Xây dựng mô hình chuột đái tháo đường mang vết thương ngoài da nhằm ứng dụng trong nghiên cứu thử nghiệm thuốc

- **Vũ Kha Thanh Thanh**
- **Dương Thị Minh Phụng**
- **Nguyễn Thanh Huy**
- **Nguyễn Văn Hùng**
- **Nguyễn Trí Nhân**
- **Trần Linh Thước**
- **Đặng Thị Phương Thảo**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
Email: vktthanh147@gmail.com

(Bài nhận ngày 09 tháng 05 năm 2017, nhận đăng ngày 16 tháng 06 năm 2017)

TÓM TẮT

Loét chi mạn tính là một trong những biến chứng của bệnh đái tháo đường gây nhiều đau đớn cho bệnh nhân và có thể dẫn đến tử vong. Do vậy việc thử nghiệm các liệu pháp điều trị vết thương mạn tính do đái tháo đường có thể được nghiên cứu thông qua các mô hình động vật mô phỏng. Cảm ứng bằng streptozotocin (STZ) là phương pháp thường được áp dụng để tạo mô hình động vật đái tháo đường với ưu điểm quy trình đơn giản và chi phí thấp. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu sử dụng STZ xây dựng mô hình chuột đái tháo đường mang vết thương ngoài da. Tuy nhiên, so sánh giữa các công bố trước đây cho thấy có nhiều điểm khác nhau về các yếu tố như lượng STZ, trọng lượng chuột đầu vào, chỉ số đường huyết xác định đái tháo đường và cách đánh giá trạng thái sinh lý chuột. Chúng tôi đã xây dựng bộ tiêu chí đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe gồm các tiêu chí về màu da, tình trạng lông, khả năng di chuyển và thể trạng. Bộ tiêu chí này đã được áp dụng song song với tiêu chí về mức đường huyết trong khảo sát liều tiêm STZ nhằm tạo chuột đái tháo đường có tình trạng sức khỏe ổn định và có tỷ lệ sống sót cao sau khi tạo vết thương ngoài da. Chuột đầu vào có trọng lượng 20–28 g và được tiêm STZ liều 125 mg/kg, sau 1–2 tuần cho tỷ lệ chuột đái tháo đường đạt chuẩn sức khỏe khoảng 40 % ở tuần 1 và tuần 2 sau tiêm. Chuột có đường huyết > 200 mg/dL đều bị hư hại đảo tụy và cho được tính ổn định cao về đường huyết cũng như tình trạng sức khỏe sau 2 tuần mang vết thương. Mô hình chuột đái tháo đường mang vết thương ngoài da này có khả năng lành vết thương chậm hơn chuột đối chứng (không bị đái tháo đường), và đã được sử dụng cho thử nghiệm khả năng điều trị của protein rhPDGF-BB.

***Từ khóa**: bộ tiêu chí đánh giá cảm quan sức khỏe, đái tháo đường, mô hình chuột, streptozotocin, vết thương ngoài da, rhPDGF-BB*

MỞ ĐẦU

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh rối loạn chuyển hóa phổ biến với nhiều biến chứng nguy hiểm, ảnh hưởng đến 8,3 % dân số trên thế giới và trở thành một trong ba căn bệnh chết người chỉ sau ung thư và tim mạch [1]. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và Liên đoàn đái tháo đường thế giới (IDF), Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ gia tăng bệnh ĐTĐ nhanh nhất (khoảng 8–10 %/năm). Bệnh ĐTĐ xảy ra do sự tổn thương hay suy giảm chức năng của tế bào β đảo tụy, làm cho tế bào không sản xuất đủ insulin (hormon điều hòa

lượng đường trong máu) cho cơ thể, dẫn đến nồng độ đường trong máu lúc nào cũng tăng cao và kéo theo là những biến chứng gây nhiều đau đớn cho người bệnh. Loét chi là một trong những biến chứng thường gặp và có nguy cơ đoạn chi cao, thậm chí tử vong do nhiễm trùng trong khi phẫu thuật.Theo thống kê, 15 % bệnh nhân ĐTĐ có vết loét chi và 70 % trong số đó sẽ tái phát trong vòng 5 năm tạo thành vết loét mạn tính. Thực trạng đáng báo động là đến 85% số ca bệnh ĐTĐ phải cắt cụt chi có bắt nguồn từ một vết loét [2].

Chính vì vậy nhiều nghiên cứu về các nhân tố tăng trưởng kích thích làm lành vết thương hay thử nghiệm trị liệu tế bào gốc và các vật liệu y sinh trên vết loét do bệnh ĐTĐ gây ra đã và đang được tiến hành. Trong đó, việc xây dựng hoàn chỉnh một mô hình động vật ĐTĐ mang vết thương ngoài da để thử nghiệm các yếu tố này là một bước nghiên cứu quan trọng. Trong nhiều nghiên cứu trước đây, chuột được cảm ứng bằng streptozotocin (STZ) là phương pháp thường được áp dụng để tạo mô hình động vật ĐTĐ mang vết thương ngoài da với ưu điểm quy trình thực hiện đơn giản và chi phí thấp [3]. Tuy nhiên, so sánh giữa các công bố cho thấy có nhiều điểm khác nhau từ chủng chuột, trọng lượng cho đến liều tiêm. Tác giả Kintoko và cộng sự (2014) thực hiện nghiên cứu trên chủng Kunming trọng lượng 18–23 g, kết quả cho thấy liều tiêm STZ 200 mg/kg cho được 76,8 % chuột ĐTĐ cùng với tỷ lệ sống sót là 98,2 % [4]. Nghiên cứu của tác giả Sachin Arora và cộng sự (2009) trên chủng Swiss Albino trọng lượng 25–30 g với liều tiêm 180 mg/kg cho được 100 % chuột ĐTĐ nhưng qua năm tuần theo dõi tỷ lệ chuột sống sót chỉ khoảng 75 % [5]. Kết quả nghiên cứu của Koji Hayashi và cộng sự (2006) trên chủng ICR 8 tuần tuổi cho thấy với liều tiêm 100 mg/kg có thể cảm ứng tạo chuột ĐTĐ sau ba tuần [6]. Bên cạnh đó, ở Việt Nam vẫn chưa có một công bố nào chứng minh và xây dựng hoàn chỉnh mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da một cách có hệ thống. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm nghiên cứu tạo mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da để đáp ứng nhu cầu thử nghiệm một số yếu tố kích thích tăng cường làm lành vết thương tiến tới chữa trị vết loét ở người bị ĐTĐ. Đầu tiên chúng tôi xây dựng bộ tiêu chí đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe chuột. Bộ tiêu chí này kết hợp với tiêu chí về mức đường huyết sẽ được áp dụng xuyên suốt trong các thí nghiệm khảo sát lựa chọn liều tiêm STZ, trọng lượng chuột đầu vào và thời điểm bắt đầu tạo vết thương phù hợp cho mô hình. Sau đó mô hình sẽ được đánh giá thông qua mức độ hư hại của đảo tụy và khả năng tự lành vết thương trên da. Bước đầu chúng tôi cũng tiến hành thử nghiệm khả năng điều trị vết thương của rhPDGF-BB trên mô hình vừa tạo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chuột nhắt trắng *Mus musculus* Swiss Albino (giống đực, 4–6 tuần tuổi) đạt chuẩn cung cấp từ Viện Pasteur TP.Hồ Chí Minh. Chuột mua về được nuôi ổn định 1 tuần trước khi thí nghiệm. Thức ăn dùng để nuôi chuột là cám viên chuyên biệt của Viện sinh phẩm Nha Trang (thành phần bao gồm đạm tổng số 21%, chất béo 5–7 %, chất sơ 5–6 %, khoáng tổng hợp 6–8 %), nước uống được lấy từ nguồn nước lọc dân dụng và áp dụng chu kì ngày đêm là 12 giờ sáng-12 giờ tối.

Streptozotocin (STZ) dạng bột đông khô (Sigma, Hoa Kì) được bảo quản ở tủ -30^{o}C, khi sử dụng sẽ được hòa tan trong buffer sodium citrat 0.1 M pH 4.5. Thuốc gây mê Ilium ketamin 100mg/mL và Ilium xylazine 20 mg/mL (Troy Laboratories PTY, Australia).

Dịch protein rhPDGF-BB với độ tinh sạch từ 95-99 % được cung cấp từ Bộ môn Công nghệ sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. rhPDGF-BB được thu nhận và tinh sạch từ quá trình lên men chủng *P. pastoris* X33::*pdgf-b* tái tổ hợp mang đa bản sao gene *pdgf-b* [7], và sau đó được kiểm tra hoạt tính in vitro trên dòng nguyên bào sợi NIH3T3 [8].

Dụng cụ và thiết bị: máy đo nồng độ đường huyết EASYGLUCO Auto-Coding (INFOPIA, Hàn Quốc), máy cắt lát mỏng Microtome (MR258, Italy), kính hiển vi Eclipse NI_U (Nikon, Nhật Bản).

Phương pháp xây dựng bộ tiêu chí và phương pháp đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe chuột

Để tạo mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da, ngoài tiêu chí mang trạng thái bệnh ĐTĐ, chuột còn phải đạt trạng thái sinh lý ổn định và đồng đều trong suốt quá trình tạo vết thương và thử thuốc sau này. Hơn nữa, trong các nghiên cứu trước về tạo mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da, các tác giả thường chỉ nêu về phương pháp thực hiện, chưa đề cập chi tiết đến tiêu chí đánh giá và lựa chọn chuột đầu vào cho tạo mô hình. Do đó chúng tôi tiến hành tham khảo tài liệu nhằm đưa ra bộ tiêu chí đánh giá phù hợp (TCVN 3215-1979, TCVN 3216-1994, [9, 10]). Hội đồng đánh giá cảm quan phải có ít nhất 3 thành viên (nhiều nhất là 12 thành viên), các thành viên phải được đào tạo trước về mẫu và các mức độ đánh giá, quan sát và cho điểm độc lập. Nơi đánh giá phải yên lặng, đủ ánh sáng; các lô được sắp xếp ngẫu nhiên sao cho các thành viên đánh giá không được biết về thiết kế thí nghiệm phân lô; chuẩn bị các phiếu điểm đánh giá cho các thành viên. Căn cứ vào điểm trung bình của các thành viên để tiến hành xếp loại chất lượng sức khỏe chuột.

Phương pháp xây dựng mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da

Khảo sát liều tiêm STZ cảm ứng tạo mô hìnhchuột ĐTĐ

Dựa trên các kết quả tạo mô hình ĐTĐ trên chuột nhắt trắng trong các nghiên cứu trước đây [6], chúng tôi tiến hành khảo sát liều tiêm STZ từ 100–150 mg/kg trọng lượng chuột với mong muốn tạo được mô hình chuột ĐTĐ ổn định về sinh lý với tỷ lệ cao nhất có thể.Chuột đực *Mus musculus* được nuôi ổn định 1 tuần. Trước khi tiêm STZ, chuột được cho đói 8–12 giờ (từ 22 giờ 30 đêm đến 7 giờ 30 sáng hôm sau), tiến hành cân trọng lượng, đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe và đo đường huyết. Chọn chuột đạt tiêu chuẩn sức khỏe và có mức đường huyết bình thường (70–150 mg/dL) để tiêm STZ. Tiến hành phân lô sao cho các chuột có trọng lượng, thể trạng và mức đường huyết tương đương nhau giữa 4 nghiệm thức (9 con/ nghiệm thức): đối chứng tiêm buffer sodium citrat (ký hiệu là BF), 100mg/kg, 125mg/kg và 150mg/kg. STZ được tiêm ngay vào màng bụng chuột trong vòng 5 phút sau khi hòa tan, thể tích tiêm được tính toán dựa trên trọng lượng chuột. Theo dõi chuột hàng ngày cho đến tuần thứ 5 sau tiêm.Ở mỗi tuần, chuột được cho đói 8–12 giờ (từ 22 giờ 30 đêm đến 7 giờ 30 sáng hôm sau), tiến hành cân trọng lượng, đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe và đo đường huyết thông qua lấy máu từ tĩnh mạch đuôi. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 2 lần và kết quả được đánh giá thông qua: tỷ lệ chuột ĐTĐ và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe. Chuột được đánh giá là ĐTĐ nếu mức đường huyết ≥ 200 mg/dL [4] và đạt chuẩn sức khỏe nếu thỏa điều kiện như trong Bảng 2.

Lựa chọn trọng lượng chuột đầu vào cho mô hình

Bên cạnh liều tiêm STZ, trong quá trình làm thực nghiệm chúng tôi nhận thấy trọng lượng chuột đầu vào cũng là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến khảo sát hiệu quả tạo mô hình. Chuột mua về, sau khi nuôi ổn định 1 tuần sẽ được cân trọng lượng, đánh giá cảm quan trình trạng sức khỏe và đo đường huyết. Những con chuột đạt chuẩn sức khỏe và có mức đường huyết bình thường (70–150 mg/dL) sẽ được chia thành 2 nhóm dựa trên trọng lượng: từ 12 đến 20 g và từ 20 đến 28 g. Tiêm STZ với liều tiêm đã được khảo sát để cảm ứng tạo chuột ĐTĐ. Tiến hành đo đường huyết và đánh giá sức khỏe chuột ở tuần thứ 1 và thứ 2 sau khi tiêm. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần và kết quả được đánh giá thông qua: tỷ lệ chuột ĐTĐ và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe.

Lựa chọn thời điểm bắt đầu tạo vết thương sau khi tiêm STZ

Thời điểm tạo vết thương là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tình trạng ĐTĐ và sức sống của chuột sau khi tạo vết thương. Thời điểm này được lựa chọn sao cho chuột vẫn duy trì được trạng thái ĐTĐ ổn định và tỷ lệ sống sót cao sau 2 tuần mang vết thương.Những con chuột đạt chuẩn sức khỏe, có mức đường huyết bình thường (70-150 mg/dL), có trọng lượng trong khoảng đã được lựa chọn như trên sẽ được tiêm STZ với liều đã được khảo sát. Tiến hành đo đường huyết và đánh giá sức khỏe chuột từ tuần 1 đến tuần 4 sau tiêm. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần và kết quả được đánh giá thông qua: tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe, tỷ lệ chuột ĐTĐ ổn định đường huyết và tỷ lệ chuột sống sót sau 2 tuần tiếp theo.

Đánh giá mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da

Về sự hư hại đảo tụy

Đảo tụy ở chuột ĐTĐ cảm ứng bằng STZ thường bị biến dạng, các tế bào β tuyến tụy bị hoại tử, hình thành các hốc không bào và mạch máu trong tuyến tụy thường bị sung huyết [11]. Để khẳng định mô hình ĐTĐ tạo thành công trên chuột, mô tụy của chuột được thu nhận nhằm đánh giá sự tổn thương của đảo tụy. Những con chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe ở thời điểm được chọn như trên sẽ được phân lô theo các mức đường huyết khác nhau (200–299, 300–399 và >400 mg/dL) và lô đối chứng (không ĐTĐ). Tiến hành gây mê, giải phẫu thu tụy và đánh giá mô hình chuột ĐTĐ thông qua mô học đảo tụy bằng phương pháp nhuộm H&E (Haematoxylin and Eosin Staining, Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University). Kết quả được đánh giá thông qua: hình dạng và diện tích đảo tụy, sự hình thành các hốc không bào trong đảo tụy và hình dạng mạch máu.

Về khả năng tự lành vết thương

Vết thương mạn tính như vết thương do ĐTĐ sẽ có thời gian đóng vết thương lâu hơn so với vết thương bình thường [12, 13]. Do đó, khả năng tự lành vết thương là một tiêu chí đánh giá việc xây dựng thành công mô hình. Những con chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe được chọn để phân lô tiến hành phẫu thuật tạo vết thương. Chuột trong các lô thí nghiệm được xem xét bố trí để đảm bảo sự đồng đều cao nhất giữa các nghiệm thức, đặc biệt chú ý đến hai chỉ tiêu quan trọng là độ dày da và thể trạng.Chuột được gây mê bằng tiêm vào bắp đùi dung dịch hỗn hợp của ketamine và xylazine với liều 80 mg/kg ketamine và 10 mg/kg xylazine pha trong nước muối sinh lý. Chuột được cạo lông ở trên lưng, khoảng 1/2 diện tích lưng phía đuôi. Sát trùng bề mặt da với cồn 70 °. Dùng kéo nhọn cắt tạo một vết thương hình tròn đường kính 12 mm, vết thương sau khi tạo phải được cắt đủ sâu qua lớp cơ panniculus carnosus nhằm tránh vết thương co quá nhanh, khó quan sát thấy khác biệt giữa các lô thí nghiệm. Tiến hành theo dõi, chụp hình và tính diện tích vết thương bằng phần mềm ImageJ vào các ngày 0, 3, 5, 7, 9, 11 và 14 sau phẫu thuật. Kết quả được đánh giá thông qua: độ ổn định đường huyết và tình trạng sức khỏe chuột ĐTĐ sau khi tạo vết thương; khả năng tự lành vết thươngdựa trên tỷ lệ % diện tích vết thương đóng theo thời gian và tốc độ lành vết thương 50%.

Thử nghiệm khả năng làm lành vết thương trên mô hình chuột ĐTĐ của rhPDGF-BB

Chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe được tạo vết thương trên da lưng theo phương pháp đã được trình bày như trên. Dịch rhPDGF-BB tinh sạch >95% được thẩm tách qua đêm với dung dịch đệm 1X PBS (Phosphate buffer saline) và sau đó cô mẫu bằng amicon ultra (Merck Millipore). Mẫu được trộn với tá dược 5 % PEG (Polyethylene glycol, Merck) - là giá mang giữ PDGF trên vết thương và tạo điều kiện cho PDGF thấm từ từ vào trong vết thương, kiểm tra hoạt tính kích thích tăng sinh trên dòng nguyên bào sợi NIH3T3, sử dụng ngay hoặc bảo quản ở 0^{o}C cho đến khi sử dụng. Thử nghiệm trị liệu: dùng micropipet nhỏ trực tiếp 20 µL mẫu rhPDGF-BB/5 % PEG với hàm lượng PDGF-BB 7.07 µg/vết thương có diện tích 1,13 cm^2 (tham khảo lượng dùng trong sản phẩm

thương mại gel Regranex 0,01 %, 7 µg/vết thương có diện tích 1 cm^2), lô đối chứng chỉ nhỏ tá dược 5% PEG. Thực hiện nhỏ thuốc hằng ngày ở cùng thời điểm cho đến khi vết thương lành. Theo dõi, chụp hình và tính diện tích vết thương bằng phần mềm ImageJ vào các ngày 0, 3, 5, 7, 9, 11 sau phẫu thuật. Kết quả được đánh giá thông qua: tỷ lệ % diện tích vết thương đóng theo thời gian.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xây dựng bộ tiêu chí đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe chuột

Kết hợp quy chuẩn đánh giá điểm kết thúc nhân đạo (humane endpoints) cho động vật thí nghiệm của Ủy ban về Quy chế Đánh giá và Sử dụng động vật (IACUC), Trường Đại học Pennsylvania (Hoa Kì) và đánh giá tình trạng sức khỏe chuột thí nghiệm của Viện y tế Quốc gia Hoa Kì (NIH) [9], chúng tôi tiến hành lựa chọn các tiêu chí sau cho đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe chuột tạo mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da: màu da, tình trạng lông, khả năng di chuyển và thể trạng.

Màu da là một tiêu chí đánh giá ngoại hình quan trọng, thông qua màu da có thể biết được tình trạng tuần hoàn của chuột. Nếu chuột bị thiếu máu, thiếu oxygen trong máu, nhiễm trùng,… màu da sẽ thay đổi từ hồng sang hồng nhạt, nặng sẽ dẫn tới xanh xao, tím tái. Đặc biệt, khi chuột có mức đường huyết cao dẫn tới gây tổn thương các mạch máu ngoại biên và khi tạo vết thương diện tích lớn có thể gây nhiễm trùng.Chính vì vậy màu da được chọn là một tiêu chí đánh giá trong tạo mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da. Màu da được đánh giá theo ngưỡng sắc thái da từ trạng thái tốt là hồng tươi đến kém dần là hồng nhạt, tái và rất tái.

Tình trạng lông cũng là một tiêu chí đánh giá ngoại hình quan trọng, lông bao phủ toàn bộ cơ thể chuột, ở trạng thái bình thường lông dày và mượt. Tuy nhiên, khi chuột ở trạng thái không tốt, mệt mỏi, chuột sẽ thiếu đi sự "chải chuốt" hay nếu đau đớn trên toàn bộ hay một vùng cơ thể sẽ tự cào xé lông mình. Hơn nữa, chân lông bắt nguồn từ da, nên nếu máu không đủ cung cấp chất dinh dưỡng vì sức khỏe chuột không tốt sẽ biểu hiện ra bên ngoài với trạng thái lông rụng, xù hay thô ráp. Tình trạng lông được đánh giá dựa trên độ dày và mượt của lông, ở trạng thái tốt chuột có lông dày mượt, kém dần sẽ là dày mà không mượt, thưa mà không mượt, thưa xù.

Khả năng di chuyển phản ánh mức độ nhanh nhạy của chuột khi quan sát trong lồng và khi đáp ứng kích thích. Ở trạng thái bình thường chuột là một chủng "hiếu động" vì vậy nếu chuột bị suy giảm sức khỏe sẽ dẫn tới khả năng vận động kém, đáp ứng với kích thích chậm, nặng có thể đờ đẫn hoặc nằm im một chỗ [9]. Điều này liên quan mật thiết đến tình trạng sức khỏe của chuột. Đặc biệt, khi STZ là một chất hóa học không chỉ tác động lên tuyến tụy mà còn có thể tác động lên gan hoặc thận gây suy giảm mạnh sức khỏe chuột. Khả năng di chuyển được đánh giá dựa vào quan sát sự di chuyển trong lồng và mức độ đáp ứng kích thích từ trạng thái tốt là rất nhanh khi có kích thích cho tới nhanh, chậm và không di chuyển khi có kích thích.

Năm 1999, hai tác giả Mollie H. Ullman-Culleré và Charmaine J. Foltz, thuộc Trung tâm Nghiên cứu Ung thư của Học viện Kĩ thuật Massachussetts, Hoa kì đã đề xuất phương pháp cho điểm thể trạng [10]. Phương pháp giúp đánh giá thể trạng chuột một cách nhanh chóng và chính xác. Ưu thế hơn của phương pháp cho điểm thể trạng so với việc cân xác định trọng lượng là sự chân thực hơn bởi vì có những trạng thái bệnh chuột mang khối u dẫn tới tăng trọng lượng nhưng giảm đi lượng mô mỡ và cơ. Do vậy, cho điểm thể trạng thường được sử dụng là một tiêu chí đánh giá tình trạng sức khỏe chuột và được xem là tiêu chí quan trọng hàng đầu trong đánh giá cảm quan tình trang sức khỏe chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da. Bởi vì triệu chứng của bệnh ĐTĐ gây ra bởi cảm ứng bằng STZ ở chuột là ăn nhiều, uống nhiều nhưng giảm trọng lượng, đặc biệt suy giảm lớp mỡ và mô cơ của cơ thể. Phương pháp này được thực hiện bằng cách sử dụng các đầu ngón tay cảm nhận đốt sống và vùng xương chậu của chuột và cho điểm từ giảm trọng lượng rất nhiều cho đến béo phì.

Căn cứ các dẫn chứng tài liệu trên, chúng tôi xây dựng bộ tiêu chí đánh cảm quan tình trạng sức khỏe chuột ĐTĐ cùng thang điểm như ở Bảng 1.

Bảng 1. Tiêu chí đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe chuột

Tiêu chí	Điểm	Mức độ
Màu da	5	Hồng tươi
	4	Hồng
	3	Tái
	2	Rất tái
Tình trạng lông	5	Dày, mượt
	4	Dày, không mượt
	3	Thưa, không mượt
	2	Thưa, xù
Khả năng di chuyển	5	Chạy rất nhanh khi có kích thích
	4	Chạy nhanh khi có kích thích
	3	Di chuyển chậm khi có kích thích
	2	Di chuyển rất chậm hoặc không di chuyển khi có kích thích
Thể trạng	5	Chuột béo phì: không thấy cấu trúc xương vì nằm dưới lớp thịt và mỡ dày
	4	Chuột vượt thể trạng: đường cột sống liên tục, chỉ sờ thấy được đốt sống với một lực nhất định, lớp mỡ dưới da dày lên
	3	Chuột thể trạng tốt: đốt sống lưng và xương chậu không nổi bật, tuy dễ dàng có thể sờ thấy với chút áp lực ở ngón tay, có sự tích trữ mỡ dưới da
	2	Chuột thể trạng kém: hiện rõ các phân đoạn đốt sống, vây lưng xương chậu dễ dàng sờ thấy, lớp thịt mỏng và chỉ có ít mô mỡ dưới da
	1	Chuột giảm trọng lượng nghiêm trọng: cấu trúc xương hiện rất rõ, rất ít hoặc không có lớp thịt, đốt sống phân đoạn rõ ràng

Dựa trên Bảng 1, chúng tôi tiến hành xếp loại chất lượng sức khỏe chuột theo hai mức: đạt và không đạt. Điều kiện về cảm quan sức khỏe để chuột được chọn tiêm STZ và tạo vết thương được trình bày trong Bảng 2.

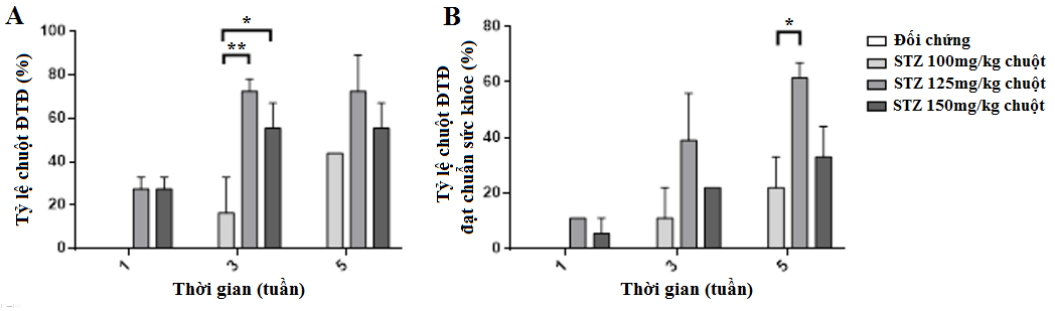
Bảng 2. Xếp loại chất lượng chuột theo trạng thái sức khỏe

Xếp loại chất lượng	Tổng điểm trung bình của các chỉ tiêu: màu da, tình trạng lông khả năng di chuyển	Điểm trung bình thể trạng
Đạt	12–15	2,6 – 3,5 (không thành viên nào cho điểm < 2,5 và/hoặc > 4)
Không đạt	< 12	< 2,5 hoặc > 3,5

Xây dựng mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da

Khảo sát liều tiêm STZ cảm ứng tạo mô hình chuột ĐTĐ

Trong nghiên cứu này nhằm tạo mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da, trước tiên chúng tôi tạo mô hình chuột ĐTĐ bằng phương pháp tiêm STZ. Dựa trên các kết quả từ nghiên cứu trước cho thấy liều tiêm từ 100–150 mg/kg là phù hợp với chuột nhắt trắng để tạo mô hình chuột ĐTĐ [6]. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát các liều tiêm STZ: 100, 125 và 150 mg/kg. Tỷ lệ chuột ĐTĐ và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe được đánh giá trong 5 tuần (kết quả tuần 2 và 4 khác biệt không đáng kể lần lượt so với tuần 1 và 3 nên không được trình bày trong Hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của liều tiêm STZ khác nhau lên tỷ lệ chuột ĐTĐ (A) và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe (B) ở các thời điểm tuần 1, 3 và 5 sau khi tiêm STZ *(n=9, p < 0.05)*

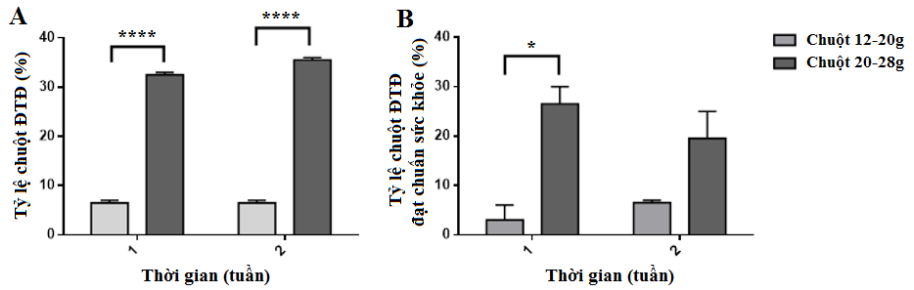
Kết quả thống kê ở Hình 1A cho thấy, sau khi tiêm STZ, liều 125 và 150 mg/kg bắt đầu cảm ứng chuột ĐTĐ với tỷ lệ 28 % ngay từ tuần 1 trong khi liều 100 mg/kg bắt đầu cảm ứng chuột ĐTĐ từ tuần 3. Tỷ lệ chuột ĐTĐ tăng cao ở tuần 3 và duy trì đến tuần 5 sau tiêm, liều tiêm 125 mg/kg và 150 mg/kg cho được đến 73 % và 56 % chuột ĐTĐ, cao hơn so với liều 100 mg/kg (17 %). Điều này chứng tỏ liều 100 mg/kg chưa đủ để cảm ứng chuột ĐTĐ ở những tuần đầu tiên, với liều lượng này, chuột cần thời gian dài hơn để đáp ứng với thuốc. Sử dụng STZ liều 125 và 150 mg/kg cho tỷ lệ chuột ĐTĐ khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tương tự, ở hình 1B cũng cho thấy liều 125 mg/kg cho được tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với liều 150 mg/kg, nhưng cao hơn so với liều 100 mg/kg ở tuần 5.

Do vậy xét về hiệu quả cảm ứng chuột ĐTĐ và hiệu quả kinh tế, liều 125 mg/kg được lựa chọn cho nghiên cứu xây dựng mô hình của chúng tôi. Liều tiêm này cho được 39 % và 62 % chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe lần lượt ở tuần 3 và 5 sau tiêm. Bên cạnh đó, 100% chuột được tiêm liều 125 mg/kg đều sống sót đến hết tuần thứ 3.

Tuy nhiên nhận thấy, hiệu quả tạo chuột ĐTĐ và chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe chưa cao, điều này có thể là do việc lựa chọn chuột đầu vào để tiêm STZ chưa thật sự ổn định. Do đó, nhóm chúng tôi tiến hành nghiên cứu lựa chọn lại khoảng trọng lượng chuột đầu vào để phù hợp với mô hình nhằm nâng cao tỷ lệ chuột ĐTĐ cũng như tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe.

Lựa chọn trọng lượng chuột đầu vào cho mô hình

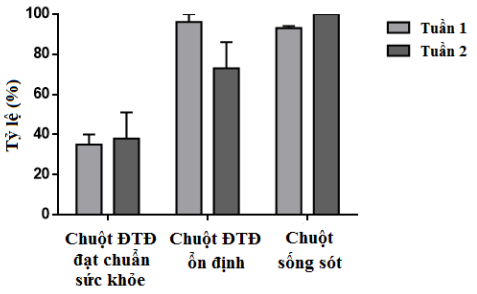
Để lựa chọn trọng lượng chuột đầu vào, chúng tôi chỉ thực hiện trong 2 tuần đầu sau khi tiêm STZ mà không theo dõi trong thời gian dài vì kết quả trong 2 tuần đầu đã có thể giúp phân tích được ảnh hưởng của trọng lượng lên tỷ lệ chuột ĐTĐ và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe.Thật vậy, kết quả thực nghiệm được biểu diễn qua Hình 2 cho thấy, ở các thời điểm khảo sát, chuột đầu vào trước khi tiêm STZ có trọng lượng từ 20–28g cho được tỷ lệ chuột ĐTĐ và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe cao hơn đáng kể so với nhóm chuột có trọng lượng từ 12–20g. Đặc biệt, ở tuần 1 sau tiêm, nhóm chuột đầu vào với trọng lượng từ 20–28 g cho tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe là 27 %, cao gấp 9 lần so với nhóm chuột có trọng lượng từ 12–20 g chỉ đạt 3 % (Hình 2B). Do đó, chúng tôi lựa chọn chuột đầu vào để tiêm STZ có khoảng trọng lượng từ 20–28 g cho quá trình xây dựng mô hình tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của việc lựa chọn trọng lượng chuột đầu vào lên tỷ lệ chuột ĐTĐ (A) và tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe (B) ở các thời điểm tuần 1 và 2 sau khi tiêm STZ *($p < 0.05$)*

Lựa chọn thời điểm bắt đầu tạo vết thương sau khi tiêm STZ

Mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da cần ổn định sau khi tạo vết thương trong ít nhất 2 tuần để có thể áp dụng cho các thử nghiệm. Thời điểm bắt đầu tạo vết thương được lựa chọn sao cho sau 2 tuần mang vết thương, chuột vẫn sống sót và duy trì được trạng thái ĐTĐ ổn định. Dựa trên kết quả sơ khởi trong thí nghiệm khảo sát liều tiêm STZ, tỷ lệ chuột duy trì được tình trạng ĐTĐ và sức khỏe ổn định trong 2 tuần liên tiếp kể từ sau khi bắt đầu ĐTĐ đạt cao nhất (60 %) ở tuần 1 và tuần 2. Do vậy, chúng tôi chọn thời điểm tuần 1 và tuần 2 sau tiêm STZ trong khảo sát lựa chọn thời điểm bắt đầu tạo vết thương trên chuột.



Hình 3. Ảnh hưởng của việc lựa chọn thời điểm bắt đầu tạo vết thương lên tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe, tỷ lệ chuột ĐTĐ ổn định và tỷ lệ chuột sống sót sau 2 tuần mang vết thương

Kết quả khảo sát trên Hình 3 cho thấy, ở cả 2 thời điểm tuần 1 và 2 đều có tỷ lệ chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe cao (đạt khoảng 40 %). Tạo vết thương ở tuần 1 sau tiêm STZ cho tỷ lệ chuột ĐTĐ ổn định và tỷ lệ chuột sống sót sau 2 tuần mang vết thương trên 90 %. Nếu tạo vết thương ở tuần 2, tỷ lệ chuột ĐTĐ ổn định sau 2 tuần mang vết thương đạt trên 70%, thấp hơn so với nếu tạo vết thương ở tuần 1, tuy nhiên sự khác biệt này là không đáng kể. Do đó, có thể lựa chọn tuần 1 hoặc tuần 2 sau khi tiêm STZ để tạo vết thương trên chuột.

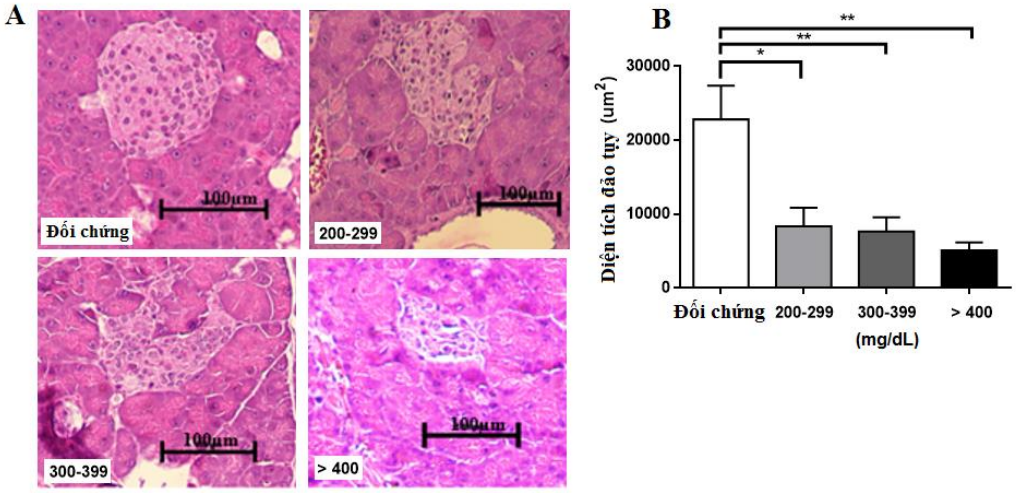
Đánh giá mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da

Về sự hư hại đảo tụy

Để khẳng định mô hình ĐTĐ tạo thành công trên chuột, mô tụy của chuột được thu nhận và nhuộm H&E nhằm đánh giá sự tổn thương của đảo tụy. Ngoài ra chúng tôi còn đánh giá sự tổn thương của đảo tụy ở các mức đường huyết khác nhau. Kết quả nhuộm mô học H&E (Hình 4A) cho thấy đảo tụy ở lô chuột đối chứng có hình dạng to tròn đều được bao bọc trong tuyến tụy ngoại tiết, các nhóm ở lô chuột ĐTĐ với các mức đường huyết từ 200 đến lớn hơn 400 mg/dL có đảo tụy bị biến đổi hình dạng, đồng thời bị teo nhỏ. Ngoài ra, còn nhận thấy, hình thái đảo tụy bị biến dạng càng nhiều ở chuột có mức đường huyết càng cao, rõ nhất là nhóm chuột có mức đường huyết 300–399 mg/dL và lớn hơn 400 mg/dL. Đồng thời khi phân tích diện tích đảo tụy của cả lô đối chứng và lô ĐTĐ ở các mức đường huyết khác nhau nhận thấy diện tích của đảo tụy ở lô ĐTĐ bị giảm rõ rệt so với lô đối chứng (Hình 4B).

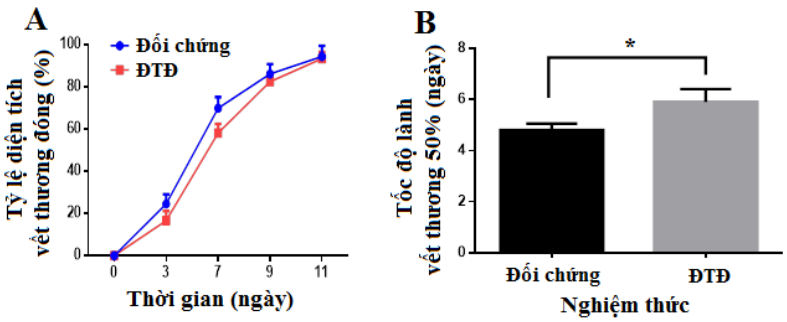
Ở nhóm chuột ĐTĐ, các tế bào β đảo tụy bị teo lại hình thành các khoảng không ở chuột có mức đường huyết 300–399 mg/dL và sự hình thành các hốc không bào trong đảo tụy ở chuột ĐTĐ có mức đường huyết lớn hơn 400 mg/dL chứng tỏ sự hoại tử của tế bào β đảo tụy. Ngoài ra sau khi quan sát tất cả các mạch máu của nhóm chuột đối chứng và chuột ĐTĐ ở các mức đường huyết khác nhau chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt, được thể hiện rõ qua sự dày lên của các thành mạch máu ở nhóm ĐTĐ so với nhóm đối chứng (dữ liệu không trình bày). Điều đó cung cấp thêm cơ sở cho việc hoại tử của tế bào β đảo tụy ở nhóm ĐTĐ ngoài bị hoại tử do STZ, các mạch máu nhóm ĐTĐ bị sung huyết nên không thể vận chuyển đáp ứng đủ lượng oxygen để nuôi tế bào đảo tụy.

Căn cứ vào các kết quả trên cho thấy rằng liều tiêm 125 mg/kg có hiệu quả trong việc tạo mô hình chuột ĐTĐ biểu hiện qua sự biến dạng và phá hủy các tế bào đảo tụy ở cấp độ mô học. Các kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu về mô học đảo tụy chuột ĐTĐ của tác giả Manal Abdul-Hamid và cộng sự (2013) [14] hay của Jiyin Zhou và cộng sự (2009) [11].



Hình 4. Ảnh hưởng của các mức đường huyết khác nhau lên hình dạng (A) và diện tích (B) của đảo tụy *(n=5, p < 0.05)*

Về khả năng tự lành vết thương



Hình 5. Khả năng tự lành vết thương thông qua tỷ lệ diện tích vết thương đóng (A) và tốc độ lành vết thương 50% (B) của chuột ĐTĐ so với chuột đối chứng *(n=5, p < 0,05)*

Nhóm tác giả Trường Đại học Y Kitasato (Nhật Bản) đã chứng minh được khả năng lành vết thương ở chuột ĐTĐ cảm ứng bằng STZ chậm hơn so với chuột đối chứng [15]. Do vậy, sau khi chọn được chuột ĐTĐ đạt chuẩn sức khỏe, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng tự lành vết thương của chuột ĐTĐ. Đúng như kì vọng, kết quả thực nghiệm bước đầu cũng cho thấy với đường kính diện tích vết thương là 12mm ban đầu, theo thời gian, vết thương ở lô chuột ĐTĐ đều đóng chậm hơn so với vết thương ở lô đối chứng (Hình 5A). Đồng thời, tốc độ lành vết thương 50% (Hình 5B) cũng cho thấy chuột ĐTĐ lành chậm hơn so với đối chứng. Kết quả này cũng tương đồng với công bố của tác giả Okizaki và cộng sự (2015) [15].

Thử nghiệm khả năng làm lành vết thương trên mô hình chuột ĐTĐ của rhPDGF-BB

Nhân tố tăng trưởng từ tiểu cầu PDGF (Platelet derived growth factor) là một yếu tố phân bào chủ yếu của nguyên bào sợi, tế bào cơ trơn và nhiều tế bào khác, được sản xuất từ tiểu cầu. PDGF-BB đã được tổ chức FDA- Hoa Kỳ (Food and Drug Admintration) công nhận có hiệu quả trong điều trị tăng cường làm lành vết thương. hPDGF-BB tác động đến nhiều tế bào liên quan trong quá trình hàn gắn vết thương như: kích thích sự phân chia và hướng hóa của nguyên bào sợi [16] và tế bào cơ trơn, kích thích đại thực bào sản xuất và tiết những nhân tố tăng trưởng quan trọng, kích thích sự sản sinh những phân tử fibronectin, collagen, proteoglycan và hyaluronic acid. Ngoài ra, PDGF cũng kích thích nguyên bào sợi tiết ra collagenase có vai trò trong giai đoạn tái sắp xếp cấu trúc mô [17].

Nhằm thử nghiệm mô hình chuột ĐTĐ cảm ứng STZ mang vết thương ngoài da trong đánh giá hiệu quả làm lành vết thương của các dược chất, rhPDGF-BB được chúng tôi lựa chọn sử dụng. Bên cạnh việc đánh giá khả năng làm lành vết thương trên mô hình chuột ĐTĐ của rhPDGF-BB, chúng tôi tiến hành đánh giá tình trạng ĐTĐ và tình trạng sức khỏe của chuột để khẳng định chuột vẫn duy trì tình trạng ĐTĐ và tình trạng sức khỏe trong suốt thời gian thí nghiệm. Sau khi theo dõi trong 2 tuần chúng tôi nhận thấy rằng 100% chuột ở cả lô đối chứng và lô trị liệu rhPDGF-BB đều duy trì được tình trạng bệnh ĐTĐ và đạt sức khỏe ổn định, đây cũng là một yếu tố quan trọng để đánh giá việc tạo thành công mô hình.Với lượng dùng 7,07µg/vết thương/ngày, rhPDGF-BB bước đầu cho thấy có hiệu quả trong việc thúc đẩy quá trình lành vết thương thông qua tỷ lệ % đóng vết thương ở các mốc thời gian khảo sát, đặc biệt là ở ngày 3 gấp khoảng 1.4 lần so với lô đối chứng. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả David G. Greenhalgh và cộng sự (1990) [18].

KẾT LUẬN

Với những kết quả thực nghiệm thu nhận được, chúng tôi đã bước đầu xây dựng thành công mô hình chuột ĐTĐ mang vết thương ngoài da nhằm ứng dụng thử nghiệm hiệu quả trị liệu vết thương lâu lành của các dược chất hoặc các nhân tố tăng trưởng tiềm năng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập được bộ quy chuẩn đánh giá cảm quan tình trạng sức khỏe chuột với hiệu quả ứng dụng cao khi 100 % chuột được đánh giá đạt chuẩn sức khỏe đều sống sóng sau khi tạo vết thương ngoài da. Các thông số đã được khảo sát tối ưu cho việc tạo mô hình chuột đái tháo đường mang vết thương ngoài da bao gồm: trọng lượng chuột đầu vào từ 20–28 g, liều tiêm STZ là 125 mg/kg và thời điểm tạo vết thương ngoài da cho chuột là 1 hoặc 2 tuần sau khi tiêm STZ. Với các thông số này, hiện chúng tôi thu nhận được tỉ lệ chuột đạt yêu cầu của mô hình (tình trạng đái tháo đường ổn định và sống sót ít nhất 2 tuần sau khi tạo vết thương) là khoảng 40 %. Mô hình chuột ĐTĐ trong nghiên cứu này đã được khẳng định tình trạng ĐTĐ thông qua đánh giá sự hư hại đảo tụy ở cấp độ mô học và khả năng tự lành vết thương bị chậm đi so với chuột đối chứng. Mô hình cũng đã được thử ứng dụng trong khảo sát hoạt tính làm lành vết thương của protein rhPDGF-BB. Những kết quả thu được này sẽ là tiền

đề cho các nghiên cứu thử nghiệm trị liệu vết thương do ĐTĐ trên mô hình động vật.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Sở KH&CN Tp. HCM "Nghiên cứu tạo yếu tố tăng trưởng tái tổ hợp từ tiểu cầu (Platelet-derived growth factor-PDGF) nhằm điều trị loét bàn chân đái tháo đường" (số hợp đồng: 219/2013/HĐĐH-SKHCN)*

Construction of diabetic mice model carrying external wound for the evaluation of topical applications on the impaired wound healing

- **Vu Kha Thanh Thanh**
- **Duong Thi Minh Phung**
- **Nguyen Thanh Huy**
- **Nguyen Van Hung**
- **Nguyen Tri Nhan**
- **Tran Linh Thuoc**
- **Dang Thi Phuong Thao**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Chronic leg ulcer is one of the diabetic complications causing continuous pain and higher mortality risk. The therapeutic treatment of chronic diabetic wounds can be studied through animal models which simulate the human pathology. Experimental diabetes in mice induced by streptozotocin (STZ) is an easy method with low cost. There have been several studies using STZ for diabetic mice model of cutaneous excisional wound. However, those procedures are different in many factors such as dose of STZ, mouse weight, blood glucose level and the method for assessing health status in mice. We have constructed the criteria to evaluate the health status of the experimental mice including skin color, fur condition, ability to move and body condition. These criteria of health status wereused together with the blood glucose level to evaluate the male mice's sensitivity to a single high dose (100-150 mg/kg) of STZ. Approximately 40 % of 20–28 g weighted mice, which were injected by 125 mg/kg STZ, developed diabetes in a good health status in the first two weeks after injection. Mice with blood glucose level higher than 200 mg/dL had damaged islet and stably high blood glucose as well as stable health status after two weeks carrying wounds. The wound healing process of the diabetic wounded mice occured relatively slower than that of the control group (non diabetic). The model of diabetic wounded mice has been used to evaluate of the wound healing effect of the rhPDGF-BB protein which has been used in the treatment of chronic wounds caused by human diabetes.

Keywords: *mice model, diabetes, chronic wounds, streptozotocin, wound healing process, platelet - derived growth factor*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. IDF DIABETES ATLAS Sixth edition. *International Diabetes Federation* (2014).

[2]. K. Alexiadou, J. Doupis, Management of Diabetic Foot Ulcers, *Diabetes Ther*., 3, 1–15 (2012).

[3]. A.J.F. King, The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166, 877–894 (2012).

[4]. K. Kintoko, Q. Wen, X. Lin, N. Zheng, X. Xu, R. Huang, Diabetogenic activity of streptozotocin on kunming strain mice as animal model of diabetes mellitus,*IOSR-Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9, 48–53 (2014).

[5]. A. Sachin, K.O. Shreesh, V. Divya, Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in swiss albino mice,*Global Journal of Pharmacology*, 3, 81–84 (2009).

[6]. H. Koji, K. Rhyoji, I. Mikio, Strain Differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice,*Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 1110–1119 (2006).

[7]. V.K.T. Thanh, N.T.H. Trang, N.T. Nhan, T.L. Thuoc, D.T.P. Thao, Khảo sát quy trình tinh chế nhân tố tăng trưởng từ tiểu cầu người hPDGF-BB (human platelet - derived growth factor BB) tái tổ hợp, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* (2015)

[8]. Nguyễn Phạm Phương Thanh, Nguyễn Trí Nhân, Đặng Thị Phương Thao, Khảo sát chọn lọc và tối ưu qui trình thử nghiệm hoạt tính PDGF người (Platelet-Derived Growth Factor) tái tổ hợp *in vitro*, *Tạp chí sinh học*, 37, 238–244 (2015).

[9]. T. Burkholder, C. Foltz, E. Karlsson, C.G. Linton, J.M. Smith, Health evaluation of experimental laboratory mice, *Curr*. *Protoc*. *Mouse Biol*., 2, 145–165 (2012).

[10]. M.H. Ullman-Culleré, C.J. Foltz, Body Condition Scoring: A rapid and accurate method for assessing health status in mice, *Laboratory Animal Science*, 49, 319–323 (1999).

[11]. Z. Jiyin, Z. Shiwen, T. Jianlin, Z. Kebin, G. Lixia, H. Yongping, X. Ying, Y. Yi, Z. Le, L. Dandan, Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/ high-fat diet-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 606, 262–268 (2009).

[12]. I.F.M. Liane, M.A.D. Ana, C. Eugénia, C.S. Hermínio, Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomaterialia*, 9, 7093–7114 (2013).

[13]. R. Nunan, K.G. Harding, P. Martin, Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity, *Disease Models & Mechanisms*, 7, 1205–1213 (2014).

[14]. M.A. Hamid, N. Moustafa, Protective effect of curcumin on histopathology and ultrastructure of pancreas in the alloxan treated rats for induction of diabetes, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 66, 169–179 (2013).

[15]. S.I. Okizaki, Y. Ito, K. Hosono, K. Oba, H. Ohkubo, H. Amano, M. Shichiri, M. Majima, Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF-β1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 70, 317–325 (2015).

[16]. H.A. Ricardo, M.K.Hagopm, E.C. Jorge, Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo*. *Clin*. *Proc*., 81, 1241–1257 (2006).

[17]. E.A. Bauer, T.W. Cooper, J.S. Huang, J. Altman, T.F. Deuel, Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA*, 82, 4132–4136 (1985).

[18]. G.G. David, H.S. Katherine, J.M. Mark, R. Russell, PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse, *American Journal of Pathology*, 136, 1235–1246 (1990).