

## GROWTH FACTORS AND THEIR INFLUENCE ON THE COURSE OF WOUND HEALING DURING DIABETES

A. Bugera, N. Gregirchak

National University of Food Technologies

---

**Key words:**

Skin  
Wound healing  
Diabetes  
IGF-1  
The expression

**Article history:**

Received 20.04.2013  
Received in revised form  
01.06.2013  
Accepted 01.07.2013

**Corresponding author:**

E-mail:  
npnuht@ukr.net

---

**ABSTRACT**

IGF-1 (Insulin-like growth factor) is one of the main factors that can exert influence on the position and speed of skin regeneration process. The purpose of the research is to study the impact of characteristics of transgenic expression mIGF-1 on the rate of wound healing using microbiological and histological methods; to analyze the immunological and molecular mechanisms of mIGF-1 action in the regeneration of the skin. A morphological and molecular biological studies of skin wounds of FVB wild-type mice and transgenic animals K14/mIGF-1 having streptozotocin-induced diabetes have been conducted. The increase in the expression of IGF-1, area and thickness of the regenerating epithelium, the number of Mac-1<sup>+</sup> cells in the wound in transgenic animals compared with wild-type has been shown. Formation of hair follicles of transgenic mice having streptozotocin-induced diabetes (tgD) under the action of IGF-1 was going on intensively compared to control group animals (wt) and especially for wild-type animals having diabetes (wtD).

---

## ФАКТОРИ РОСТУ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПЕРЕБІГ ЗАГОЄННЯ РАН ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

А.Ю. Бугера, Н.М. Грегірчак

Національний університет харчових технологій

Одним із основних факторів, які можуть здійснювати вплив на стан та швидкість процесів регенерації шкіри є IGF-1 (інсуліноподібний фактор росту-1). Проведено морфологічне та молекулярно-біологічне дослідження ран шкіри мишей лінії FVB дикого типу та трансгенних тварин K14/mIGF-1 зі стрептозотоцин-індукованим діабетом. Показано збільшення експресії IGF-1, площі та товщини регенеруючого епітелію, кількості Mac-1<sup>+</sup> клітин у рані у трансгенних тварин порівняно з диким типом.

**Ключові слова:** шкіра, загоєння ран, діабет, IGF-1, експресія.

Цукровий діабет — складний розлад обміну речовин в організмі, при якому, в першу чергу, порушується обмін вуглеводів, білків, ліпідів, вітамінів і води. Цукровий діабет також негативно впливає на процеси загоєння ран, в тому числі на гемостаз, запалення та ангіогенез [1]. Ці порушення є в найрізноманітніших

тканинах, в тому числі міокарда, скелетних м'язах, нервах та шкірі. При пошкодженнях шкіри у хворих на цукровий діабет було показано зміни кровообігу, порушення антимікробної активності нейтрофілів і дисфункціональний стан запалення, пов'язаного з аномальною дією хемокінів [2].

Пошкодження шкіри ініціює серію подій, які в кінцевому підсумку призводять, принаймні до часткової, регенерації ушкодженої тканини [3]. Один з гормонів, які, як вважається, впливає на процес відновлення, є гормон росту (GH) [4]. Багато ефектів GH опосередковується через інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1) [5]. IGF-I є мітогеном для кератиноцитів, і це стимулює вироблення колагену, глікозаміногліканів і протеогліканів синтезу фібробластів шкіри. У контексті шкіри, IGF-I був визначений в якості активного паракрінного стимулятора росту, що виділяється фібробластами і макрофагами для кератиноцитів у культурі клітин для стимуляції ненаправленої міграції кератиноцитів [6]. В кератиноцитах IGF-1 стимулює проліферацію і впливає на морфогенез волосяного фолікула.

Метою дослідження є вивчення особливостей впливу експресії трансгенного mIGF-1 на швидкість загоєння ран з використанням мікробіологічних та гістологічних методів.

Експерименти були проведені на мишах-самцях лінії FVB з трансгеном K14/mIGF-1 (tg) та без нього (wt), віком 3 – 4 міс. трьох груп: дикі тварини — wt; дикі тварини з діабетом — wtD; трансгенні тварини з діабетом — tgD. Досліди проводили на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету. Тваринам внутрішньобрюшинно вводився стрептозотоцин (Sigma, 50 мг / кг) протягом 5 днів поспіль. Для експерименту були взяті тварин з рівнем глюкози > 15 ммоль/л.

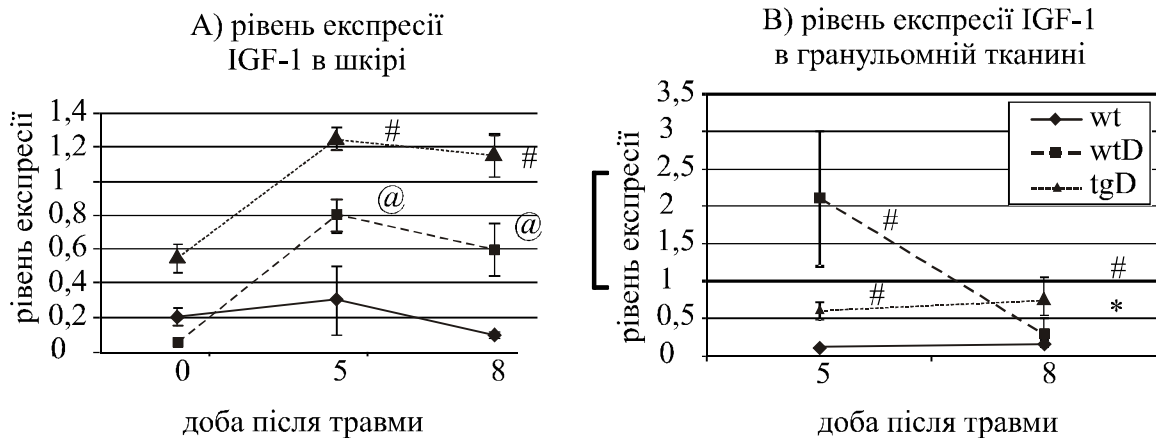
*Модель пошкоджень шкіри.* Всі маніпуляції з тваринами проводилися під кетаміновим наркозом (10 мг/кг). На спинній ділянці хутро видаляли голінням, шкіру промивали 70 % етанолом, і наносили чотири рани на всю товщину шкіри (5 мм в діаметрі). На 5 та 8 добу після травми, у дослідних тварин вирізали рану та 3 мм оточуючої шкіри, рани розрізалися навпіл: одна половина зразку була взята та оброблена для морфологічного дослідження, інша — заморожена і зберігалася при  $-80^{\circ}\text{C}$  до виділення РНК. Зовнішня частина рани та гранульозна тканина зберігалися і оброблялися окремо. Зразки шкіри/рани були переведені в парафін та отримані зрізи товщиною 7 мкм. Зрізи були проаналізовані після фарбування по Масону, трикольорове фарбування (Sigma-Aldrich).

*Виділення РНК та обробку ДНК* заую, зворотню транскрипцію та отримання кДНК проводили згідно інструкції наборів «Рибо-золь» (АмпліСенс, РФ) та Thermo Scientific, EU відповідно.

*Аналіз продуктів полімеразної ланцюгової реакції* проводили електрофорезом протягом 20 хв. Рівень експресії мРНК був стандартизований за рівнем експресії GAPDH в якості внутрішнього контролю. Статистичну обробку даних проводили методом Фішера (при  $p < 0,05$  різницю вважали достовірною).

В експериментах використовувалися трансгенні миші, яким було перенесено ген щурячого mIGF-1, що вбудований під контроль людського

промотора K14. Гібридизація *in situ* підтвердила експресію mIGF-1 трансгенів у K14-позитивних клітинах базального шару епідермісу та в зовнішній оболонці кореня і опуклій частині волосяних фолікулів [7]. У експериментах для визначення загальної експресії гена IGF-1 використовувалися праймери як для tg IGF-1, так і для продукції власного IGF-1 (рис. 1). Виявлено, що загальний рівень експресії IGF-1 гена має тенденцію до зниження в неушкодженій шкірі мишей дикого типу з діабетом і до збільшення у діабетичних трансгенних мишей порівняно з інтактними тваринами (0 доба). На 5 і 8 добу після травми експресія гену IGF-1 була значно вищою в шкірі діабетичних мишей дикого типу порівняно з 1 добою. У трансгенних тварин рівень експресії IGF-1 виявився значно вищим в шкірі і гранульомній тканині на 5 і 8 добу після травми, порівняно з інтактними мишами дикого типу (рис. 1А, В), а також в гранульомній тканині на 8 добу, порівняно з діабетичними тваринами дикого типу (рис. 1В).

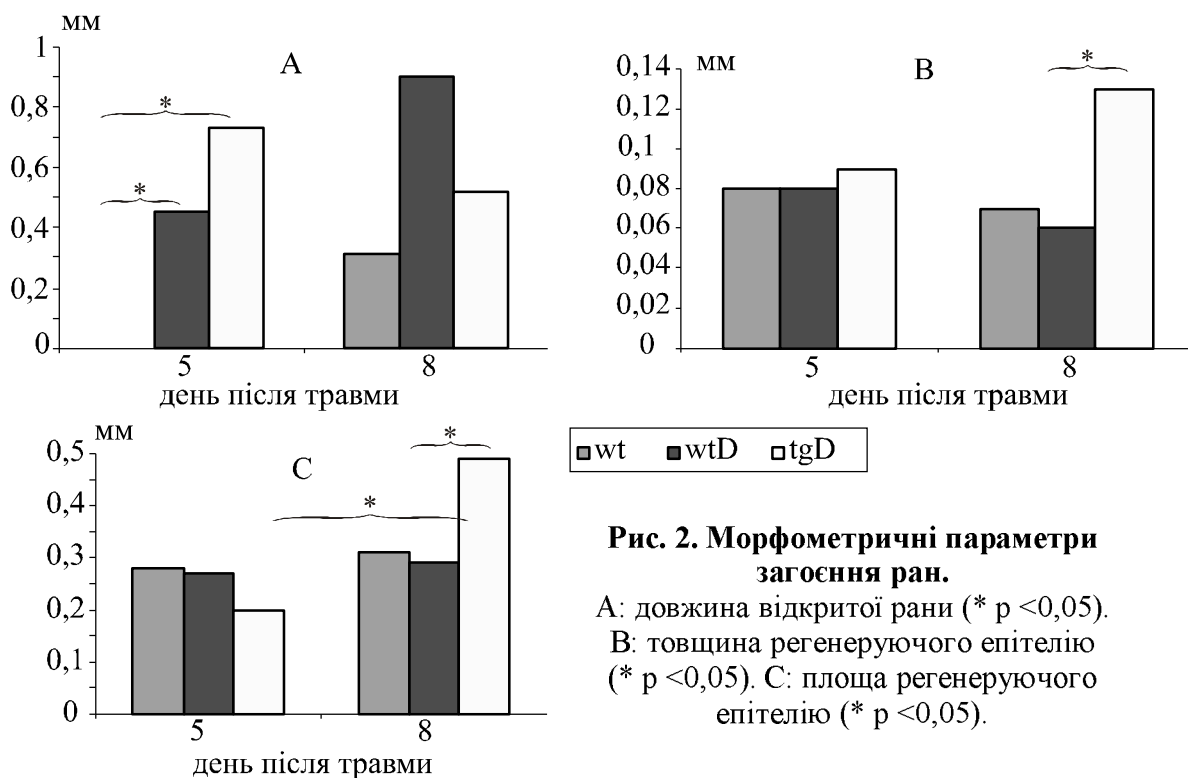


**Рис. 1. Рівень експресії IGF-1 в шкірі (А) та гранульомній тканині (Б) дослідних тварин. інший строк загоєння ран (середнє ± SE; \* — P (t) <0,05 порівняно з тою ж тканиною в групі диких тварин з діабетом; @ — P (U) <0,05 порівняно з неушкодженою шкірою тої ж групи; — P (U) <0,05 порівняно з тою ж тканиною у групі диких тварин. Відносні одиниці.**

Таким чином, досліджено, що експресія гену IGF-1 в пошкодженій шкірі значно збільшується порівняно з непошкодженою тканиною на 5 і 8 добу у мишей з діабетом. У групі трансгенних тварин з діабетом це збільшення проявилось лише як тенденція, але рівні мРНК IGF-1 в шкірі тварин цієї групи виявилися значно вищими порівняно з диким типом. На 5 добу в гранульомній тканині обох груп з діабетом експресія IGF-1 зросла, на 8 добу підвищений рівень мРНК зберігався лише в групі трансгенних мишей, і показано, що максимальний ефект від трансгену може бути протягом всього періоду загоєння.

Добре відомо, що у пацієнтів з цукровим діабетом рани загоюються погано [8]. У дослідженні, довжина відкритої рани у мишей з діабетом була значно вищою у тварин дикого типу і трансгенних тварин з діабетом порівняно з інтактними мишами на 5 добу після травми. Але довжина відкритої рани в трансгенних мишей з діабетом мала тенденцію до зниження порівняно з діабетичними тваринами дикого типу на 8 добу після травми

(рис. 2 А). Показано значні відмінності в зростанні площі регенеруючого епітелію між діабетичними тваринами дикого типу та з трансгеном на 8 добу після травми (рис. 2 С). Площа регенеруючого епітелію в трансгенних тварин збільшилася за рахунок збільшення його товщини. Крім того, відмінності за цим параметром були знайдені в групі трансгенних тварин з діабетом між 5 і 8 добою ( $p < 0,05$ ; рис. 2 С).



Морфологічні дослідження ран на 5 добу після травми, показали у всіх групах великі скупчення жирової сполучної тканини і формування гранульомної тканини на кордоні країв рани. Крім того, у тварин на 5 добу спостерігається утворення волосяних фолікулів поруч з раною. Формування волосяних фолікулів проходило інтенсивніше у трансгенних мишей зі стрептозотоцин-індукованим діабетом (tgD) порівняно з тваринами контрольної групи (wt) і особливо з діабетичними тваринами дикого типу (wtD). У всіх групах тварин на 8 добу, після нанесення ран спостерігалось значне формування гранульомної тканини і збільшення кількості фіброзного компоненту [9].

Збільшення проліферації епітеліальних клітин у рані показано для всіх груп на 5 та 8 добу. Не знайдено значних відмінностей у експресії Ki67<sup>+</sup> (рис. 3). Експресія Ki67<sup>+</sup> в основному спостерігалася в базальних клітинах, меншою мірою в шиповидних клітинах. Також велика кількість Ki67<sup>+</sup> клітин спостерігалася у волосяних фолікулах. Значної різниці в кількості Ki67<sup>+</sup> епітеліальних клітин між 5 та 8 добою після нанесення травми в усіх досліджуваних групах не виявлено.

Встановлено, що загоєння ран у трансгенних мишей з діабетом супроводжується прискороною реепітелізацією — більшою товщиною та площею регенеруючого епітелію, що відповідає даним, отриманим раніше [10]. Від-

мінностей в кількості Ki67<sup>+</sup> клітин та CD-31<sup>+</sup> ендотеліальних клітин між трансгенними і дикими тваринами з діабетом не знайдено, проте показано підвищення рівня експресії гена VEGF в гранульомній тканині трансгенних тварин з діабетом порівняно з диким типом. Цей факт дозволяє припустити, що, незважаючи на відсутність відмінностей у кількості CD31<sup>+</sup> клітини, інтенсивність ангиогенезу в гранульомі трансгенних мишей може бути вищою.

Прискорена реепітелізація у IGF-1 трансгенних мишей може виникнути внаслідок прямого впливу mIGF-1 на кератиноцити або завдяки непрямому ефекту, який опосередковується через строму. У ранній фазі процесу відновлення, клітини запалення є особливо важливими регуляторами міграції та проліферації кератиноцитів [11]. Під час дослідження спостерігалось збільшення кількості моноцитів/макрофагів (Mac-1<sup>+</sup>) і гранулоцитів (Gr-1<sup>+</sup>) (рис. 4) в гранульомній тканині диких тварин з діабетом

на 8 добу після травми, та тенденція до зменшення їх кількості у трансгенних мишей з діабетом. Значно більша їх кількість потрапляла в рану у тварин дикого типу з діабетом шляхом інтенсивної інфільтрації через стінки капілярів. Можна припустити, що більша кількість моноцит/макрофагів та гранулоцитів в рані тварин з діабетом, говорить на користь посилення запальних процесів [12]. В той же час, трансгенний IGF-1 не має істотного впливу на величину цього процесу.

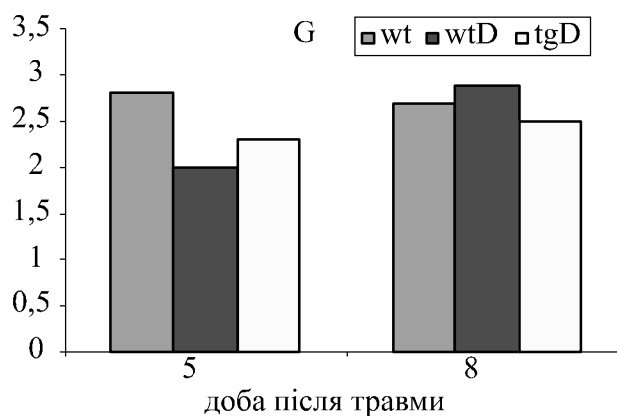


Рис. 3. Ki 67<sup>+</sup> клітини у регенеруючій рані мишей дикого типу, дикого типу з діабетом і трансгенних тварин з діабетом, на 5 добу після травми.

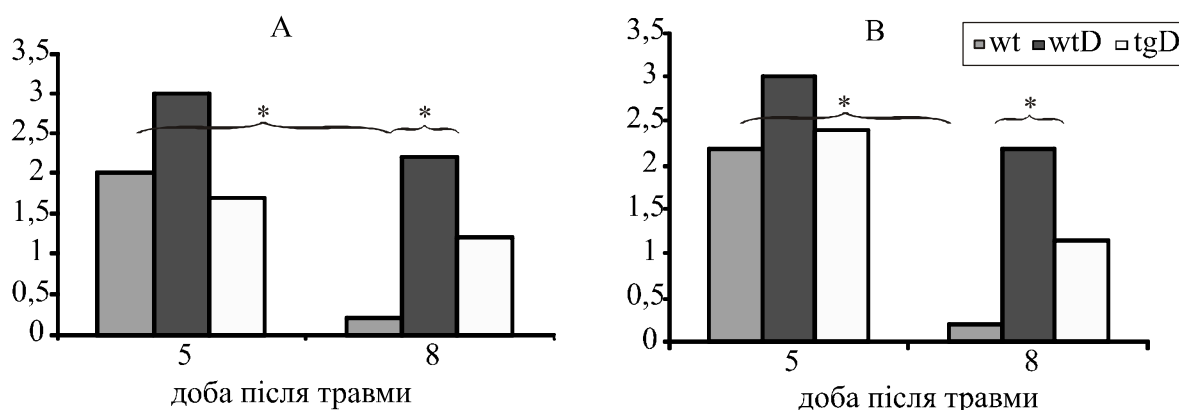


Рис. 4. А: Mac1<sup>+</sup>-клітини (коефіцієнт Каплова) в ранах тварин різних груп (\* p < 0,05). В: Gr-1<sup>+</sup>-клітини в ранах тварин різних груп (\* p < 0,05).

## Висновки

1. Досліджено, що загальний рівень експресії IGF-1 рівня експресії гена має тенденцію до зниження в неушкодженій шкірі мишей дикого типу з діабетом і до збільшення у діабетичних трансгенних мишей порівняно з інтактними тваринами (0 доба).

2. Виявлено, що на 5 і 8 добу після травми експресія гену IGF-1 вища (на 0,7 та 0,5 у.о. відповідно) в шкірі діабетичних мишей дикого типу порівняно з першою добою.

3. Показано, що K14m/IGF1 миші з діабетом характеризуються значним збільшенням експресії IGF-1 в гранульомній тканині на 8 добу після травми порівняно з мишами дикого типу. Цей період характеризується значним збільшенням площі та товщини регенеруючого епітелію, але достовірної різниці між трансгенними тваринами та тваринами дикого типу не знайдено.

4. Виявлено, що основною причиною незагоєння ран у хворих на цукровий діабет є недостатня кількість кровоносних судин та їх пошкодження. Дія IGF-1 може вплинути на міграцію кератиноцитів через/ або антигенез в рані.

### **Література**

1. Каминский А.В., Коваленко А.Н. Сахарный диабет и ожирение: клиническое руководство по диагностике и лечению. — К.: Издательство, 2010. — 256 с.

2. Spafford D., Hemmings S.J. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2009. — 32, №1. — P. 905 – 919.

3. Shin H.C, Bae Y.K, Gu M.J, Jung E.S, Oh Y.H. Expression of Insulin-Like Growth Factor 1 and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor is Associated with the Favorable Clinicopathologic Parameters in Small Intestinal Carcinomas. // New York: John Wiley. — 2012. — P.491.

4. Alegre C, Casanueva F.F., Cuatrecasas G. GH/IGF1 axis disturbances in the fibromyalgia syndrome: is there a rationale for GH treatment? //Boston Kluwer Academic Publishers. — 2013. — 100. — P. 633 – 639.

5. Ballantyne GH, Wasielewski A, Saunders JK. The Surgical Treatment of Type II Diabetes Mellitus: Changes in HOMA Insulin Resistance in the First Year Following Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass (LRYGB) and Laparoscopic Adjustable Gastric Banding (LAGB). *Obes Surg.* — 2009. — P. 1297 – 303.

6. Jain S, Desai N, Bhangoo A. Pathophysiology of GHRH-growth hormone IGF-1 axis in HIV/AIDS // Boston: Kluwer Academic Publishers. — 2013. — №2(5). — P. 204 – 208.

7. Dyar K.A, Milan G, Mammucari C, Meskers C.G. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. — 2013. — 101. — P. 68 – 81.

8. Mercandetti M. Wound Healing: Healing and Repair / Mercandetti M., Cohen A.J.// Emedicine Accessed. – 2008. — P. 56 .

9. Nguyen D.T. The Pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration / Nguyen D.T., Orgill D.P., Murphy G.F. // Cambridge. — 2009. — P. 25 – 57.

10. Rodríguez F.M, Salvetti N.R, Colombero M, Stangaferro M.L, Barbeito C.G, Ortega H.H, Rey F. Interaction between IGF1 and IGF1-BPs in bovine cystic ovarian disease. // J Surg Res. — 2012. — 58. — P. 449 – 459.

11. Semenova E, Koegel H, Hasse S, Klatte JE, Slonimsky E, Bilbao D, Paus R, Werner S, Rosenthal N. Overexpression of mIGF-1 in keratinocytes improves wound healing and accelerates hair follicle formation and cycling in mice // The American J. Pathology. — 2008. — №173(5). — P. 1295 – 1310.

12. Takahashi S., Tochigi M, Moriwaki A, Takeuchi S. Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) mRNA Expression in the Uterus of Streptozotocin (STZ)-treated Diabetic Mice // Americal journal of physiology. — 2013. — P. 1522 – 1555.

## **ФАКТОРЫ РОСТА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ХОД ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

**А.Ю. Бугера, Н.Н. Грегирчак**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Одним из основных факторов, которые могут осуществлять влияние на состояние и скорость процессов регенерации кожи является IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1). Проведено морфологическое и молекулярно-биологическое исследование ран кожи мышей линии FVB дикого типа и трансгенных животных K14/mIGF-1 со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Показано увеличение экспрессии IGF-1, площади и толщины регенерирующего эпителия, количества Mac-1<sup>+</sup> клеток, в ране у трансгенных животных в сравнении с диким типом.*

**Ключевые слова:** *кожа, заживление ран, диабет, IGF-1, экспрессия.*