زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۹۹- ۸۹

مقاله پژوهشی

تاثیر نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا بر بیان ژن کلاژن I در پوست موش نر آزمایشگاهی پس از میکرونیدلینگ

اسداله شهرانی[۱]، مریم بنانج[۱*]، پروین منصوری[۲]، هنگامه علی بیک[۱]، ناهید نیکخواه[۲]

۱-گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[*]مسئول مکاتبات: maryambananej@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۷

چکیده

پوست در معرض جراحات و صدمات مکانیکی است و با افزایش سن، کلاژن پوست دچار تغییرات می‌گردد. در ترمیم و جوان‌سازی پوست، از گیاهان دارویی و ژل آلوئه‌ورا به صورت تجربی و سنتی، استفاده می‌شود. در این مطالعه به تاثیر نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا بر بیان ژن کلاژن I پس از میکرونیدلینگ در پوست موش نر آزمایشگاهی پرداخته شد. این مطالعه، در شرایط آزمایشگاهی استاندارد انجام‌گرفت، موش‌های تحت آزمایش، میکرونیدلینگ شدند. گروه‌ها به مدت ٤٨ ساعت، تحت تاثیر تیمارهای، سالین، ژل آلوئه‌ورا و نانوالیاف ژلاتین- آلوئه‌ورا قرار گرفتند. پس از نمونه‌برداری و تخلیص RNA بافتی، میزان بیان ژن کلاژن I به روش Real time PCR مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج بدست آمده نشان داد: به علت جراحت پوستی، بیان ژن کلاژن I در گروه‌های تحت آزمایش نسبت به گروه شاهد، کاهش معنا دار داشت. اما تیمار با ژل آلوئه ورا و نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا، باعث افزایش معنا دار بیان ژن کلاژن I، نسبت به گروه مدل شد. میکرونیدلینگ باعث تحریک پوست شد. گلومانان موجود در نانو الیاف به صورت تدریجی آزاد شده و با عبور از منافذ ریز پوست، با تاثیر **بر** مسیر MAP/ERK باعث کاهش التهاب و افزایش بیان ژن کلاژنI در محل جراحت شد.این روش افزایش کلاژن پوست، باعث ترمیم و فرآیند جوان‌سازی پوست می گردد..

کلمات کلیدی: پوست، میکرونیدلینگ، نانوالیاف، ژلاتین، آلوئه ورا، PCR، کلاژن I.

مقدمه

پوست به عنوان اندام خارجی بدن همانند حصاری بدن را در برابر محیط محافظت می‌نماید (١٤). به دنبال بروز هر گونه آسیب به پوست مجموعه‌ای از رویدادهای سلولی و مولکولی رخ می‌دهد (٤). این اندام در معرض جراحات و صدمات مکانیکی قرار دارد. و با افزایش سن دچار تغییرات طبیعی در ماتریکس خارج سلولی ECM و تغییر در عملکرد سلول‌ها می‌گردد. پوست به طور پیوسته در حال جوان‌سازی است (٢٨). با توجه به آسیب‌های پوستی امروزه نیاز به روش‌های متنوع و جدیدی برای جوان-سازی و القاء فیبروبلاست‌ها به منظور تولید کلاژن وجود دارد (٢٦). کلاژن حدود ۳۰ درصد وزن بدن را

تشکیل می‌دهد. این پروتئین نقش مهمی در ترمیم زخم‌ها تکثیر سلولی، مهاجرت و تمایز سلولی ایفا می‌کند. کلاژن به ECM قدرت انبساط و الاستین به آن خاصیت ارتجاعی می‌بخشد و به آن اجازه می‌دهد تا کشیده شود و بعد به حالت اولیه خود برگردد. کلاژن نوع I، ۸۰ درصد و کلاژن نوع III بیشترین کلاژن‌ها در ماتریکس پوست هستند (۲۷). یکی از روش‌های جوان‌سازی و تحریک کلاژن‌سازی در پوست، میکرونیدلینگ است. در این تکنیک، سوزن‌های ریز و ظریف دستگاه، منافذ کوچکی تا عمق خاصی از پوست ایجاد می‌کند. با تحریک پوست، علامت دهی، مهاجرت سلولی و تکثیر فیبروبلاست‌ها انجام می‌گیرد. با افزایش تعداد فیبروبلاست‌ها در موضع آسیب دیده، ساخت کلاژن افزایش می یابد. از طریق منافذ بسیار ریز ایجاد شده، امکان دارورسانی و بررسی اثرات عوامل محیطی همچون فاکتورهای رشد وجود دارد (۲۶، ۱۰).

آلوئه ورا (*Aloe barbadensis Miller*) به عنوان یکی از گیاهان دارویی، سابقه بسیار طولانی در ترمیم زخم‌های پوستی را نشان داده است. نقش ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد رادیو اکتیویتی، ضد ویروسی و همچنین آنژیوژنز عصاره‌ی آلوئه‌ورا به اثبات رسیده است (۱۷، ۱۹، ۲۲). مطالعات فراوانی در مورد نقش فرآورده‌های این گیاه (عصاره، ژل، پودر، محلول خوراکی) بر روند التیام زخم تایید شده است (۸). در مطالعه‌ای، نانوالیاف ژلاتین‌آلوئه‌ورا جهت ترمیم زخم، سنتز و استفاده شد . نانو الیاف بکار رفته با مکانیسم به دام انداختن، ذارت آیروسل را مهار کرده و الگوی مناسبی برای انتقال بخار تامین می‌کند و همچنین مانع نفوذ باکتری به سطح زخم می‌شود. این الیاف بخاطر سطح زیاد، در رسانش و حمل دارو از اهمیت بر خوردار هستند (۲).

هنگامی که ژل آلوئه ورا در سطح پوست قرار می‌گیرد، امکان نفوذ مواد موثر آن از لایه اپیدرم سالم، ناچیز است. همچنین با خشک شدن ژل، رهایش گلومانان کاهش می یابد. در میکرونیدلینگ، با ایجاد جراحت جزئی، بافت پوست تحریک می‌گردد و می‌توان از منافذ ایجاد شده برای دارو رسانی هدفمند استفاده کرد. لذا در این مطالعه، با تلفیق مواد و روش‌های ذکر شده، ابتدا بر روی پوست موش، میکرونیدلینگ انجام شد و با تیمار نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا بر روی پوست، امکان مطالعه و دارورسانی موثر به بافت هدف حاصل شد. به منظور بررسی کلاژن و کامل‌نمودن مطالعه و ارزیابی بیان ژن ، از شاخص کمی RNA بافتی گروهای تحت آزمایش و شاهد، استفاده شد.

هدف از این پژوهش مقایسه استعمال سنتی آلوئه ورا، با روش‌های ذکرشده برای بیان ژن کلاژن I در پوست موش نر آزمایشگاهی است. بیان ژن در گروه شاهد با پوست سالم، از کمیت و کیفیت طبیعی برخوردار است. اما پس از میکرونیدلینگ، پوست حیوانات تحت آزمایش تخریب شد و میزان بیان ژن کلاژن I در آن‌ها به حداقل رسید. در این مطالعه، به مقایسه تیمارها در گروهای تحت آزمایش پرداخته شد تا نقش پانسمان نانوالیاف و ژل آلوئه ورا ، بر تعدیل و بیان ژن کلاژن I، به منظور ترمیم و جوان سازی پوست پس از میکرونیدلینگ معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

گروه بندی حیوانات: در این مطالعه تجربی از ۲۴ سر موش سوری نر، نژاد *Balb/c* در محدوده وزنی ۲±۲۲ گرم مورد استفاده شد. حیوانات در چهار گروه مستقل شش‌تایی به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند: ۱- شاهد، ۲- میکرونیدلینگ با تیمار سالین (مدل)، ۳- میکرونیدلینگ با تیمار ژل آلوئه‌ورا

٤- میکرونیدلینگ با تیمار نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا. جهت رعایت اصول اخلاق پژوهشی، دستوالعمل شماره‌ی ۷۰۰/۱۰۲۸/ د تاریخ ۱۳۹۷/۳/۲۳ کمیته اخلاق مد نظر قرار گرفت. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد و دوره‌ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با شرایط آب و تغذیه ی قابل دسترسی نگهداری شدند. در ادامه گروه مدل و گروه‌های تحت آزمایش، به کمک ترکیب دارویی شامل کتامین، گزایلازین و روش تزریق درون صفاقی بی‌هوش شدند و پس از تراشیدن موهای پشت، پوست آن‌ها میکرونیدلینگ شد. در دوره ٤٨ ساعته، هر ٢٤ ساعت ، یک بار تیمار انجام‌گرفت.

سنتز نانوالیاف: برای سنتز نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا، از ژلاتین و ژل‌پودر آلوئه ورا استفاده شد. ابتدا محلول ده درصد حجمی ژلاتین‌گاوی با استیک‌اسید ۹۰ درصد آماده‌شد. سپس محلول ۵ درصد وزنی ژل پودر آلوئه‌ورا نیز با استیک اسید ۹۰ درصد تهیه شد. از ترکیب برابر حجمی محلول‌های ساخته شده، محلول سوم بدست آمد. محلول درون سرنج ml ۵ مکیده و در دستگاه الکتروریسی بارگذاری شد. نانوالیاف با سرعت جمع‌آوری ml/ sec ۰/۵ و چرخش rpm ۱۰۰ و ولتاژ kv ۱۵ در بازه زمانی ٤ ساعت بر روی فویل آلومینیومی جمع‌آوری شدند.

نمونه‌برداری: به منظور بررسی‌های ملکولی پس از بی‌هوشی هر حیوان، نمونه‌رداری با کمک پانچ ۳ میلی‌متری انجام گرفت.

استخراج mRNA کل: جهت بررسی بیان ژن، ابتدا استخراج RNA بافتی هر حیوان طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن آلمان)، استخراج گردید. به بافت مورد نظر ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر کیازول اضافه شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۸۰- قرار گرفت. پس از آن پلاک موجود در کرایوتیوب توسط سرسمپلر خرد شد و بعد از آن پیپتاژ گردید. سپس حدود ۱۰۰میکرولیتر کلروفرم اضافه شد تا سلول ها شکافته شوند. پس از ۱ دقیقه، محلول، با دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در آن سه بخش رویت شد: بخش شفاف در بالای لوله، حاوی RNA، بخش سفید رنگ در میانه لوله، حاوی بافت تجزیه شده و بخش صورتی رنگ در پایین لوله، حاوی کیازول. بخش شفاف به آرامی برداشته شد و در یک میکروتیوب قرار گرفت. سپس ۱ml ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه به هم زده شد. ایزوپروپرانول و RNA شفاف هستند اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می‌آورند. پس از افزودن ایزوپروپرانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور g۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ، مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ml الکل ۷۰ درصد اضافه گردید. پس از سر و ته کردن محلول در لوله سر بسته، به مدت ۱۰ دقیقه با دور g۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و پلاک بدست آمده در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA ، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر ٦۰ درجه بر روی پلاک ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه ی ٦۰ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

بررسی درجه خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری: در این روش با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲٦۰ نانومتر و از رابطه $C\ (\mu g/\mu l) = A۲٦۰ \times \varepsilon \times d/۱۰۰۰$ درجه خلوص نمونه‌ی RNA بررسی گردید.

مقدار ناخالصی ناشی از حضور پروتئین یا DNA ، در محلول RNA را می‌توان با محاسبه نسبت

A۲۶۰/A۲۸۰ بدست آورد. در نمونه خالص RNA، این نسبت برابر ۰/۱۵ ± ۲ و در نمونه خالص DNA برابر ۰/۱۵ ± ۱/۸ است. اگر نسبت محاسبه شده کمتر از میزان استاندارد باشد، نشان‌دهنده‌ی آلودگی با پروتئین است.

ساخت cDNA: ساختار تهیه شده در معرض فعالیت آنزیم رونوشت‌بردار معکوس قرار گرفت. آنزیم رونوشت‌بردار معکوس با اسکن نمودن رشته mRNA و با قرار دادن دئوکسی ریبو نوکلئیک در مقابل هر نوکلئوتید mRNA، منجر به سنتز DNA مکمل می‌گردد.

آماده سازی: مقدار ۲ میکروگرم Template RNA و ۱ میکرولیتر پرایمر، به ۱۲ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد، محلول حاصل برای ۵ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد نگهداری شد و سپس روی یخ قرار گرفت. سپس مقدار ٤ میکرولیتر بافر واکنش، ۱ میکرولیتر ریبونوکلئاز، ۲ میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیترآنزیم رونوشت بردار معکوس (Revese Transcrptase) به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بعد از ۵ دقیقه دمای ۷۰ درجه سانتیگراد، واکنش متوقف شد و محصول بدست آمده در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

طراحی پرایمر: در این تحقیق جهت بررسی بیان ژن کلاژن نوع I و مقایسه آن با ژن کنترل داخلی GAPDH از پرایمرهای اختصاصی با مشخصات ذیل استفاده شد، برای طراحی پرایمر از نرم‌افزار Oligo7 استفاده شد. تایید عملکرد اختصاصی ژن‌ها با BLASAT کردن در سایت NCBI انجام شد. کد دسترسی کلاژن یک NM _۰۰۷۷٤۲/٤ و طول قطعه (۲) حاصل ۱۵۱ جفت باز است.

colI-f GGACTTGTGTGAATTGTTGGGG

colI-r GTGGAGAGAGAGTAGAGAGTGG

هچنین از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. کد دسترسی NM _۰۰۱۲۸۹۷۲٦/۱ و طول قطعه حاصل ۱۲٤ جفت باز است.

Gapdh-f CCCTTAAGAGGGATGCTGCC
Gapdh-r TACGGCCAAATCCGTTCACA

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR): در واکنش زنجیره ای پلیمراز، تکثیر مولکول DNA در شرایط آزمایشگاهی است که درون لوله توسط آنزیم‌ها انجام می‌گیرد. این روش شامل چرخه‌های تکراری است که به کمک یک سری پرایمر و با حضور آنزیم پلیمراز، واکنش پلیمریزاسیون DNA الگو انجام می‌گیرد. چرخه‌ها برای تولید قطعات DNA تا مرحله‌ای انجام می‌گیرد که امکان آشکارسازی وجود داشته باشد.

Real Time PCR: هر واکنشPCR با استفاده از (PCR master mix) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One. Focter City CA، (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ٤۰ دور برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد . دمای هر دور شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. نمودار نقطه ذوب واکنش‌های PCR، جهت بررسی آلودگی‌ها در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از پرایمر اختصاصی کلاژن I استفاده شد. نسبت بیان ژن مورد بررسی و ژن کنترل داخلی، با روش مقایسه-ای چرخه آستانه (CT) مورد ارزیابی قرار گرفت. با جایگزینی داده‌ها در روابط زیر، fold change محاسبه گردید.

$$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

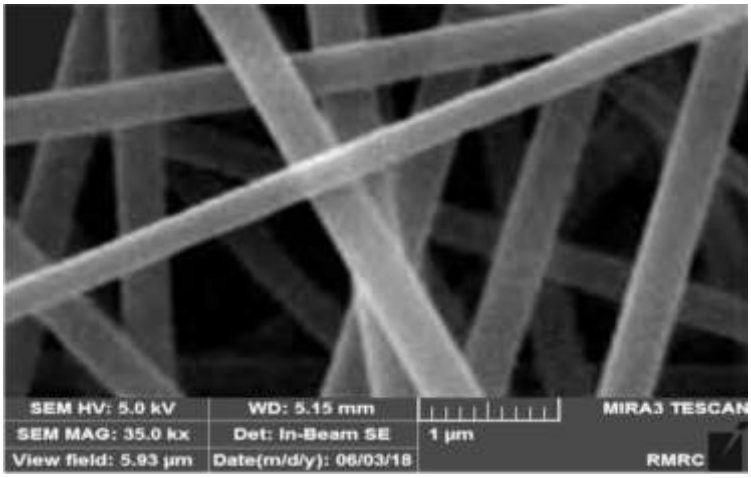
$$\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ X} - (CT_{target} - CT_{refence})_{Time}$$

برای محاسبه سطح معنی داری اختلاف بیان ژن بین گروه‌ها از آزمون ANOVA و تست Tukey استفاده شد. اختلاف بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Genex 6 انجام شد و تحلیل آماری با استفاده از نرم-افزار SPSS 21 و ترسیم نمودار با نرم افزار Graph pad prism 8 انجام گرفت.

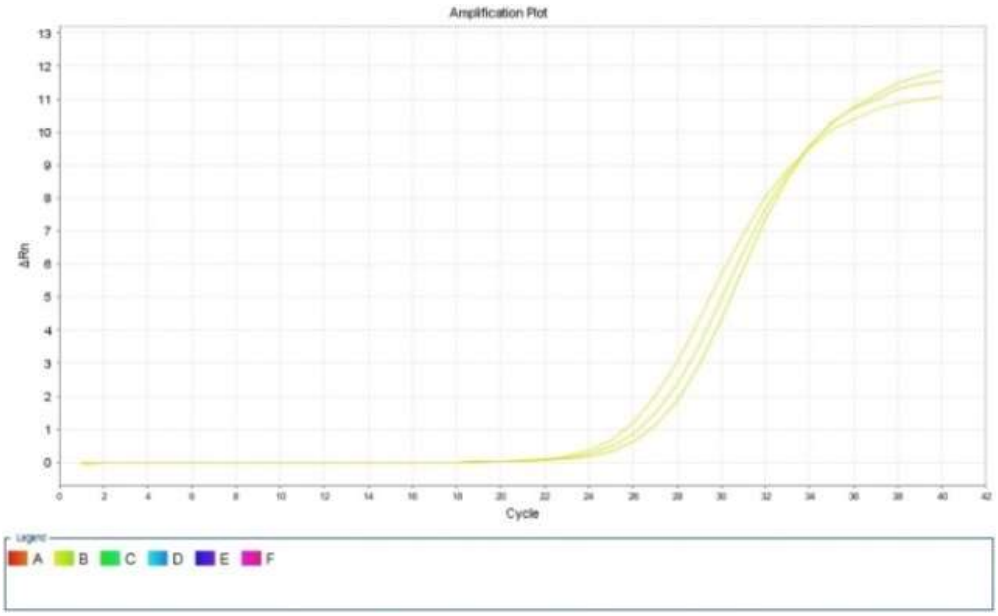
نتایج

نانوالیاف سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی مشخصه یابی شد. در شکل ۱، تصویر و اندازه نانو الیاف سنتز شده ژلاتین‌آلوئه مشخص شده است. قطر این نانوالیاف بین ۳۷۱ تا ۴۷۹ نانومتر تشخیص داده شد. تصاویر حاصل از آزمایش میکروسکوپ الکترونی SEM ساختار سه‌بعدی و منظم نانوالیاف ژلاتین آلوئه‌ورا را نشان می‌دهد. همچنین مشخص شد شکل ظاهری رشته‌های نانوالیاف ژلاتین آلوئه‌ورا، کاملا مرتب و به صورت شبکه‌ای بر روی هم قرار گرفته‌اند. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM وجود حفره‌ها، بیانگر خودآرایی رشته‌ها است.

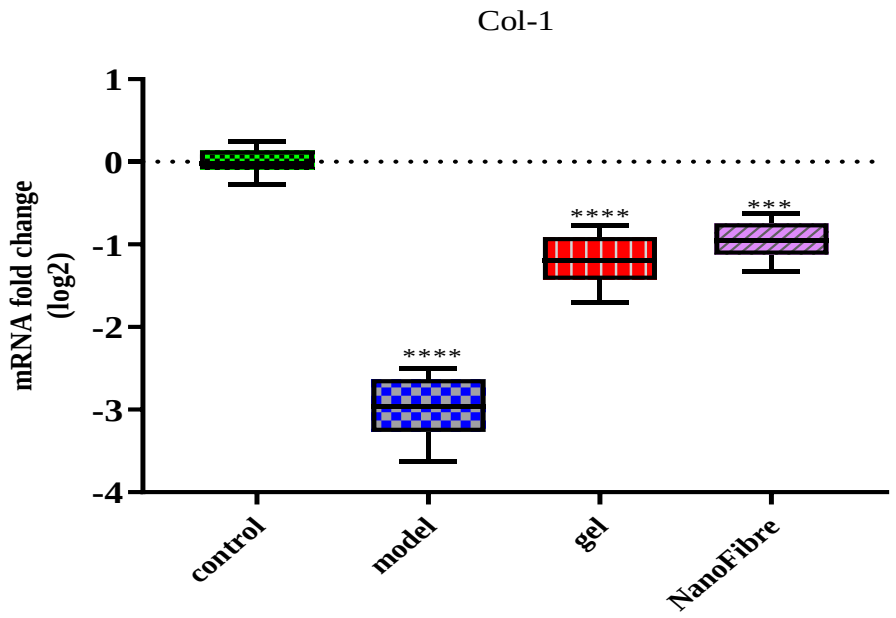
بررسی نمودار تکثیر (Ampilification): تعیین مقدار واقعی محصول Real-time PCR در هر چرخه به وسیله شدت فلورسانس نشان داده می‌شود. نمودار ۱ میزان فلورسانس آشکار شده را در برابر چرخه های انجام شده ،ا به صورت گرافیکی نشان می‌دهد. در این نمودار، شماره CT ژن کلاژن I مشخص است. تولید و تکثیر محصول، از عدد CT به بعد، به صورت لکاریتمی پیش رفت. در رسم نمودار ۲، گروه کنترل به عنوان مرجع محاسبه log2 fold change منظور شد. با توجه به نمودار، سطح بیان ژن کلاژن I، در همه گروه‌های تحت آزمایش نسبت به گروه مرجع کمتر از صفر است و بیانگر کاهش معنا دار بیان ژن کلاژن I در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل (مرجع) است. در جدول ۱ میانگین (log2 fold change) هر گروه به همراه SD ارائه شده است. برای بررسی و تحلیل اختلاف بیان ژن بین گروه‌ها از آزمون ANOVA استفاده شد. $p <$ ۰/۰۰۰۱ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در بیان ژن کلاژن I است (جدول ۲). نتایج آزمون تکمیلی Tukey، مقایسه ۲ به ۲ گروه‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. تغییرات بیان ژن در صورتی معنی دار است که $p <$ ۰/۰۵ باشد. جدول ۳ نتایج حاصل از تست Tukey را نشان می-دهد. در این جدول شدت کاهش یا افزایش بیان ژن و سطح معناداری درون گروهی مشخص شد. نتایج حاصل از این آزمون با $p <$ ۰/۰۵ بررسی شد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن کلاژن I در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد، کاهش معنا داری دارد. در مقایسه درون گروهی مشخص شد بیان ژن با تیمار آلوئه ورا و نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا ، نسبت به گروه مدل افزایش معنا داری داشت. همچنین تفاوت معنادار بین گروه تیمار نانوالیاف و ژل آلوئه ورا مشاهده نشد.



شکل ۱- تصویر SEM حاصل از نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا



نمودار ۱- نمودار تکثیر ژن کلاژن I



نمودار ۲- میزان تغییرات بیان ژن کلاژن I در تیمارهای مختلف بر اساس log2 fold change نسبت به گروه کنترل

جدول ۱- (log2 fold change) به همراه SD

	کنترل	مدل	ژل	نانوالیاف
Number of values	٦	٦	٦	٦
-ddct	۰	-۲/۹۷۷	-۱/۱۹۲	-۰/۹۵۲۱
Std. Deviation	۰/۱۷۲	۰/۳۹۹۹	۰/۳۲٤	۰/۲۳۹٤
Std. Error of mean	۰/۰۷۰٤٦	۰/۱٦۳۳	۰/۱۳۲۳	۰/۰۹۷۷۲

جدول ۲- نتایج حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه

ANOVA table	Sum.Sq	DF	mean.Sq	F.value	*p* value
Treatment	۲۷/۸	۳	۹/۲٦۷	۱۰۵/۳	*p* <۰/۰۰۰۱
Residual	۱/۷٦	۲۰	۰/۰۸۸		
Total	۲۹/۵٦	۲۳			

جدول ۳- نتایج حاصل از آزمون تعقیبی توکی

Tukey's test	Mean Diff.	*p* Value	Summary	fold change	Regulate
model vs. control	-۲/۹۷۷	<۰/۰۰۰۱	****	۰/۱۲۷۰۰۹	-۷/۸۷۳
gel vs. control	-۱/۱۹۲	<۰/۰۰۰۱	****	۰/٤۳۷٦۹٦	-۲/۲۸۵
NanoFibre vs. control	-۰/۹۵۲۱	<۰/۰۰۰۱	***	۰/۵۱٦۸۸	-۱/۹۳۵
gel vs. model	۱/۷۸۵	<۰/۰۰۰۱	****	۳/٤٤٦۱۸۵	+۳/٤٤٦

NanoFibre vs. model	۲/۰۲۵	<۰/۰۰۰۱	****	٤/۰٦۹۹۱۹	+٤/۰۷۰
NanoFibre vs. gel	۰/۲٤۰٤	۰/۵۱۱٦	Ns	۱/۱۸۱۳۲	+۱/۱۸۱

بحث

در این مطالعه نقش نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا بر بیان ژن کلاژن I مشخص شد. یافته های بدست آمده نشان از تاثیر نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا و ژل آلوئه ورا بر بیان ژن کلاژن I پس از جراحت داشت. در مقایسه گروه‌های تحت آزمایش نسبت به گروه شاهد، کاهش بیان ژن به علت تخریب بافت پوست معنادار بود. اما در مقایسه درون‌گروهی و آزمون Tukey، مشخص شد، میزان افزایش بیان ژن کلاژن I در گروه تحت آزمایش نانو الیاف و گروه تحت آزمایش ژل، نسبت به گروه مدل معنادار بود. همچنین مقایسه گروه تحت آزمایش نانوالیاف وگروه تحت آزمایش ژل آلوئه ورا تفاوت معنادار دیده نشد. دلیل استفاده از نانوالیاف ویژگی‌های قابل توجه نانوالیاف است. نانوالیاف بکار رفته با مکانیسم به دام انداختن، ذارت آیروسل را مهار کرده و الگوی مناسبی برای انتقال بخار تامین می‌کند و مانع نفوذ باکتری به سطح زخم می‌شود. این الیاف بخاطر سطح زیاد، در رسانش و حمل دارو از اهمیت برخوردار هستند (۲). همچنین در هنگام میکرونیدلینگ جراحت‌های کنترل شده‌ای در سطح پوست ایجاد شد. در این آسیب‌های بسیار ریز، خون ریزی سطحی ناچیزی انجام گرفت. بهبود جراحت با ترشح فاکتورهای رشد مانند فاکتور رشد مشتق شده پلاکت PDGF، فاکتور رشد تغییر دهنده آلفا TGFα، فاکتور رشد تغییردهنده بتا TGFβ، پروتئین فعال کننده بافت همبند، فاکتور رشد بافت همبند و فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF انجام گرفت (۱۲).

سوزن‌های ریز با تخریب رشته های قدیمی، شرایط را برای مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست‌ها در لایه‌های ماتریکس بین سلولی، نوسازی عروق و کلاژن سازی جدید مهیا می‌کند (۱۱، ۱۸) با توجه به نظر لیب (۱٦)، هنگامی که سوزن‌ها در مجاور غشا قرار می‌گیرند، پتانسیل الکتریکی غشا را از ۷۰ mv- به ۱۰۰mv- افزایش می‌یابد و این موضوع باعث فعالیت سلول و انتشار پروتئین های مختلف ، پتاسیم و فاکتورهای رشد از سلول ها به محیط خارج سلولی است و نتیجه آن ، القا کلاژن در فیبروبلاست‌ها است. بنابر این سوزن‌ها زخم واقعی ایجاد نمی‌کنند، اما سلول‌های بدن در باور آسیب، فریب می خورند (۱۵، ۱٦، ۱۸). ترمیم زخم و رسوب کلاژن جدید منجر به استحکام پوست و پر شدن جای زخم‌های آتروفیک می‌شود. در مدل‌های آزمایشگاهی میکرونیدلینگ باعث افزایش نفوذ داروها از سد پوست شده است (۳، ۲۱).

نقش فرآورده های آلوئه ورا (عصاره، ژل، پودر، محلول خوراکی) بر روند التیام زخم تایید شده است (۸). گیاه آلوئه‌ورا حاوی پلی ساکارید گلومانان بوده و غنی از مانوز است. گلومانان بر گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی اثر گذاشته و فعالیت و تکثیر این سلول ها را تحریک می کند. و این امر به نوبه خود موجب افزایش تولید و ترشح کلاژن است. موسیلاژ آلوئه ورا نه تنها میزان کلاژن را در محل آسیب افزایش می دهد بلکه با ایجاد تغییر در ساختار کلاژن ، اتصالات عرضی این رشته ها را افزایش می‌دهد و کلاژن حاصل، از مرغوبیت بهتری برخوردار می‌گردد (۷). فاکتورهای رشد شبه انسولینی در پوست نرمال به وسیله تعداد کمی از سلول های درم و اپیدرم ترشح می‌شوند اما در طی آسیب پوستی توسط اکثر سلول‌های اپیدرمی از جمله ماکروفاژها و پلاکت‌ها

ترشح می‌گردد. این خانواده از فاکتورهای رشد موجب تحریک میتوژنیک فیبروبلاست‌ها شده و در روند آنژیوژنز دخیل می‌باشند (۲۴). فاکتور های رشد انسولینی IGF به همراه سایر فاکتورها نظیر PDGF نقش مهمی در فرآیند ترمیم زخم دارند و باعث افزایش ضخامت درم و اپیدرم می‌شوند. در لایه بازال اپیدرم پوست نرمال، میزان بیان ژن IGF کم است اما این میزان در یک تا سه روز پس از بروز زخم افزایش معنی دار پیدا می‌کند (۵، ۱۳). همچنین در مطالعه‌ای مشخص شد، افزایش غیرطبیعی بیان ژن IGF در فیبروبلاست‌های آسیب دیده، موجب افزایش بیان ژن کلاژن I و تولید زنجیره پروآلفا I از کلاژن نوع I گردید. و بدین ترتیب کلاژن تولیدی ، افزایش اندازه اثر زخم را فراهم نمود (۱، ۶، ۹). فاکتورهای رشد، مسیر علامت دهی پروتئین کیناز فعال کننده میتوژن MAPK را تحت تاثیر قرار می دهند. این مسیر در ارتباط با فاکتورهای رشد است. MAPK ها در پاسخ‌های سلولی به محرک‌هایی مانند میتوژن‌ها، استرس اسمزی ، شوک حرارتی وفاکتورهای پیش‌التهابی نقش دارند. آن‌ها عملکرد سلول از جمله تکثیر، بیان ژن، تمایز، بقای سلولی و آپوپتوز را تنظیم می‌کنند. برای اتصال لیگاند نیاز به دیمریزاسیون است. در این حال تیروزین کیناز فعال شده و فسفریلاسیون انجام می‌گیرد. با فسفوریلاسیون گیرنده پروتئینی به نام GRB2 فعال می‌شود. این پروتئین به عنوان اتصال دهنده عمل می‌کند و پروتئین دیگری به نام SOS را فعال می‌کند. با فعال شدن SOS پروتئین دیگری به نام Ras فعال می‌شود. با فعال شدن Ras پروتئین دیگری به نام Raf فعال می‌شود. Raf هم، Raf کینازها را فعال می‌کند و در ادامه آبشار کینازها جریان یافته و نتیجه آن، بیان برخی ژن ها از جمله ژن کلاژن I است (۲۳).

نتیجه‌گیری

هنگام میکرونیدلینگ، جراحت‌های کنترل شده‌ای در پوست حیوانات تحت آزمایش ایجاد شد. در این مطالعه مشخص شد : ۴۸ ساعت تیمار آلوئه ورا و نانوالیاف آلوئه ورا باعث افزایش معنا دار بیان ژن کلاژن I در محل جراحت است. نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا نسبت به ژل آلوئه ورا، توانایی مهار ذرات آیروسل ، انتقال بخار، سطح مناسب برای رسانش دارو وخواص ضد باکتریایی دارند. لذا تیمار نانوالیاف ژلاتین‌آلوئه ورا می‌تواند ، بخشی از پانسمان مناسب برای ترمیم و جوان سازی پوست موش نر آزمایشگاهی بعد از میکرونیدلینگ باشد. نانوالیاف ژلاتین آلوئه ورا از طریق منافذ ایجاد شده در پوست، قابلیت تحویل گلومانان و سایر ترکیبات موثر را به صورت هدفمند و اقتصادی دارند. با ورود مواد موثر علامت دهی سلولی و مکانیزم های مرتبط، با تاثیر بر فاکتورهای رشد، باعث بیان ژن کلاژن I می گردد. البته در جوان سازی و ترمیم پوست، بیان کلاژن I و ترمیم ECM امری ضروری است.

منابع

1. AntonIades HN., Galanopoulos T., Neville CP., Andlynch S.E., 1993. Expression of growth factor and receptor mRNAs in skin epithelial cells following acute cutaneous injury. *The American Journal of pathology*, 142: 1099-1110.

2. Assimopoulou A.N., Boskou D., Papageorgiou V.P., 2004. Antioxidant activities of alkannin, shikonin and Alkanna tinctoria root extracts in oil substrates, *Food Chemistry*, 87: 433-438.

3. Badran M.M., Kuntsche J., 2009. Skin penetration enhancement by a microneedle device in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. *European Journal of Pharmaceutical sciences*, 36: 511-523.

4. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5): 585-601.

5. Bitar M.S., Labbad Z.N., 1996. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *Journal of Surgical Reserch*, 61: 113–119.

6. Bitar M.S. 2000. Insulin and glucocorticoid-dependent suppression of the IGF-I system in diabetic wounds. *Jornal of Surgery*, 127: 687-695.

7. Boudreau M.D., Beland F.A. 2006. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis (miller). Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 24(1): 103-154.

8. Chithra P., Sajithlal G.B., Chandrakasan G., 1998. Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59(3): 179-186.

9. Chu Y., Yu D., Wang P., Xu J., Li D., Ding M. 2010. Nanotechnology promotes the fullthickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair and Regeneration*, 18(5): 499-505.

10. Demchuk M.P., Ivankova O.V., Klunnyk M.O., Matiyashchuk I.G., Sych N.S. 2017. Use of fetal stem cells for Anti-Aging and Rejuvention. *Journal of Regenerative Medicine*, 6: 1.

11. Fabbrocini G., Fardella N., Monfrecola A., Proietti I., 2009. Acne scarring treatment using skin needling. *Clinical and Experimental Dermatology*, 34: 874-879.

12. Falabella A.F., Falanga V. 2001. *The Biology of the Skin*: *Parthenon*, 281-299.

13. Gartner M., Benson J.D., Caldwell M.D. 1992. Insulin-like growth factors. *Journal of Surgical Reserch*, 52: 389-394.

14. Kamolz L.P., Lumenta D.B. 2013. Dermal Replacements in General, Burn, and Plastic Surgery. Springer Publication.

15. Kloth L.C. 2005. Electrical stimulation for wound healing: A review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *International Journal Low Extremity Wounds*, 4(1): 23-44.

16. Liebl H., Kloth L.C. 2012. Skin cell proliferation stimulated by microneedles. *The Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 4: 2-6.

17. Liu C., Leung M.Y., Koon J.C., Zhu LF., Hui Y.Z., Yu B. 2006. Macro phage activation by polysaccharidebiological response modifier isolated from *Aloe vera Lvarchinensis* (Haw). *Berg International Journal Immunopharmacology*, 6(11): 1634-1641.

18. Majid I., Sheikh G., September PI,. 2014. Microneedling and its applications in dermatology. *Microneedling and its Applications in Dermatology*, 4(7): 44-49.

19. Moon E.J., Lee Y.M., Lee O.H., Lee M.J., Lee S.K., Chung M.H. 1999. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis*, 3(2): 117-123.

20. Norouzi M., Shabani, I., Atyabi, F. 2015. EGF-loaded Nanofibrous Scaffold for Skin Tissue Engineering Applications. *Fibers and Polymers*, 16: 782-787.

21. Oh J.H., Park H.H., Do K.Y., Han M., Hyun D.H., Kim C.G. 2008 Influence of the delivery systems using a microneedle array on the permeation of a hydrophilic molecule, calcein. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69: 1040-1045.

22. Oryan A., Naimi A. 2010. Effect of queues extract of aloe vera cutaneous wound healing in rat. *Veterinary Sky Archive*, 80(4): 509-522.

23. Pearson G., Robinson F., Beers G.T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22 (2) : 153–183.

24. Sabene W., Richard G. 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. Physiology *Reviews*, 83 (3): 835-870.

25. Singh R., Maelíosa T.C. McCrudden, Emma McAlister, Aaron J. Courtenay, Patricia González-Vázquez, Thakur Raghu , Ryan F. Donnelly. 2015. Microneedle applications in improving skin appearance. *Experimental Dermatology*, 24(8): 561-566.

26. Supp D.M., Boyce S.T. 2005. Engineering skinsubstitutes. *practices and potentials, Clinic in Dermatology*, 4: 203-212.

27. Verrecchia F., Mauviel A. 2007. Transforming growth factor-β and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 22: 3056-3062.

28. Wong D. J., Chang H. 2009. Skin Tissue Engineering. Stanford StemBook.