

تنظیم واگرای تکثیر سلولی و بیان ژن COL1A1 توسط پلی دئوکسی ریبونوکلئوتیدها (PDRN) و منیزیم اسکوریل فسفات در فیروبلاست‌های پوستی انسان

محمد اسفندیاری^{۱*}حمیدرضا احمدی‌آشتیانی^{۱،۲*}حسین رستگار^۳مهدی هدایتی^۴

زمینه و هدف: فیروبلاست‌های پوستی انسان (HDFs) تنظیم‌کننده‌های کلیدی هموستاز پوست از طریق بازسازی ماتریکس خارج سلولی هستند. پلی دئوکسی ریبونوکلئوتیدها (PDRN) و منیزیم اسکوریل فسفات (MAP) به‌عنوان عوامل ترمیم‌کننده پوست شناخته می‌شوند؛ اما اثرات مولکولی آن‌ها بر HDFs به‌طور کامل مشخص نشده است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات مستقل PDRN و MAP بر تکثیر سلولی و بیان ژن کلاژن نوع یک در HDFs انجام شده است.

روش اجرا: رده سلولی HDF تحت تیمار با PDRN و MAP قرار گرفته و زنده‌مانی سلولی توسط آزمون MTT در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. براساس نتایج زنده‌مانی، غلظت‌های بهینه PDRN (۱۰۰ ng/ml) و MAP (۲۵۰ µg/ml) انتخاب شده و ۷۲ ساعت پس از تیمار، سطح بیان ژن‌های KI-67 و COL1A1 با آزمون qPCR بررسی گردید ($P < 0.05$).

یافته‌ها: نتایج زنده‌مانی سلولی پاسخ‌های وابسته به زمان و دوز معناداری را برای هر دو ماده نشان دادند. در سطح مولکولی، تیمارهای مستقل با PDRN و MAP بیان ژن KI-67 را افزایش دادند که تأییدکننده بهبود ظرفیت تکثیر سلولی است. در مقابل و به‌صورت واگرا بیان ژن COL1A1 تحت همین شرایط تیماری به‌طور معناداری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: PDRN و MAP یک پاسخ واگرا در HDFs القا می‌کنند؛ به‌طوری که ضمن تقویت فعالیت میتوژنیک، فیروژنز و بیان COL1A1 را سرکوب می‌نمایند. این برنامه‌ریزی سلولی، پتانسیل درمانی این ترکیبات را در رویکردهای ضد فیروتیک و ترمیم زخم بدون اسکار نشان می‌دهد. البته انجام مطالعات In Vivo برای تأیید نهایی این یافته‌ها ضروری است.

کلیدواژه‌ها: پلی دئوکسی ریبونوکلئوتیدها، اسکوربات - ۲ - فسفات، فیروبلاست‌ها، تکثیر سلولی، ماتریکس خارج سلولی

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۱۰/۲۵

پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۴۰۴، دوره ۱۶ (۴): ۲۲۵-۲۳۴

۱. گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم و فناوری فرآورده‌های آرایشی، بهداشتی و شوینده، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی، سازمان غذا و داروی ایران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده بیولوژی مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشگاه علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

حمیدرضا احمدی‌آشتیانی

تهران، خیابان دکتر شریعتی، خیابان یخچال
پست الکترونیک:

ahmadihr@iaui.ac.ir

تعارض منافع: اعلام نشده است.

مقدمه

می‌شود، پروتئین ساختاری غالب درم را تشکیل داده و پایداری مکانیکی آن را تعیین می‌کند^۱، درحالی که ژن KI-67 به‌عنوان یک نشانگر استاندارد و شناخته‌شده برای تکثیر سلولی در نظر گرفته می‌شود^۳. ترکیبات زیست‌فعالی که موجب افزایش بقای فیروبلاست‌ها و تعدیل بیان ژن‌های مرتبط با ماتریکس خارج سلولی

فیروبلاست‌های پوستی انسان (HDFs) تنظیم‌کننده‌های اصلی هموستاز پوست به شمار می‌روند که با هدایت سنتز ماتریکس خارج سلولی (ECM)، رسوب کلاژن و بازآرایی بافتی، نقش حیاتی در یکپارچگی و ترمیم پوست ایفا می‌کنند^۱. کلاژن نوع یک، که در درجه اول توسط ژن COL1A1 کدگذاری

می‌شوند، توجه فزاینده‌ای را در تحقیقات درماتولوژیک و پزشکی بازساختی به خود جلب کرده‌اند.^۴ در این میان، پلی‌دئوکسی‌ریبونوکلئوتیدها (PDRN) و منیزیم آسکوربیل فسفات (MAP) به‌عنوان گزینه‌هایی امیدبخش جهت کاربردهای ترمیمی در پوست و اثرات ضدپیری مطرح شده‌اند.^{۵،۶} ترکیب PDRN که ترکیبی از پلیمرهای دئوکسی‌ریبونوکلئوتید است، از طریق فعال‌سازی گیرنده آدنوزینی A2A و حمایت از مسیر بازیافتی، موجب تحریک ترمیم بافتی، رگ‌زایی و تکثیر سلولی می‌شود.^{۷،۸} از سوی دیگر، MAP به‌عنوان یک مشتق پایدار ویتامین C، با ایفای نقش کوفاکتوری برای آنزیم‌های پرولیل و لیزیل هیدروکسیلاز در سطح پس از ترجمه، نقشی مهمی در سنتز کلاژن ایفا می‌کند؛ ضمن آنکه با اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانی، سلول‌های پوستی را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌نماید.^۹ درک نحوه تأثیر این عوامل بر بیولوژی فیبروبلاست‌ها، ارزش کاربردی و بالقوه بالایی در حوزه‌های بالینی و زیبایی دارد.^۹

علی‌رغم شواهد موجود مبنی بر فعالیت‌های بیولوژیک PDRN و MAP، اثرات مقایسه‌ای آن‌ها بر فیبروبلاست‌های پوستی همچنان تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. بیشتر مطالعات پیشین، عمدتاً بر پیامدهای بالینی یا شاخص‌های عملکردی مجزا نظیر بقای سلولی متمرکز بوده‌اند و فاقد ارزیابی‌های یکپارچه ترانسکرپتومیک (نسخه‌برداری) برای ژن‌های مرتبط با تکثیر و تولید کلاژن هستند؛^{۱۰} به‌ویژه، ارزیابی‌های مقایسه‌ای تحت شرایط آزمایشگاهی یکسان برای نشانگرهایی نظیر KI-67 و COL1A1 بسیار محدود است.^{۱۱} این خلأ علمی، دستیابی به یک درک مکانیسمی دقیق از نحوه تأثیر این عوامل بر بازسازی بافت پوست در سطح مولکولی را محدود می‌سازد.

رابطه میان پیام‌رسانی تکثیری و بیان ژن کلاژن در فیبروبلاست‌ها لزوماً یک رابطه خطی یا هم‌گام نیست.

درحالی که MAP هیدروکسیلاسیون کلاژن را در سطح پس از ترجمه تقویت می‌کند، تأثیر آن بر رونویسی COL1A1 در صورت تجمع کلاژن عملکردی در محیط، ممکن است مشمول مکانیسم‌های بازخورد منفی گردد. به‌طور مشابه، فعال‌سازی گیرنده A2A با واسطه PDRN ممکن است در مراحل اولیه درمان، برنامه‌های رونویسی تکثیری را بر مسیرهای فیبروژنیک ترجیح دهد. این ملاحظات نشان می‌دهند که پاسخ‌های تکثیری و مسیرهای مرتبط با کلاژن، تحت شرایطی خاص، می‌توانند از منظر مکانیسمی از یکدیگر تفکیک شده و مستقل عمل کنند.

مطالعه حاضر با هدف رفع این خلأ علمی، به بررسی و تعیین ویژگی‌های اثرات مستقل PDRN و MAP بر فیبروبلاست‌های پوستی انسان می‌پردازد. در این پژوهش، ما ارزیابی عملکردی فعالیت متابولیک (با انجام آزمون MTT) را با پروفایل رونویسی ژن‌های KI-67 و COL1A1 تحت شرایط درمانی کنترل‌شده، تلفیق نمودیم. فرضیه ما بر این استوار بود که PDRN و MAP مسیرهای تکثیری و فیبروژنیک را به شکلی متمایز تنظیم می‌کنند؛ امری که به‌طور بالقوه منجر به پاسخ‌های رونویسی واگرا می‌شود؛ جایی که افزایش تکثیر سلولی لزوماً با بیان هم‌گام ژن COL1A1 هم‌سو نیست. این رویکرد یکپارچه، بینشی مکانیسمی فراتر از سنجش‌های معمول بقای سلولی فراهم آورده و امکان ارزیابی دقیق‌تر ترکیبات فعال درماتولوژیک را میسر می‌سازد.

روش اجرا

کشت سلولی

رده سلولی فیبروبلاست پوستی انسان با شناسه (ATCC PCS-201-041) از بانک ملی ژن ایران (انستیتو پاستور، تهران، ایران) تهیه و پیش از آغاز آزمایش‌ها، عدم آلودگی به مایکوپلاسما با استفاده از آزمون PCR تأیید شد. سلول‌ها در محیط کشت

میلی لیتر برای PDRN و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر برای MAP) انتخاب شدند. در ادامه، سه گروه آزمایشی شامل گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه تیمار با PDRN و گروه تیمار با MAP جهت کمی سازی بیان ژن های KI-67 و COL1A1 در نقطه زمان ۷۲ ساعت با استفاده از تکنیک qPCR تشکیل گردید.

سنجش بقای سلولی (MTT)

بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد. به طور خلاصه، سلول های HDF با تراکم 1×10^4 سلول در هر چاهک پلیت های ۹۶ خانه کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت جهت اتصال به بستر انکوبه شدند. سپس، سلول ها با غلظت های مختلفی از MAP و PDRN به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار گردیدند. گروه های کنترل شامل سلول های بدون تیمار بودند که در محیط کشت استاندارد نگهداری شدند. پس از پایان دوره تیمار، محیط کشت با ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر) جایگزین و پلیت ها به مدت ۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کریستال های فورمازان توسط سلول های فعال از نظر متابولیکی تشکیل و سپس در ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید حل شدند. در نهایت، میزان جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان (BIO-RAD, USA) قرائت و درصد بقای سلولی نسبت به گروه کنترل محاسبه شد. تمامی آزمایش ها در سه تکرار فنی انجام گرفت.

استخراج RNA و واکنش qPCR

RNA تام از سلول های HDF تیمار شده و گروه کنترل، با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت زیست فناوری پیشگام (ایران) و تحت شرایط عاری از آنزیم های تجزیه کننده RNA، مطابق با دستورالعمل سازنده استخراج گردید. سپس، DNA مکمل با بهره گیری از کیت رونویسی معکوس SMOBIO سنتز شد. واکنش qPCR در دستگاه

DMEM (ایده زیست، ایران) غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco Invitrogen Corporation, CA, USA) و ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین (ایده زیست، ایران) کشت داده شدند. سلول ها در انکوباتور مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسید کربن نگهداری شدند^{۱۲}. محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض گردید. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۷۰٪ الی ۸۰٪، سلول ها با استفاده از تریپسین - EDTA ۰/۲۵٪ (ایده زیست، ایران) پاساژ داده شدند. به منظور اطمینان از یکنواختی نتایج و به حداقل رساندن خطاهای ناشی از پیری سلولی، تمامی آزمایش ها منحصراً بر روی سلول های پاساژ ۴ انجام گرفت.

طراحی تیمارها

جهت ارزیابی اثرات مستقل MAP و PDRN بر فیبروبلاست های پوستی انسان (HDFs)، یک طراحی آزمایشگاهی دومارحله ای به کار گرفته شد (جدول ۱). در مرحله نخست، به منظور تعیین دوزهای زیست فعال و غیرسمی، بقای سلولی در محدوده وسیعی از غلظت های PDRN (۲۰۰-۵۰ نانوگرم در میلی لیتر) و MAP (۲۵۰-۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از آزمون MTT ارزیابی گردید. در مرحله دوم، براساس نتایج حاصل از سنجش بقای سلولی، دوزهای بهینه (۱۰۰ نانوگرم در

جدول ۱: طراحی آزمایش و غلظت تیمارهای مورد بررسی.

مرحله	آزمون	تیمار	غلظت های مورد بررسی	نقاط زمانی
۱	MTT	PDRN	۰ (کنترل)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت
	MTT	MAP	۰ (کنترل)، ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت
۲	qPCR	کنترل	بدون تیمار	۷۲ ساعت
	qPCR	PDRN	۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۷۲ ساعت
	qPCR	MAP	۲۵۰ نانوگرم در میلی لیتر	۷۲ ساعت

iCycler (BIO-RAD, USA) و با استفاده از سیستم فلورسانس SYBR Green انجام پذیرفت. آماده سازی مخلوط واکنش و شرایط چرخه های حرارتی براساس دستورالعمل شرکت سازنده تنظیم گردید. پس از پایان تکثیر، منحنی ذوب برای تمامی واکنش ها رسم شد تا اختصاصیت محصولات تکثیر یافته تأیید شده و از عدم وجود دایمرهای پرایمر اطمینان حاصل گردد. تغییرات نسبی در بیان ژن های هدف با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ - ۲ محاسبه شد. ژن بتا - ۲ - میکروگلوبولین (B2M) به عنوان ژن مرجع جهت نرمال سازی داده ها انتخاب گردید؛ چراکه مطالعات نشان داده اند بیان آن در فیبروبلاست های پوستی انسان بسیار پایدار بوده و تحت تأثیر تغییرات متابولیکی، تیمارهای آنتی اکسیدانی یا فاکتورهای بازآرایی ماتریکس خارج سلولی قرار نمی گیرد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است.

آنالیز آماری

داده های حاصل از سنجش بقای سلولی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از سه تکرار فنی بیان شده اند. آنالیز آماری داده های بقای سلولی با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism و از طریق آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی انجام گرفت. برای آنالیز داده های qPCR، با توجه به ماهیت لگاریتمی مقادیر چرخه آستانه و الزامات آماری خاص در کمی سازی نسبی، از نرم افزار Relative Expression Software Tool (REST©) استفاده شد. نرم افزار REST از یک آزمون آماری به نام Pair-Wise Fixed Reallocation Randomisation

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز qPCR.

نام ژن	نام پرایمر	توالی ۵' به ۳'
B2M	Human-B2M-F	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT
	Huamn-B2M-R	CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA
Col1A1	Huamn-Col1a1-F	AAGGGACACAGAGGTTTCAG
	Huamn-Col1a1-R	ATCATTTCCACGAGCACCA
KI-67	Huamn-KI67-F	TCCCGCCtGTTTTCTTTCTTGAC
	Huamn-KI67-R	CTCTCCAAGGATGATGATGCTTTAC

Test بهره می برد^{۱۳} که به طور ویژه برای آنالیز داده های qPCR بهینه سازی شده است و برخلاف آزمون های پارامتریک استاندارد در نرم افزار Prism، نیازی به پیش فرض نرمال بودن توزیع داده ها ندارد. معنی داری آماری تغییرات بیان ژن توسط شاخص P (H1) (احتمال فرض مقابل) به همراه فواصل اطمینان ۹۵٪ تعیین گردید.

یافته ها

ارزیابی بقای سلولی و تعیین دوز بهینه (سنجش MTT)

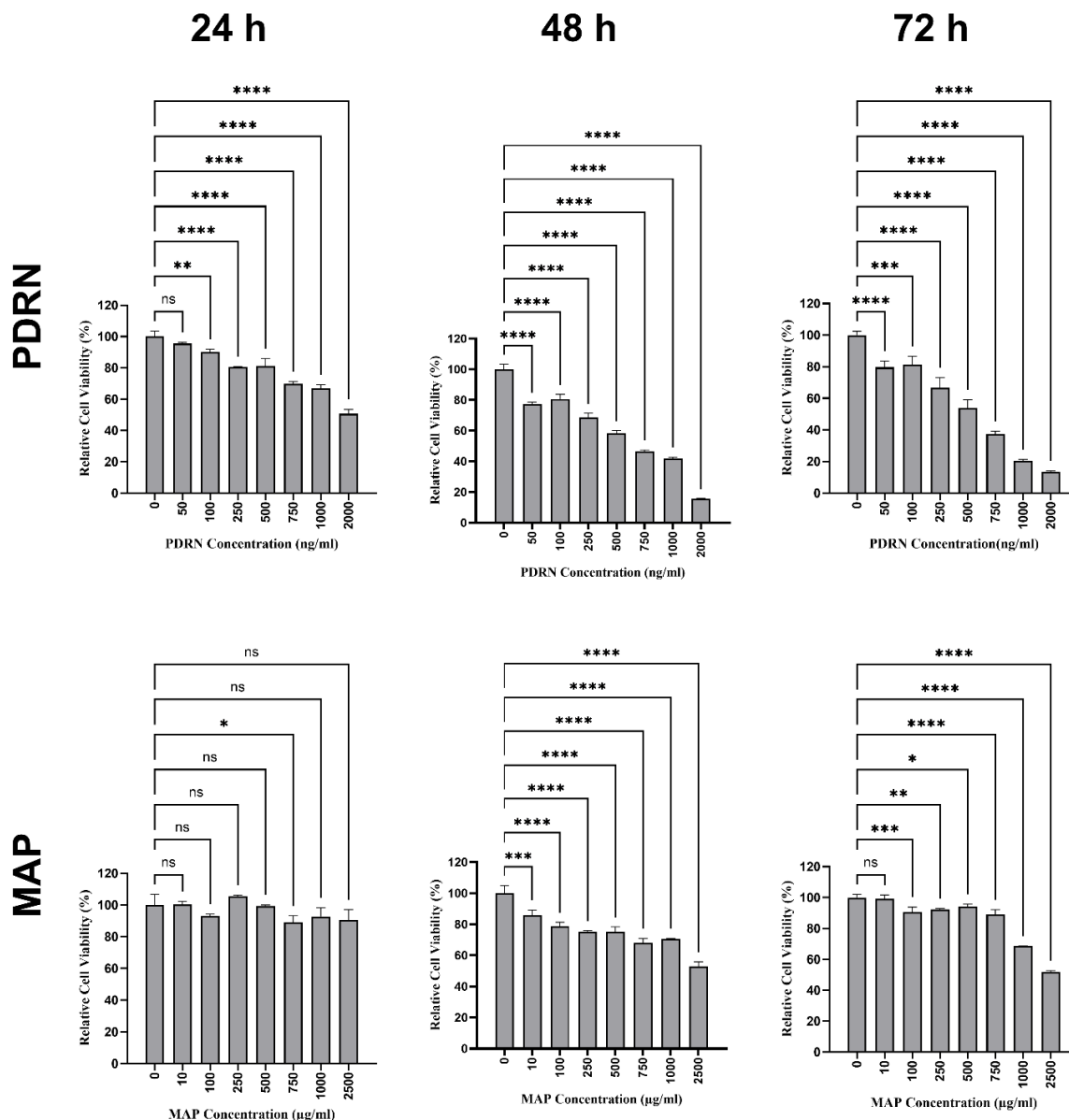
به منظور تعیین دوزها و زمان های بهینه جهت انجام آنالیزهای مولکولی و جلوگیری از سمیت سلولی، تأثیر غلظت های مختلف PDRN و MAP بر میزان بقای فیبروبلاست های پوستی انسان در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش رنگ سنجی MTT ارزیابی شد (شکل ۱). نتایج حاکی از یک الگوی وابسته به دوز و زمان در پاسخ سلولی بود. براساس داده های به دست آمده، غلظت های ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر برای PDRN و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای MAP به عنوان دوزهای بهینه انتخاب گردیدند. این غلظت ها، ضمن حفظ بالاترین میزان بقای سلولی و عدم بروز سمیت، شرایط ایده آلی را برای بررسی تغییرات بیانی ژن ها فراهم ساختند. همچنین، زمان ۷۲ ساعت به عنوان نقطه زمانی بهینه برای ارزیابی های مولکولی برگزیده شد؛ چراکه در این مقطع، پاسخ های سلولی به یک وضعیت پایدار رسیده و فرصت کافی برای فعال سازی مسیرهای رونویسی پیچیده، از جمله سنتز کلاژن، بدون تأثیر منفی بر بقای سلولی مهیا

می‌گردد.

بررسی بیان ژن نشانگر تکثیر سلولی (KI-67)

سنجش بقای سلولی و فعال‌سازی چرخه سلولی، میزان بیان mRNA ژن KI-67 (به‌عنوان یک مارکر شناخته‌شده تکثیر سلولی در فازهای فعال) سنجیده

جهت ارزیابی ارتباط میان نتایج به‌دست‌آمده از



شکل ۱: بررسی اثرات وابسته به دوز و زمان PDRN و MAP بر بقای فیبروبلاست‌های پوستی انسان. بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با تیمارها ارزیابی شد. داده‌ها به‌صورت درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل (معادل ۱۰۰٪) بیان شده‌اند. ردیف اول میزان بقای نسبی سلول‌های HDF تیمار شده با غلظت‌های مختلف PDRN در محدوده ۰-۲۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. ردیف دوم نیز میزان بقای نسبی سلول‌ها پس از تیمار با MAP در غلظت‌های ۰-۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بازه‌های زمانی مشابه را نشان می‌دهد. ستون‌ها نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) از سه تکرار فنی هستند. معنی‌داری آماری با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تعیین گردید. ستاره‌ها بیانگر تفاوت‌های آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مربوطه هستند: ns: غیرمعنی‌دار ($P > 0.05$); * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$); *** ($P < 0.001$) و **** ($P < 0.0001$).

شد. پس از تیمار سلول‌ها با دوزهای بهینه به مدت ۷۲ ساعت، بیان رونویسی KI-67 در مقایسه با ژن مرجع B2M با استفاده از تکنیک qPCR شد. نتایج نشان‌دهنده میزان بیان‌های متمایز در گروه‌های تحت تیمار بود. تیمار مستقل با PDRN (۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) منجر به افزایش بسیار معنی‌دار بیان ژن KI-67 در مقایسه با گروه کنترل گردید (تغییر بیان ۲/۷۸ برابر - فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱/۷۲۳-۴/۵۱۰). در روندی مشابه، مواجهه سلول‌ها با MAP (۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نیز باعث القای معنی‌دار رونویسی این ژن با تغییر بیان ۲/۳۹۵ برابر شد (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱/۶۵۱-۳/۴۷۵) (شکل ۲). این افزایش چشمگیر در سطح رونویسی ژن KI-67، تأییدکننده تقویت مسیرهای سیگنالینگ تکثیری در سلول‌های تیمار شده با هر دو ترکیب به صورت مستقل است.

بررسی بیان ژن ساختاری ماتریکس خارج سلولی (COL1A1)

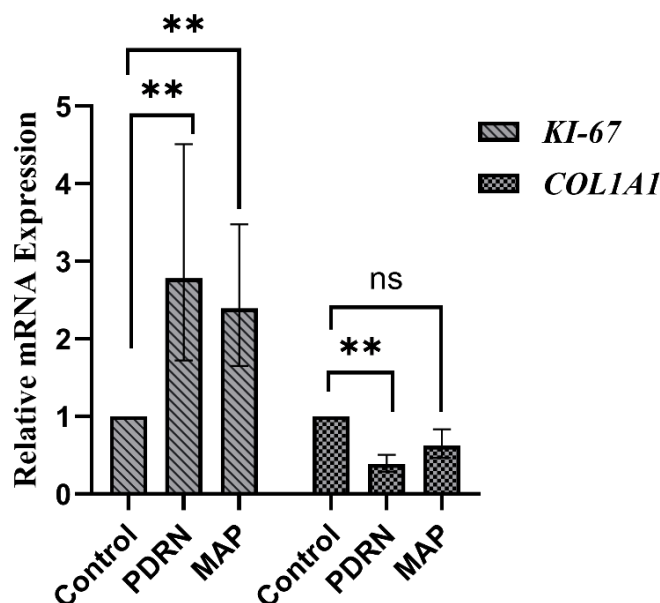
برای بررسی پاسخ رونویسی مهم‌ترین جزء ساختاری ماتریکس خارج سلولی درم، بیان نسبی mRNA COL1A1 پس از ۷۲ ساعت تیمار ارزیابی شد. نتایج نشان داد که مواجهه با دوز بهینه PDRN (۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن COL1A1 در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (۰/۳۸۴ برابر - فاصله اطمینان ۹۵٪: ۰/۵۰۸-۰/۲۹۱). اگرچه تیمار با MAP (۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نیز باعث کاهش نسبی در سطح رونویسی COL1A1 گردید؛ اما این تغییرات از لحاظ آماری به سطح معنی‌داری نرسید (تغییر بیان ۰/۶۲۴ برابر - فاصله اطمینان ۹۵٪: ۰/۴۶۷-۰/۸۳۶) (شکل ۲).

بحث

بازسازی بهینه درم اساساً به تکثیر سلولی تنظیم‌شده و رسوب کنترل‌شده ماتریکس خارج سلولی وابسته است^{۱۴،۱۵}. مطالعه حاضر، اثرات تعدیل‌کننده

اختصاصی PDRN و MAP را به صورت جداگانه بر پروفایل‌های رونویسی ژن‌های KI-67 و COL1A1 در فیبروبلاست‌های پوستی انسان تبیین می‌کند. توصیف این تغییرات هدفمند مولکولی، بینش عمیق‌تری نسبت به برهم‌کنش‌های درون سلولی ناشی از این ترکیبات ارائه می‌دهد.

افزایش چشمگیر بیان ژن KI-67 به دنبال تیمار مستقل با PDRN و MAP، نشان‌دهنده القای قابل توجه ورود سلول‌ها به چرخه سلولی است. این افزایش رونویسی، بیش از آنکه صرفاً نشانگر گسترش فیزیکی سلول‌ها باشد، بازتاب‌دهنده سیگنالینگ فعال میتوزنیک است. در فیبروبلاست‌ها، این پاسخ‌ها عموماً از طریق مسیرهای سیگنالینگ متعددی از جمله MAPK-ERK و PI3K-AKT می‌انجی‌گیری می‌شوند^{۱۶،۱۷}. برخلاف فعال‌سازی میتوزنیک، بیان ژن COL1A1 با کاهش رونویسی مواجه شد. تنظیم COL1A1 عمدتاً توسط مسیرهای فیبروزنیک، به ویژه مسیر سیگنالینگ TGF-β/SMAD هدایت شده و متعاقباً توسط سیگنالینگ‌های انتقال مکانیکی با واسطه YAP و TAZ تعدیل می‌گردد^{۱۸،۱۹}. تیمار با PDRN به طور معنی‌داری رونویسی COL1A1 را سرکوب کرد، در حالی که MAP کاهش غیرمعنی‌داری را نشان داد. کاهش مشاهده شده در بیان COL1A1 به دنبال تیمار با MAP، با مستندات علمی گسترده‌ای که مشتقات اسید اسکوربیک را به عنوان محرک‌های قوی سنتز کلاژن معرفی می‌کنند، در تضاد است. این مغایرت را می‌توان به دینامیک زمانی خاص این سنجش نسبت داد؛ بسیار محتمل است که MAP در ابتدا موجب یک افزایش سریع و زود هنگام در بیان COL1A1 شده و به دنبال آن یک حلقه بازخورد منفی را فعال کرده باشد که در نهایت منجر به سرکوب رونویسی در بازه زمانی ۷۲ ساعته شده است. مشاهده سرکوب COL1A1 در طول تقسیم فعال سلولی، می‌تواند بازتابی از یک برنامه‌ریزی مجدد استراتژیک



شکل ۱: اثرات PDRN و MAP بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر (KI-67) و ماتریکس خارج سلولی (COL1A1) در فیبروبلاست‌های پوستی انسان. سطوح نسبی بیان mRNA با استفاده از آزمون qPCR بررسی و نسبت به بیان ژن مرجع B2M نرمال‌سازی گردید. داده‌ها به صورت تغییر بیان (Fold Change) نسبت به گروه کنترل ارائه شده‌اند. نوارهای خطا (Error bars) نشان‌دهنده فاصله اطمینان ۹۵٪ هستند که توسط نرم‌افزار REST© محاسبه شده‌اند. معنی‌داری آماری نسبت‌های بیان با استفاده از آزمون Pair-wise Fixed Reallocation Randomisation Test در مقایسه با گروه کنترل تعیین گردید (** $P < 0.001$, ns غیر معنی‌دار).

است، بکاهد^{۲۲،۲۳}.

مطالعه حاضر با محدودیت‌هایی روبه‌رو است که ایجاب می‌کند در تفسیر یافته‌ها احتیاط لازم صورت گیرد. در وهله اول، یک مدل استاندارد آزمایشگاهی (In Vitro) نمی‌تواند به‌طور کامل ساختار سه‌بعدی طبیعی و سیگنالینگ‌های دینامیک سلول‌به‌سلول موجود در پوست انسان را شبیه‌سازی کند. نکته حائز اهمیت دیگر این است که یافته‌های کنونی بر پایه آنالیز در یک نقطه زمانی واحد (۷۲ ساعت) استوار هستند که این امر، توانایی ما را در ثبت کامل دینامیک زمانی بیان ژن محدود می‌سازد. افزون بر این، عدم اعتبارسنجی در سطح پروتئین نیز یکی دیگر از محدودیت‌هاست؛ بدون انجام سنجش‌های تکمیلی نظیر وسترن بلات یا الایزا، نمی‌توان به‌طور قطعی تأیید کرد که این تغییرات رونویسی، به تغییرات عملکردی در سطح پروتئین نیز ترجمه می‌شوند یا خیر. بر این

سلولی باشد که تکثیر را بر تشکیل ECM ترجیح می‌دهد^{۲۰،۲۱}؛ با این وجود، برای درک کامل دینامیک این تعادل تکثیری و سنتز ماتریکس خارج سلولی، انجام مطالعات مکانیسمی تکمیلی کاملاً ضروری است. افزایش رونویسی KI-67 همزمان با سرکوب COL1A1 ممکن است نشان‌دهنده یک پاسخ اولیه مطلوب در فاز تکثیری ترمیم زخم باشد؛ مرحله‌ای که در آن گسترش سریع سلولی برای بسته‌شدن زخم حیاتی است؛ اما به‌منظور جلوگیری از فیبروز و ایجاد اسکار، باید از فعال‌سازی بیش‌ازحد فاز ترشحی ممانعت به‌عمل آید^{۱۵،۲۱}. علاوه‌براین، با در نظر گرفتن تأخیر زمانی بیولوژیکی میان رونویسی ژن و رسوب فیزیکی ماتریکس خارج سلولی، کاهش بیان COL1A1 در مرحله تکثیر می‌تواند به‌طور پیشگیرانه‌ای از تجمع بیش‌ازحد کلاژن که عامل ایجاد اسکارهای هیپرتروفیک در فاز بازسازی ترمیم زخم

ساختاری اصلی یعنی COL1A1، در تضاد است. این تقابل مشاهده شده میان افزایش تکثیر و کاهش فیروژنز، می تواند نویدبخش یک درمان بالقوه برای تسریع روند بسته شدن زخم، بدون ایجاد اسکار بیش از حد در فرآیند ترمیم زخم باشد.

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی صمیمانه خود را از شرکت دانش بنیان «وستا دارو سلامت»، فعال و متخصص در حوزه محصولات دارویی و آرایشی و بهداشتی، به پاس حمایت های ارزشمند علمی و فنی این مجموعه در مراحل انجام این پژوهش را ابراز می دارند.

اساس، استخراج استنتاج های درمانی قطعی صرفاً بر پایه این پروفایل های mRNA زود هنگام ارزیابی می شود و برای اعتبارسنجی دقیق این مشاهدات اولیه مولکولی، انجام مطالعات جامع درون تنی (In Vivo) ضروری است.

در نتیجه، این مطالعه نشان می دهد که مواجهه فیبروبلاست های پوستی با PDRN و MAP منجر به القای یک پاسخ واگرا و خلاف جهت در تکثیر و بیان ژن کلاژن نوع یک می شود. جالب توجه است که اگرچه این ترکیبات به طور مؤثری پیشروی چرخه سلولی را ارتقا می بخشند، این اثر با کاهش بیان ژن

References

1. Boraldi F, Lofaro FD, Bonacorsi S, et al. The role of fibroblasts in skin homeostasis and repair. *Biomedicines* 2024;12.
2. Shenoy M, Abdul NS, Qamar Z, et al. Collagen structure, synthesis, and its applications: A systematic review. *Cureus* 2022;14:e24856.
3. Jing Y, Yang Y, Hao F, et al. Higher Ki67 expression in fibroblast like cells at invasive front indicates better clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Biosci Rep* 2018;38.
4. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2017;18.
5. Colangelo MT, Galli C, Guizzardi S. The effects of polydeoxyribonucleotide on wound healing and tissue regeneration: a systematic review of the literature. *Regen Med* 2020.
6. Esfandiyari M, Ahmadi Ashtiani HR. Topical vitamin C and its derivatives in cosmetic science: Stability, efficacy, and formulation strategies. *J Skin Stem Cell* 2025;12:e163798.
7. Pallio G, Bitto A, Pizzino G, et al. Adenosine receptor stimulation by polydeoxyribonucleotide improves tissue repair and symptomology in experimental colitis. *Front Pharmacol* 2016;7:273.
8. Park S, Baek S, Shin HJ, et al. Polydeoxyribonucleotides as emerging therapeutics for skin diseases: Clinical applications, pharmacological effects, molecular Mechanisms, and potential modes of action. *Appl Sci* 2025;15:10437.
9. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, et al. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 2015;5:545-89.
10. Shimizu Y, Ntege EH, Sunami H. Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan. *Regen Ther* 2022;21:73-80.
11. Berry CE, Brenac C, Gonzalez CE, et al. Natural compounds and biomimetic engineering to influence fibroblast behavior in wound healing. *Int J Mol Sci* 2024;25.
12. Erfanian N, Safarpour H, Tavakoli T, et al. Investigating the therapeutic potential of Bifidobacterium breve and Lactobacillus rhamnosus postbiotics through apoptosis induction in colorectal HT-29 cancer cells. *Iran J Microbiol* 2024;16:68-78.
13. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-

- wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
14. Stunova A, Vistejnova L. Dermal fibroblasts-A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev* 2018;39:137-50.
15. Addis R, Cruciani S, Santaniello S, et al. Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: Evidence for a novel synergic outcome. *Int J Med Sci* 2020;17:1030-42.
16. Lorenzini A, Tresini M, Mawal-Dewan M, et al. Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Exp Gerontol* 2002;37:1149-56.
17. Sato M, Shegogue D, Gore EA, et al. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002;118:704-11.
18. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013;15:637-46.
19. Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol* 2015;6:565-77.
20. Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 2002;12:258-66.
21. Talbott HE, Mascharak S, Griffin M, et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell* 2022;29:1161-80.
22. Grierson I, Joseph J, Miller M, et al. Wound repair: The fibroblast and the inhibition of scar formation. *Eye (Lond)* 1988;2:135-48.
23. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv Wound Care* 2014;5:119-36.

Divergent regulation of proliferation and COL1A1 expression by PDRN and magnesium ascorbyl phosphate in human dermal fibroblasts

Mohammad Esfandiyari^{1,2}
Hamidreza Ahmadi Ashtiani,
PhD^{1,2*}
Hossein Rastegar, PhD³
Mehdi Hedayati, PhD⁴

1. Department of Biochemistry, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Cosmetic, Hygienic and Detergent Sciences and Technology Research Center, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Cosmetic Products Research Center, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
4. Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Molecular Biology, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: Dec 01, 2025
Accepted: Jan 15, 2026
Pages: 225-234

Corresponding Author:
Hamidreza Ahmadi Ashtiani, PhD

Yakhchal St., Dr. Shariati Ave., Tehran,
Iran
Email: ahmadihr@iau.ac.ir

Conflict of interest: None to declare

Background and aim: Human dermal fibroblasts (HDFs) are key regulators of skin homeostasis through extracellular matrix remodeling. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) and magnesium ascorbyl phosphate (MAP) are recognized as skin regenerative agents, but their molecular effects on HDFs are not fully elucidated. This study aimed to investigate the effects of PDRN and MAP on cellular proliferation and type I collagen gene expression in HDFs.

Methods: The HDF cell line was treated with PDRN and MAP, and cell viability was evaluated using the MTT assay at 24, 48, and 72 hours. Based on viability outcomes, optimal concentrations of PDRN (100 ng/ml) and MAP (250 µg/ml) were selected. Seventy-two hours post-treatment, the expression levels of KI-67 and COL1A1 genes were analyzed via qPCR ($P < 0.05$).

Results: Cell viability analyses demonstrated significant time- and dose-dependent responses for both PDRN and MAP. At the molecular level, independent treatments with PDRN and MAP upregulated KI-67 gene expression, confirming an enhanced cellular proliferative capacity. Conversely, in a divergent manner, COL1A1 gene expression was downregulated under these exact treatment conditions.

Conclusion: PDRN and MAP induce a divergent response in HDFs; while promoting mitogenic activity, they simultaneously suppress fibrogenesis and COL1A1 expression. This cellular reprogramming underscores the therapeutic potential of these compounds in anti-fibrotic strategies and scarless wound healing. However, in vivo studies are required to conclusively validate these findings.

Keywords: polydeoxyribonucleotides, ascorbate-2-phosphate, fibroblasts, cell proliferation, extracellular matrix

