تعدیل بیان TGF-β و TNF-α به نفع ترمیم زخم توسط عصاره لارو مگس

شهرام کمالی[۱]، سهراب بوذرپور[۲]، مجید مومنی مقدم[۱،*]

۱. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد، گنبد کاووس، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۷

چکیده

زمینه و هدف ایجاد زخم؛ از ساده تا پیشرفته و از حاد تا مزمن، یکی از مشکلاتی است که بشر از دیرباز با آن مواجه بوده است. در نیمه قرن گذشته و با کشف آنتی‌بیوتیک‌ها، توانایی بشر در مدیریت زخم، بسیار بهتر از گذشته شد اما مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دهه‌های اخیر به مشکلی جدی برای کنترل زخم به‌ویژه زخم‌های مزمن تبدیل شده و لذا روش‌های درمانی متفاوت مورد نیاز می‌باشند. لارو درمانی، یک روش قدیمی است که نیازمند بررسی و شناخت سلولی مولکولی است و تأیید عملکرد آن می‌تواند به تهیه داروهای جدید منجر شود.

مواد و روش‌ها در این مطالعه، ابتدا لارو مگس لوسیلیا سریکاتا تهیه و عصاره آن تهیه شد و در مرحله بعد این عصاره بر سلول‌های فیبروبلاستی تأثیر داده شد و بررسی سلولی مولکولی در مورد نحوه تأثیر انجام گردید.

یافته‌ها سلول‌ها در تست MTT همان‌طور که طبق مقالات قبلی، قابل پیش‌بینی بود رشد معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری نتایج نشان‌دهنده این موضوع می‌باشند که بیان ژن TNF-α در نمونه تیمار ۸ برابر نمونه کنترل بود. بیان ژن SMAD-2 در نمونه تیمار ۶ برابر نمونه کنترل بود. بیان ژن TGF-β در نمونه تیمار ۴ برابر نمونه کنترل بود. با توجه به اثر افزایشی بر رشد فیبروبلاست و تأیید مولکولی ژن‌های فوق پیشنهاد می‌شود این عصاره دارای توانایی برای درمان زخم می‌باشد.

کلیدواژه‌ها:
TNF-α، ترمیم زخم، لارودرمانی.

۱. مقدمه

زخم با ایجاد آسیب و تخریب پوست، منجر به اختلال در آناتومی ساختاری و از دست رفتن عملکرد پوست می‌شود. فاکتورهای مختلفی در تقسیم‌بندی انواع زخم وجود دارد. زمان لازم برای ترمیم زخم، یکی از مهم‌ترین فاکتورها در تقسیم‌بندی انواع زخم است. بر اساس این فاکتور، زخم‌ها در دو گروه حاد و مزمن قرار می‌گیرند (۱). التیام زخم، فرایند بسیار پیچیده‌ای است که طی آن، پوست در پاسخ به آسیب‌های وارد شده، خود را تعمیر می‌کند. فرایند التیام زخم به چند مرحله تقسیم می‌شود: هموستاز، التهاب، فاز تکثیری و در نهایت فاز بازسازی. این مراحل به‌طور پیوسته و همراه با برخی وقایع بیوشیمیایی رخ می‌دهد و در انتها منجر به ترمیم بافت آسیب‌دیده می‌شوند. سرعت ترمیم زخم به برخی فاکتورهای محلی و سیستمیک وابسته است که وضعیت التهاب و سطوح فاکتورهای رشد از مهم‌ترین عوامل در محدودسازی سرعت یا توقف ترمیم زخم به

* **نویسندهٔ مسئول: مجید مومنی مقدم**
نشانی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۵۱۶۰۰۵۳
رایانامه: m.momeni@hsu.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-8372-1310
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0003-1491-3153

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۸، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰، ص ۹۱-۹۸
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

حساب می‌آیند. بنابراین کنترل التهاب و تنظیم بیان ژن‌های مفید در ترمیم زخم، در پیشبرد ترمیم زخم بسیار اهمیت دارد (۲).

هزینه بالا و عدم‌تأثیر مناسب و دلخواه در پیشبرد ترمیم زخم طی استفاده از روش‌های درمانی فعلی، نیاز به یافتن یک روش درمانی آسان، مؤثر و ارزان‌قیمت در ترمیم زخم‌های مزمن را توجیه می‌کند. جستجو در روش‌های درمانی گذشتگان می‌تواند در یافتن روش درمانی مناسب، مؤثر باشد. زیست‌درمانی می‌تواند یکی از تکنیک‌های مناسب برای جایگزینی با روش‌های کلینیکی امروزه و استفاده از داروهای صناعی باشد. استفاده از لارو زنده مگس‌های خانواده Calliphoradea در ترمیم زخم‌های مزمن، ماگوت‌درمانی یا لارودرمانی نامیده می‌شود (۳). در لارو درمانی، لارو مگس *Lucilia sericata* روی زخم قرار داده می‌شود که لارو با تغذیه از بافت نکروزه زخم، منجر به پاک‌سازی زخم می‌شود و با انجام دبریدمان، پیشرفت ترمیم زخم را رقم می‌زند. بعد از گذشت مدتی، پیدایش سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و شکست روش‌های درمانی رایج در درمان زخم‌های مزمن باعث شد تا امروزه لارودرمانی دوباره مورد توجه قرار بگیرد (۴). طی چند سال گذشته، لارودرمانی به قدری گسترش یافت و تجربیات موفق در این زمینه ثبت شد که سازمان غذا و دارو در سال ۲۰۰۴ میلادی، لارودرمانی را به‌عنوان روشی برای درمان تأیید کرد (۵). دبریدمان، به معنی حذف بافت‌های مرده نکروزه و بافت‌های آسیب‌دیده زخم و همچنین حذف باکتری‌های بیماری‌زا از فضای زخم است (۶). در واقع، لارو با تغذیه از بافت نکروزه و باکتری‌های موجود در زخم امکان تداوم حیات خود را فراهم می‌کند. لاروها از دو مکانیسم فیزیکی و شیمیایی در دبریدمان استفاده می‌کنند. در مکانیسم شیمیایی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، کلاژناز، شبه تریپسین و شبه کیموتریپسین موجود در ترشحات لارو فعالیت دارند (۷). این آنزیم‌ها منجر به تجزیه شیمیایی اجزای آسیب‌دیده زخم می‌شوند. لاروها دارای یک جفت قلاب دهانی هستند که این قلاب‌ها را در بافت زخم فرو می‌برند و از آن به‌عنوان تکیه‌گاهی برای حرکت رو به جلو استفاده می‌کنند. در دبریدمان فیزیکی، فرورفتن قلاب‌های دهانی در بافت نکروزه باعث قطعه‌قطعه شدن این بافت می‌شود و اجازه تأثیرگذاری بهتر آنزیم‌های دبریدمان ترشح شده توسط لارو در این بافت‌ها را افزایش خواهد داد (۶). لارو، ترکیبی از آنزیم‌های پروتئولیتیک، آمونیاک و ترکیبات ضدمیکروبی را به فضای زخم ترشح می‌کند. به این شکل، بافت مرده و آسیب‌دیده به حالت نیمه‌مایع درمی‌آید و هضم و گوارش آن‌ها توسط لارو تسهیل می‌شود (۸). ترشحات لارو، شستشوی زخم را انجام می‌دهد و باعث شستن و حذف باقی‌مانده‌های بافت مرده می‌شود. لاروها تنها از بافت مرده زخم تغذیه می‌کنند و به این شکل با حذف بافت مرده، زخم به عمل دبریدمان کمک می‌کنند. دبریدمان زخم، بدون آسیب‌رسانی به بافت سالم، مانند میکروجراحی عمل می‌کند (۹).

سلول‌های فیبروبلاست، از جمله مهم‌ترین سلول‌های درگیر در ترمیم زخم هستند. این سلول‌ها تقریباً در تمامی مراحل ترمیم زخم فعالیت دارد و منجر به پیشبرد این فرایند می‌شوند. فیبروبلاست‌ها به لخته فیبرینی حمله می‌کنند، لخته فیبرینی را تخریب و حذف می‌کنند و مسیر را برای مهاجرت خود و سایر سلول‌های ترمیمی به فضای زخم باز می‌نمایند (۱۰). ماتریکس خارج سلولی، یکی از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل در پیشبرد صحیح ترمیم زخم به شمار می‌آید. فیروبلاست‌ها با تولید و ترشح اجزای ماتریکس خارج سلولی به فضای زخم و همچنین تعامل و میان‌کنش با این اجزا، نقش اساسی در پیشبرد زخم را ایفا خواهند کرد. ماتریکس خارج سلولی، داربست و تکیه‌گاه فیزیکی را برای تشکیل بافت تازه، فراهم و به‌عنوان مخزن ذخیره سایتوکاین‌های ترمیمی عمل می‌کند. بنابراین تکثیر و فعالیت فیبروبلاست‌ها در تنظیم تولید و ترشح اجزای ماتریکس خارج‌سلولی و در نهایت ترمیم صحیح و به‌موقع زخم عمل می‌کند. فیبروبلاست‌ها علاوه بر نقشی که در تولید ماتریکس خارج‌سلولی دارند، با تولید آنزیم‌های پروتئولیتیک (مانند پروتئینازها) در تخریب هدایت شده اجزای ماتریکس خارج‌سلولی آسیب‌دیده و تأمین مسیر مناسب برای مهاجرت سلول‌ها، رگزایی، تکثیر سلول‌ها و بازسازی بافت، نقش دارند (۱۱). ترکیبات تولید شده توسط فیبروبلاست‌ها در مراحل اولیه ترمیم زخم، نقش ایفا می‌کنند. سپس سلول‌های فیبروبلاست، خود، در مراحل بعدی وارد می‌شوند و ترمیم زخم را به پیش می‌برند. فیبروبلاست‌ها تکثیر می‌شوند و بخش اعظمی از سلول‌های بافت ترمیم‌شده را تشکیل می‌دهند. در نهایت، فیبروبلاست‌های حاضر در لبه‌های زخم به میوفیبروبلاست تمایزیافته، منقبض می‌شوند و منجر به بسته شدن زخم می‌گردند (۱۰). فیبروبلاست‌ها با کنترل تشکیل بافت فیبروپلازیا و تولید و ترشح سایتوکاین‌های ترمیمی، نقش اساسی در تنظیم ترمیم زخم دارند (۱۲). TGF-β و TNF-α دو سایتوکاین بسیار مهم در فرایند ترمیم زخم هستند که توسط سلول‌های ترمیمی، تولید و به فضای زخم وارد می‌شوند.

فاکتورهای رشد، مولکول‌های پلی‌پپتیدی هستند که محرک تکثیر سلول‌ها، شیمیوتاکسی، رگزایی، بیان پروتئین‌ها

و تولید آنزیم‌ها در ترمیم زخم هستند. برخی سایتوکاین‌ها مانند TGF-β، pDGF، EGF در مراحل اولیه ترمیم زخم وارد می‌شوند. این سایتوکاین‌ها جذب‌کننده سلول‌های ترمیمی مانند سلول‌های سیستم ایمنی، فیبروبلاست‌ها، اندوتلیال‌ها و کراتینوسیت‌ها هستند. برخی سایتوکاین‌ها مانند TNF، IGF و در مراحل میانی ترمیم زخم نقش دارند. این سایتوکاین‌ها منجر به بازسازی بافت آسیب‌دیده و پایان دادن به ترمیم زخم خواهند شد (۱۳).

سایتوکاین TNF منجر به افزایش پروتوانکوژن c-myc در سلول‌های فیبروبلاست در سطح mRNA می‌شود. TNF تولید شده توسط سلول‌های فیبروبلاست، منجر به افزایش تولید IL-6 در سلول‌های ایمنی می‌گردد. TNF با تأثیر بر سلول‌های فیبروبلاست، منجر به افزایش سطح cAMP درون‌سلولی در سلول‌های فیبروبلاست می‌شود و آبشار پروتئین کینازی را در این سلول‌ها به راه می‌اندازد. این مسیر، منتهی به تولید IL-6 در فیبروبلاست خواهد شد (۱۴).

تا کنون روش‌های کلینیکی مختلفی به‌منظور پیشبرد ترمیم زخم‌های مزمن ارائه شده است اما در اکثر موارد به دلیل هزینه بالا، این روش‌ها پس از مدتی با شکست مواجه شده‌اند. لارودرمانی، تکنیکی آسان و پربازده در ترمیم زخم‌های مزمن ارائه کرده است. مکانیسم مولکولی عملکرد لارو در بازسازی بافت طی ترمیم زخم، به‌طور کامل شناسایی نشده است. در این مطالعه تأثیر عصاره لارو *Lucilia sericata* بر بیان ژن‌های TGF-β، SMAD-2 و TNF-α در سلول‌های فیبروبلاست‌های 3T3 مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. پرورش و تهیه عصاره لارو

لاروهای استریل مگس *Lucilia esricata* تازه از تخم خارج شده از شرکت زیست فناوران شهر آوان شهر دزفول خریداری شد. لاروها به مدت سه روز در دستگاه انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط استریل قرار داده شد و در این مدت در فواصل زمانی ۸ ساعته با گوشت تازه گاو تغذیه شدند. لاروها در سن سه روز، جمع‌آوری و به ظرف جدید استریل منتقل شدند و با استفاده از یک میله شیشه‌ای، خرد و هموژن شدند. سپس به‌ازای هر ۵ لارو مقدار ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اتوکلاو شده اضافه شد. سپس در سانتریفوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. پس از آن، محلول رویی (که حاوی عصاره کامل بدن لارو است) جمع‌آوری گردید، از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد، تقسیم‌بندی شد و تا انجام مراحل بعدی در فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۲.۲. کشت و تیمار سلول‌های 3T3

سلول‌های فیبروبلاست 3T3 استفاده شده از دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت کشت فعال تهیه شدند. پس از انتقال سلول‌ها به فلاسک‌های حاوی محیط کشت، فلاسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO2 نگهداری شدند. سلول‌های فیبروبلاست 3T3 با استفاده از عصاره لارو *Lucilia sericata* تیمار شدند. نخست سلول‌های کشت شده به مقدار مساوی میان ۴ فلاسک تقسیم شدند.

پس از گذشت حدود چند ساعت که سلول‌ها به کف فلاسک چسبیدند، محیط کشت قبلی از فلاسک‌ها خارج شد. سپس به هر فلاسک محیط کشت جدید وارد شد. در مرحله بعد، سلول‌های باقی‌مانده در کف فلاسک به‌منظور عمل تیمار مورد استفاده قرار گرفت. برای رسیدن به این هدف، نیمی از فلاسک‌ها به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شدند. دو فلاسک برای تیمار سلول‌ها با عصاره استفاده شد. به هر فلاسک تیمار مقدار ۱۷۰ میکرولیتر عصاره لارو و به هر فلاسک کنترل میزان ۱۷۰ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاوشده افزوده شد.سپس فلاسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور مخصوص کشت سلول قرار داده شدند. تیمار به مدت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام و سپس از کف فلاسک‌ها توسط تریپسین کنده شد و پس از شستشو و سانتریفوژ به پلت حاصل محلول ترایزول اضافه گردید، ویال‌ها به فریز منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا بعداً برای بررسی مولکولی استفاده شوند.

۳.۲. تست MTT و بررسی میزان رشد

به‌منظور بررسی تأثیر عصاره لارو بر رشد سلول فیبروبلاستی در پلیت ۹۶ چاهکه آزمون MTT بین روزهای اول تا سوم بررسی شدند. در این مطالعه، طبق مطالعات قبلی غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره استفاده گردید.

۴.۲. مطالعات مولکولی

به‌منظور بررسی و مقایسه تغییرات بیان ژن‌های هدف در سلول‌های 3T3 تیمار شده با عصاره لارو، از روش relative Real-Time PCR استفاده شد. بدین منظور، طراحی پرایمر، سپس استخراج RNA کل سلول، بعد از آن ساخت cDNA مکمل تک‌رشته با استفاده از الگوی RNA و در مرحله بعد تکثیر cDNA ژن‌های مورد نظر با استفاده از روش Real-Time PCR و در نهایت تحلیل نتایج Real-Time PCR و مقایسه تفاوت

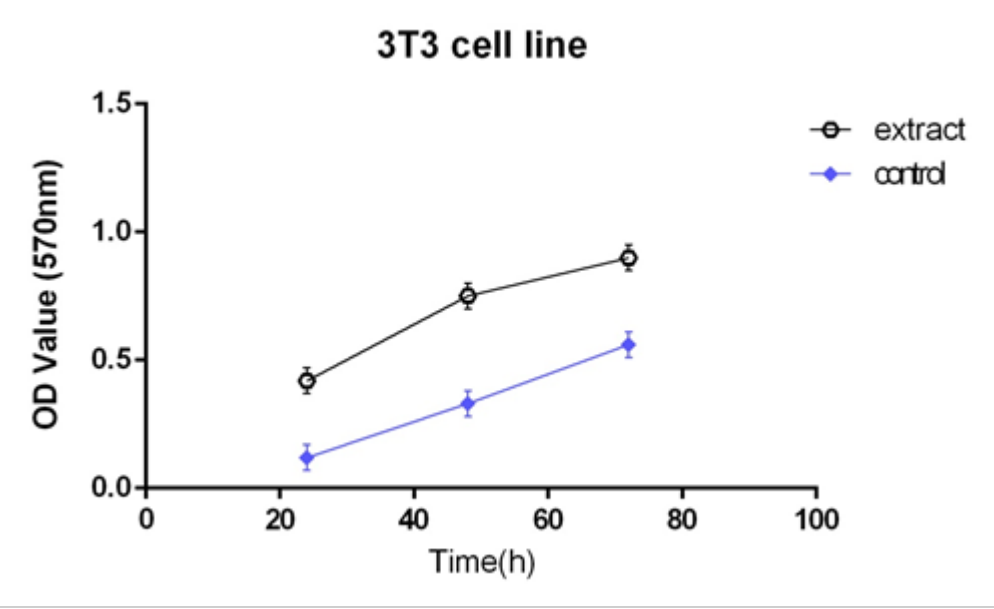
میزان بیان ژن هدف در سلول کنترل و تیمار شده با عصاره لارو انجام شد. ژن *β-actin* به‌عنوان ژن مرجع برگزیده شد و ژن‌های *TGF-β*، *SMAD-2* و *TNF-α* به عنوان ژن‌های هدف انتخاب شدند. برای طراحی پرایمر باید از توالی mRNA یا cDNA آن‌ها استفاده شود. توالی mRNA ژن‌های موردنظر از سایت NCBI به‌دست آمد. با قرار دادن این توالی‌ها در نرم‌افزار Gene Runner، پرایمرهای رفت و برگشت موردنظر با دمای اتصال ۶۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد طراحی شد، توالی پرایمرها و اطلاعات لازم در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای انتخاب شده و اطلاعات ژن ها

Primer name	Sequences	NCBI Reference Sequence
TGF-β-f	AAGTTGGCATGGTAGCCCTT	NM_011577.2
TGF-β-r	GGAGAGCCCTGGATACCAAC	NM_011577.2
smad-2-f	GTAAAGGCCTGTTGTGTCCC	NM_001252481.1
smad-2-r	CAGGACGGTTAGATGAGCTTG	NM_001252481.1
β-actin-f	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	NM_007393.5
β-actin-r	ATGGAGGGGAATACAGCCC	NM_007393.5
TNF-α-f	GGTCTGGGCCATAGAACTGA	BC137720.1
TNF-α-r	GGAGAGCCCTGGATACCAAC	BC137720.1

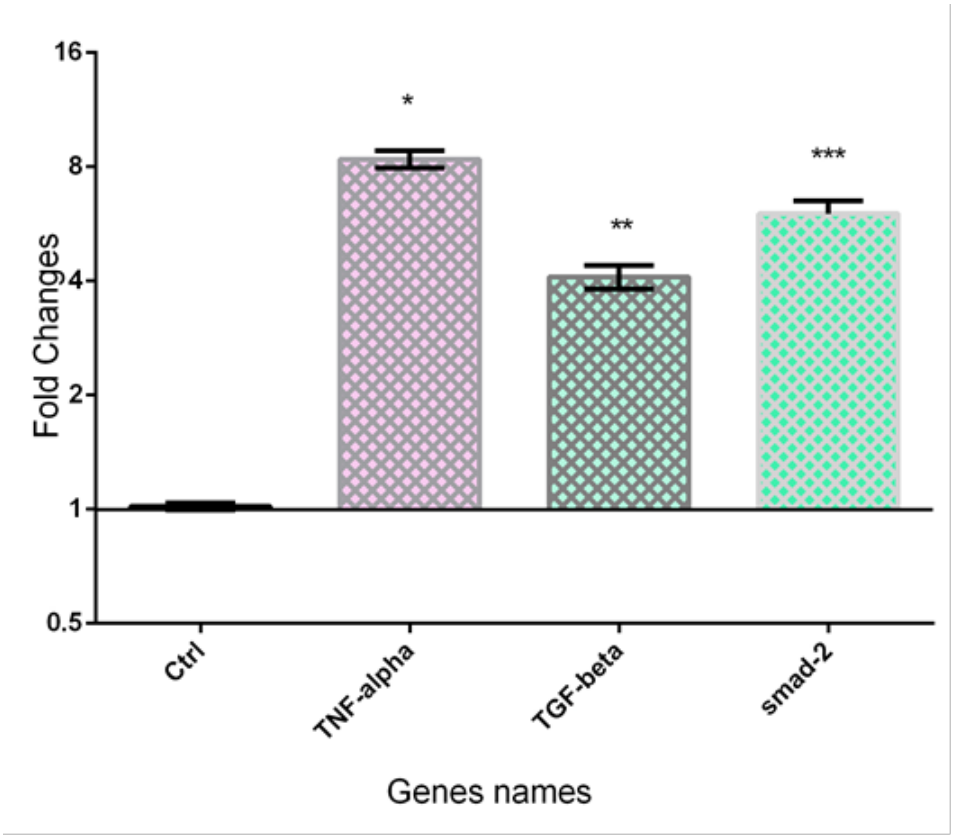
۳. یافته ها

سلول‌ها در تست MTT همان‌طور که طبق مقالات قبلی، قابل پیش‌بینی بود رشد معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند. نتایج رشد سلول‌ها در شکل ۱ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۱. بررسی تأثیر عصاره بر رشد سلول‌های فیبروبلاستی، مقدار رشد سلول‌های فیبروبلاست دریافت‌کننده عصاره با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به گروه کنترل که عصاره‌ای دریافت نکرده است رشد معناداری دارد، جذب در ۵۷۰ نانومتر و در روزهای اول، دوم و سوم پس از تیمار خوانده شده است.

نتایج بخش مولکولی نشان می‌دهد که میزان بیان سه ژن TGF-β و smad-2 و TNF در سلول‌های تیمارشده با ترشحات لارو نسبت به نمونه کنترل، افزایش یافته است (شکل ۲). بیان ژن TNF-α در نمونه تیمار ۸ برابر نمونه کنترل بود. بیان ژن SMAD-2 در نمونه تیمار ۶ برابر نمونه کنترل بود. بیان ژن TGF-β در نمونه تیمار ۴ برابر نمونه کنترل بود. بر اساس فرمول فقل، میزان بیان ژن مرجع، معادل عدد یک در نظر گرفته می‌شود و بیان ژن هدف نسبت به ژن مرجع، محاسبه می‌شود. افزایش بیان ژن بیش از دو برابر یا کاهش کمتر از نیم، از نظر آماری، معنادار خواهد بود.



ش شکل ۲. بررسی بیان ژن‌های TGF-β و smad-2 و TNF پس از دریافت عصاره در گراف رسم شده است که نشان‌دهنده افزایش بیان معنادار نسبت به گروه کنترل فاقد عصاره می‌باشد. محور افقی، نام ژن‌های بررسی شده است و محور عمودی میزان تغییرات بیانی ژن‌ها می‌باشد که با fold Change گزارش می‌شود و تغییرات بالای دو برابر، تغییر معنی‌دار می‌باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

طی چند سال گذشته، لارودرمانی به اندازه‌ای گسترش یافت و تجربیات موفق در این زمینه ثبت شد که سازمان غذا و دارو در سال ۲۰۰۴ میلادی، لارودرمانی را به‌عنوان روشی برای درمان زخم‌های مربوط به عضلات صاف، تأیید کرد (۵). زمانی که روش‌های ترمیمی رایج مانند جراحی یا استفاده از پوشش‌های هیدروکلوئید، قادر به ترمیم زخم نباشند، از لارودرمانی استفاده می‌شود (۹). در مواردی که زخم مزمن با درمان‌های رایج درمان نشده و قطع عضو آسیب‌دیده راه‌حل ارائه شده است، لارودرمانی باعث ترمیم محدود زخم می‌شود و نیاز به قطع عضو برطرف می‌گردد (۵). در درمان آبسه، سوختگی، گانگرن، استئومیلیت، تالاسمی، کارسینوم سلول پایه، زخم پای دیابتی و زخم-فشاری، از لارودرمانی استفاده می‌شود. لارودرمانی اغلب برای ترمیم زخم‌های مزمن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹).

مطالعات نشان می‌دهد که فیبروبلاست‌ها ۴۸ ساعت پس از قرار گرفتن در مجاورت عصاره گوارشی لارو (در دو غلظت ۱µg/ml و ۵ µg/ml) در دو جهت افقی و عمودی مهاجرت کرده بودند و دارای شکل گسترده‌تری نسبت به نمونه کنترل بودند. در حالی که غلظت بالای عصاره گوارشی لارو (۱۰ µg/ml) منجر به مهار مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست نسبت به نمونه کنترل شده بود (۱۵). حضور سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت عصاره گوارشی لارو با غلظت ۱۰ µg/ml، منجر به کاهش تعداد سلول‌های فیبروبلاست متصل به ماتریکس شده بود. سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت عصاره گوارشی لارو دارای سطح کم‌تر و ظاهر گردتری نسبت به نمونه کنترل داشتند. در بعضی از این سلول‌ها فیلوپودیا نیز تشکیل شده بود. قرارگیری و انکوباسیون فیبرونکتین همراه با عصاره گوارشی لارو منجر به شکست فیبرونکتین می‌شود. به عبارتی عصاره گوارشی لارو با تأثیر بر فیبرونکتین و تغییر در ساختار فیبرونکتین

منجر به کاهش اتصال فیبروبلاست به فیبرونکتین می‌شود و امکان مهاجرت فیبروبلاست‌ها را فراهم می‌کند (۱۶). در واقع با افزایش بیان ژن TGF-β در سلول‌های فیبروبلاست، میزان تکثیر این سلول‌ها افزایش می‌یابد، این سلول‌ها در محل زخم تجمع می‌یابند، TGF-β محرک تولید اجزای ماتریکس خارج‌سلولی در سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد، تشکیل و بازسازی ماتریکس خارج‌سلولی، منجر به مهار بیان ژن و تولید TGF-β می‌گردد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و تولید ماتریکس خارج‌سلولی در این سلول‌ها متوقف خواهد شد. فیبروبلاست‌ها اجزای ماتریکس خارج‌سلولی را تولید و ترشح می‌کنند. سپس سلول‌های فیبروبلاست از طریق گیرنده‌های خود با اجزای ماتریکس خارج‌سلولی، میان‌کنش می‌دهند که در اثر این میان‌کنش، رفتار سلول‌ها مانند تکثیر، مهاجرت و تمایز، تنظیم و کنترل می‌شود (۱۷). به این شکل، تجمع سلول‌ها و اجزای ماتریکس خارج‌سلولی در یک محدوده کنترل شده انجام می‌پذیرد و زخم مزمن، بهبود خواهد یافت و از پیشرفت ترمیم در راستای پاسخ پاتولوژی، جلوگیری خواهد شد.

عصاره لارو، منجر به افزایش بیان ژن TNF-α نیز در سلول‌های فیبروبلاست می‌گردد. از طرفی به دنبال تولید TGF-β علاوه بر تولید رگ‌های خونی جدید در محل زخم، اجزای ماتریکس خارج سلولی نیز تولید می‌شوند. اجزای ماتریکس خارج‌سلولی تحریک تولید شبکه رگی جدید توسط TNF-α در بافت در حال ترمیم را پشتیبانی می‌کنند. سایتوکاین TNF-α با تحریک تولید کلاژناز، در پاک‌سازی زخم از کلاژن شکسته و آسیب‌دیده نقش دارد، از سویی سایتوکاین TGF-β با تحریک تولید کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها، منجر به تولید ماتریکس خارج‌سلولی جدید در فضای زخم می‌گردد. عصاره لارو منجر به افزایش تولید هر دو سایتوکاین TNF-α و TGF-β در فیبروبلاست‌ها می‌شود و به این شکل، زمینه بازسازی ماتریکس خارج‌سلولی در فضای زخم را فراهم می‌کند.

با افزایش بیان ژن TGF-β، میزان تولید این سایتوکاین افزایش یافته است. TGF-β با قرارگیری روی گیرنده اینتگرینی خود در سطح سلول‌های 3T3 منجر به راه‌اندازی مسیر سرین ترئونین کینازی و فعال شدن SMAD-2 می‌گردد. بنابراین افزایش بیان ژن SMAD-2 نتیجه افزایش بیان TGF-β بوده است. TGF-β با قرارگیری روی گیرنده خود در سطح سلول‌های 3T3 منجر به راه‌اندازی مسیر فسفریلاسیون SMAD می‌گردد. به دنبال فعال شدن این مسیر، تولید کلاژن‌های ۱ و ۳ در سلول‌های 3T3 آغاز خواهد شد. آغاز این مسیر، سلول‌های 3T3 را در جهت تمایز به سلول‌های فیبروبلاست هدایت خواهد کرد. همان‌طور که مطرح شد TNF-α باعث افزایش تولید β-actin خواهد شد و اسکلت سلولی سلول‌ها را در راستای تمایز به فیبروبلاست تغییر خواهد داد. به عبارتی می‌توان گفت همکاری TGF-β و TNF-α منجر به افزایش سلول‌های فیبروبلاست می‌شود، اجزای تخریب شده ماتریکس خارج سلولی را حذف می‌کنند، محرک تولید ماتریکس خارج‌سلولی جدید و محرک رگزایی است و در فضای زخم، بازسازی بافت آسیب‌دیده و تولید بافت جدید قدرتمند را پیش خواهد برد.

References

[1]. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Current problems in surgery. 2001;38(2):72-140.
[2]. Li PN, Li H, Zhong LX, Sun Y, Yu LJ, Wu ML, et al. Molecular events underlying maggot extract promoted rat in vivo and human in vitro skin wound healing. Wound Repair and Regeneration. 2015;23(1):65-73.
[3]. Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). JBJS. 1931;13(3):438-75.
[4]. Cazander G, Pritchard DI, Nigam Y, Jung W, Nibbering PH. Multiple actions of Lucilia sericata larvae in hard-to- heal wounds. Bioessays. 2013;35(12):1083-92.
[5]. Sherman RA, Mumcuoglu KY, Grassberger M, Tantawi TI. Maggot therapy. Biotherapy-History, Principles and Practice: Springer; 2013: 5-29.
[6]. Gupta A. A review of the use of maggots in wound therapy. Annals of plastic surgery. 2008;60(2):224-7.
[7]. Chambers L, Woodrow S, Brown A, Harris P, Phillips D, Hall M, et al. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva Lucilia sericata used for the clinical debridement of non- healing wounds. British Journal of Dermatology. 2003;148(1):14-23.
[8]. Wilson M, Nigam Y, Jung W, Knight J, Pritchard D. The impacts of larval density and protease inhibition on feeding in medicinal larvae of the greenbottle fly Lucilia sericata. Medical and veterinary entomology. 2016;30(1):1-7.
[9]. Mumcuoglu KY. Clinical applications for maggots in wound care. American journal of clinical dermatology. 2001;2(4):219-27.
[10]. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science. 1999;285(5430):1028-33.
[11]. Werdin F, Tennenhaus M, Schaller H-E, Rennekampff H-O. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. Eplasty. 2009;9.
[12]. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C, et al. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. Matrix biology. 2000;19(4):325-32.
[13]. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. Surgical Clinics of North America. 1997;77(3):575-86.
[14]. Zhang Y, Lin J-X, Yip YK, Vilcek J. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988;85(18):6802-5.
[15]. Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel

3D model by Lucilia sericata larval secretions. Journal of Investigative Dermatology. 2006;126(6):1410-8.
[16]. Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from Lucilia sericata larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin- coated surface. Wound repair and regeneration. 2005;13(4):422-33.
[17]. Weiner FR, Shah A, Smith PJ, Rubin CS, Zern MA. Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor. alpha. Biochemistry. 1989;28(9):4094-9.

Modulation of TGF-β and TNF-α expression in wound healing by fly larvae extract

Shahram Kamali[1], Sohrab Boozarpour[2], Madjid Momeni-Moghaddam[1,*]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad kavous University, Gonbad kavous, Golestan, Iran

Abstract

Creating wounds from simple to advanced and from acute to chronic is one of the problems that mankind has faced for a long time. Over the past half century, with the discovery of antibiotics, human ability to manage wounds has improved much more than before, but antibiotic resistance has become a serious problem in recent decades, especially for chronic wounds, and therefore different therapeutic approaches are needed. Larval therapy is an old method that requires molecular cellular research and recognition and confirmation of its function can lead to the development of new drugs. In this study, the larvae of Lucilia sericata were first prepared and extracted, and then the extract was affected on fibroblast cells and molecular cellular studies were performed. The results indicate that TNF-α gene expression was 8 times higher in the control sample. The expression of SMAD-2 gene was 6 times higher in the control sample than in the control sample. TGF-β gene expression in the treated sample was 4 times that of the control sample. Given the additive effect on fibroblast growth and molecular confirmation of the above genes, it is suggested that this extract has the potential to heal wounds.

Received: 2019/10/11
Accepted: 2019/12/08

Keywords: TNF-α, Wound healing, Larvae therapy.