاعات قبلی مبتنی بر افزایش میزان mRNA مربوط به کلاژناز ۱ در سلولهای جدا شده از افراد بزرگسال و همچنین عدم تغییر TIMP-1 سلولهای رده نوزادان و بزرگسالان (۸) نشان دهنده این مطلب است که احتمالاً تنظیم ژن مربوط به کلاژناز ۱ در مرحله نسخه برداری (Transcription) انجام می‌شود. همچنین با توجه به افزایش نزدیک به دوبرابر فعالیت کلاژناز در فیروپلاستهای نوزادان در یافت مهندسی در مقایسه با فعالیت این سلولها در پلاستیک، می‌توان گفت که تولید این آنزیم در نوزادان وابستگی بیشتری به مورفولوژی سلولهای تولیدکننده آن دارد (نمودار ۴).

این یافته با یافته‌های قبلی که نشان دهنده افزایش پاسخ فیروپلاستهای نوزادان نسبت به سائوکاپنها در مقایسه با فیروپلاستهای بزرگسالان است هماهنگی دارد (۸ و ۱۷). دوم اینکه علیرغم افزایش نسبی فعالیت ژلاتیناز در بزرگسالان نسبت به نوزادان در محیط پلاستیک، فیروپلاستهای نوزادان در بافت مهندسی شده فعالیت بیشتری در تولید ژلاتیناز از خود نشان دادند. لذا مطالعات بیشتری در زمینه چگونگی و مکانیسم کنترل فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در فرایندهایی نظیر التیام زخم و اسکار در رده‌های مختلف سنی مورد نیاز می‌باشد. قطعاً در این مطالعات کاربرد مدل‌های مختلف *in vitro* اعم از محیط‌های پلاستیکی و یا ماتریکس‌های بافتی می‌تواند نتایج مستند بیشتری را به دنبال داشته باشد. با توجه به تفاوت‌های ذکر شده در تولید کلاژناز و ژلاتیناز توسط فیروپلاستهای نوزادان و بزرگسالان می‌توان چنین نتیجه گرفت که:

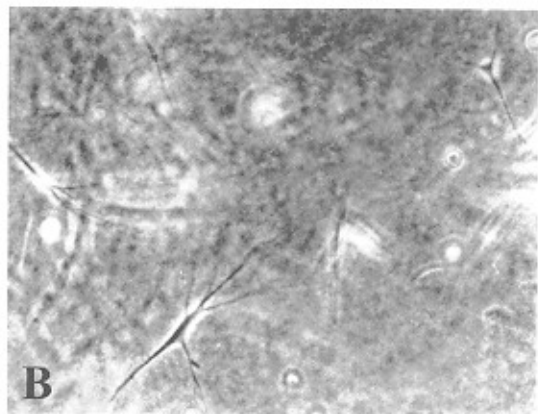
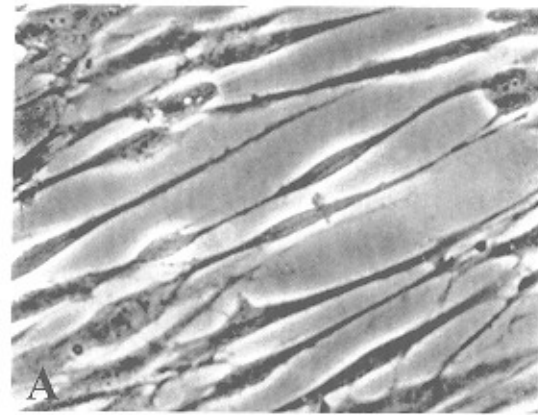
- ۱- این رده‌های سلولی از نظر عملکرد و فیزیولوژی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. لذا در کاربردهای آتی فیروپلاستها به عنوان مدل‌های *in vitro* Skin substitute می‌بایستی رده سلولی مورد استفاده مورد توجه قرار گیرد. با توجه به ماهیت کاربرد (مثلاً قرار دادن بافت مهندسی شده بر روی زخم جهت تسریع بسته شدن زخم و یا قرار گرفتن بافت مهندسی شده بر روی زخم جهت کنترل عارضه (hypertrophic scarring) از سلولهای مناسب استفاده شود. نکته قابل ذکر اینست که بررسیها نشاندهنده چشم اندازهای روشن در کارآیی اینگونه بافتهای مهندسی شده در بیوتراپی است (۱۸، ۱۹). بطور مثال در بک بررسی که در زمینه سازگاری نسجی بافت مهندسی شده انجام گردیده نشان دهنده سازگاری عالی این بافت با بستر زخم بوده است (۲۰). با این وجود ذکر این نکته ضروری بنظر میرسد که در بحث *transplantation engineering* بالاترین سازگاری نسجی زمانی حاصل می‌گردد که منبع سلول کشت داده شده جهت پیوند، از خود فرد (auto) باشد. ۲- علیرغم شباهت فیزیولوژیک کلاژناز ۱ و ژلاتیناز (MMP-2)، مکانیسم‌های ژنتیکی کنترل کننده این دو آنزیم متفاوت است. با توجه به نتایج حاصل از این بررسی و بررسیهای انجام شده دیگر (۲۱، ۴) می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً تنظیم کلاژناز ۱ بیشتر در مرحله نسخه برداری و تنظیم ژلاتیناز با وابستگی زیاد به سوپترا در مرحله ترجمه می‌باشد. لذا مطالعات بیشتری در مورد چگونگی و مکانیسم کنترل فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در فرآیندهای نظیر التیام زخم در نوزادان و مقایسه آن با بزرگسالان مورد نیاز است. ۳- با توجه به نقش کلیدی کلاژناز و ژلاتیناز در مرحله نهایی



شکل ۳: مقایسه فعالیت ژلاتیناز بین فیروپلاستهای نوزاد و بزرگسال در محیط پلاستیک و بافت مهندسی شده

FS-PL - فیروپلاستهای نوزاد در پلاستیک
 AS-PI - فیروپلاستهای بزرگسال در پلاستیک
 FS-GL - فیروپلاستهای نوزاد در بافت مهندسی شده
 AS-GL - فیروپلاستهای بزرگسال در بافت مهندسی شده
 Error Bar = Standard Deviation (SD)

ستاره: نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف دو گروه از نظر آماری است



شکل ۴: اختلاف مورفولوژیک فیروپلاستها در دو محیط پلاستیک و بافت مهندسی شده
 پاتل A - فیروپلاستهای کشت داده شده بر روی پلاستیک (درشتنمایی X 10)
 پاتل B - فیروپلاستهای کشت داده شده در بافت مهندسی شده 3-D Gel (درشتنمایی X 10)

بحث

نتایج این بررسی نشانگر دو تفاوت مهم بین فیروپلاستهای جدا شده از بزرگسالان و نوزادان بود: اول اینکه فیروپلاستهای بزرگسالان

ناچیز است و بررسیهای بیشتری را طلب می‌کند.

تقدیر و تشکر

نگارندگان مقاله بدین وسیله از همکارهای آقایان دکتر نرجس آلبرتا و دکتر اسکات (Dr.P.G. Scott)، رئیس بخش جراحی ترمیمی بیمارستان دانشگاه بولوی دهان دانشکده پزشکی دانشگاه آلبرتا کانادا به سبب همکاری بی‌دریغ و مشاوره علمی صمیمانه سپاسگذاری می‌نمایند.

فرآیند التیام زخم (remodeling phase) و همچنین افزایش فعالیت این دو آنزیم در بافت مهندسی شده در مقایسه با پلاستیک چنین بنظر می‌رسد که مرحله remodeling شدیداً تحت تأثیر شرایط فیزیکی ساختار زخم است. این یافته با نتایج محققین دیگر که نشان‌دهنده تأثیر عوامل بیوفیزیکی بر مراحل مختلف فرآیند ترمیم زخم بودند هماهنگی دارد (۹).

با وجود یافته‌های فوق، هنوز اطلاعات ما در مورد مراحل مختلف فرآیند التیام زخم و پارامترهای تنظیم‌کننده آن در سنین و افراد مختلف

References

1. Woessner JF: Introduction to MMPs. In: Matrixmetalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press: 2000; 1-9
2. Wilhelm SM: Human fibroblast collagenase: glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 3756-3760
3. Stricklin GP: Localization of mRNAs representing interstitial collagenase, 72-kDa gelatinase, and TIMP in healing porcine burn wounds. J Invest Dermatol 1997; 103: 3535-8
4. Telasky C, Tredget EE, Shen Q, Khorramizadeh MR, Iwashina I, Scott PG, Ghahary A: IFN α b suppresses the fibrogenic effects of IGF-1 in dermal fibroblasts. J Interferon Res 1998; 18: 571-577
5. Ghahary A: Collagenase production is lower in post-burn hypertrophic Scar fibroblast than in normal fibroblasts and is reduced by insulin-like growth factor-1. J Invest Dermatol 1996; 106: 476-481
6. Benyon KC, Arthur MJ: Mechanism of hepatic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 27: 75-85
7. Khorramizadeh MR: Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. Mol Cell Biochem 1999; 94: 99-108
8. Reno F: Release and activation of matrix metalloproteinase-9 during invitro mechanical compression in hypertrophic scars. Proc N Arch Dermatol 2002; 54: 475-478
9. Pilcher BK: Role of MMPs and their inhibitors in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. Ann NY Acad Sci 1999; 878: 12-14
10. فلک رضا: نقش ماتریکس متالوپروتئیناز در درمان تیت تماسی آلرژیک. پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد ایمنی شناسی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۰
11. Borchers AH: Paracrine factor and cell-cell contact-mediated Induction of Protease and c-est gene expression in malignant keratinocyte/dermal fibroblast cocultures. Exp Cell Res 1994; 213: 143-147
12. Korn JH, Lafyatis R: Fibroblast function and fibrosis. In: Kelly sTextbook of Rheumatol 2001; 1:263-275
13. Hansbrough JF: Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen glycosaminoglycan substrate. JAMA 1989; 262: 2125-2130
14. Boyce ST: Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. Ann Surg 1995; 222: 743-752
15. Scott PG: A neutral proteinase from human gingival fibroblasts active against the terminal cross-linking region of type I collagen. Biochem Biophys Res Commun 1983; 114: 1064-1070
16. Huessen C, Dowdle EG: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analyst Biochem 1980; 102: 196-202
17. Bouillanne O: Growth hormone therapy in elderly people: an age-delaying drug? Fund Clin Pharm 1996; 10: 416-430
18. Voigt M, Schauer M, Schaefer DJ, Andree C, Horch R, Stark GB: Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to constitute the epidermis in full-thickness wounds. Tissue Eng 1999; 5: 563-572
19. LaFrance ML, Armstrong DW: Novel living skin replacement biotherapy approach for wounded skin tissues. Tissue Eng 1999; 5: 153-170
20. Laning JC, DeLuca JE, Hardin-Young J: Effects of immunoregulatory cytokines on the immunogenic potential of the cellular components of a bilayered
21. Lafuma C: Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. J Invest Dermatol 1994; 102: 945-950
- living skin equivalent. Tissue Eng 1999; 5: 171-181

