ترمیم زخم پوستی موش با استفاده از عصاره ماگوت *lucilia sericata*

طاهره سنجری، مجید مومنی مقدم*، جعفر وطن دوست و تکتم حجار

سبزوار،دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۳

چکیده

زخم یکی از مشکلات کلینیکی بوده و می تواند به صورت حاد و یا مزمن وجود داشته باشد. به علت اهمیت زخم مدیریت و درمان آن از اولویتهای پزشکی محسوب می شود. هر محصول و فرآیندی که بتواند مدت زمان ترمیم زخم را به حداقل برساند می تواند به حل مشکلات بیماران کمک نماید. امروزه نگاه جدید به پزشکی سنتی و همچنین محصولات زیستی در تقابل با داروهای سنتتیک در این مورد به وجود آمده است. در این مطالعه اثر عصاره ماگوت *Lucilia sericata* بر روی ترمیم زخم بررسی شد. برای این منظور از لاروها عصاره گیری شد و این عصاره مورد ارزیابی توسط تست MTT قرار گرفت. اثر عصاره روی رشد سلولها همچنین بر روی مهاجرت سلولی در *in vitro* و در نهایت به صورت *in vivo* در ترمیم زخم ایجاد شده در پوست موش مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مشخص کرد که بهترین دوره زمانی تیمار با عصاره ۲۴ ساعت بوده و منجر به القای تکثیر سلولها می شود اما زمان ۴۸ ساعت اثر تکثیر رو به کاهش داشته و در ۷۲ ساعت می تواند بازدارنده باشد، نتیجه مطالعات در ۲۴ ساعت اول به IC_{50} منجر نشد اما در ۴۸ ساعت مقدار IC_{50} برابر با ۲۸/۷ میکروگرم بر میلی لیتر ارزیابی شد و در ۷۲ ساعت مقدار IC_{50} برابر با ۲۳/۴۵ گرم بر میلی لیتر به دست آمد. همچنین این نتایج در مهاجرت سلولها نیز مشاهده گردید و غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر این عصاره اثر مطلوبی در تکثیر و مهاجرت سلولها داشته است. نتایج آزمایش ترمیم زخم موش هم مشخص کرد که این عصاره با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث تسریع درمان زخم می شود. با توجه به اثر مثبت عصاره در بازه زمانی ۲۴ ساعت بر روی ترمیم زخم پوستی ، رشد سلولها و همچنین سختی به کار گیری لارو زنده بر روی زخم بیماران از لحاظ فیزیکی و همچنین روانی، ادامه پژوهشهای تکمیلی ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: ترمیم، ماگوت درمانی، لارودرمانی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۱۶۰۰۵۳ ، پست الکترونیکی: m.momeni@hsu.ac.ir

مقدمه

زخم و راهکار های درمانی آن یکی از مسائل عمده درمانی و اقتصادی در دنیای پزشکی امروز است. اختلال در بهبود زخم از آن جهت که منجر به میزان قابل توجهی از مرگ و میر جهانی شده، سهم عظیمی از تحقیقات زیست پزشکی را به خود اختصاص داده است. با افزایش رو به رشد زخمهای دیابتی، بیماریهای وریدی، سوانح و ... نیاز به درمان سریع زخم به طور پیوسته در حال افزایش است. کمی مطالعات از مکانیسمهای سلولی، مولکولی و مکانیسمهای فیزیولوژیک ترمیم زخم اغلب باعث نتایج ناامید کننده از روشهای درمانی فعلی می شود. با توجه به آمار بالای این عارضه، یافتن راهی برای بهبود سریع زخم از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۹ و ۲۸).

پدیده ترمیم زخم را می توان به مراحل مختلفی طبقه بندی کرد که این مراحل باید به ترتیب و در یک زمان مشخص رخ دهد و هر مرحله در یک مدت زمان خاص با شدت مطلوب ادامه پیدا کند، در غیر این صورت زخم به سمت مزمن شدن پیش خواهد رفت (۱۲). پدیده ترمیم زخم خود یک فرآیند بسیار پیچیده است که نیازمند همکاری

بافتهای گوناگون، رده‌های سلولی مختلف، مولکولهای ماتریکس خارج سلولی (Extracellular Matrix) و مولکولهای میانجی محلول است (۶ و ۹). در هر مرحله سلولهای جدیدی در محل زخم به کار گرفته می شود، و یا سلولهایی که از قبل وجود داشته اند فعالیتشان برای ترشح سایتوکاین های جدید تغییر می کند و زمانی که دیگر مورد نیاز نیستند سلولها تحت آپوپتوز قرار می گیرند و یا توسط سلولهای دیگر مانند ماکروفاژها بلعیده می شوند(۱۰). بر این اساس ترمیم زخم متشکل از چهار مرحله اساسی شامل: هموستاز (Hemostasis)، التهاب (Inflammation)، تکثیر(Proliferation) و بازسازی (Remodeling) است (۴، ۵، ۶ و ۷).

درمان زخمهای مزمن به علت طولانی بودن روند درمان نیازمند هزینه های درمانی عظیمی بوده و بیماران مبتلا به این زخمها مشکلات درمانی زیادی را در زندگی شخصی خود متحمل می شوند (۵). در حالی که پیشرفتهای تکنولوژی منجر به توسعه قابل توجهی در مراقبتهای پزشکی ازجمله مراقبت از زخم دست پیدا کرده است، اما زخمهای مزمن هنوز به عنوان یک مشکل اساسی در مدیریت زخم باقی مانده است (۲۰).درمان زخمهای مزمن به طور کلی زمان بر و اغلب نیز ناموفق است، درمان این گونه از زخمها مشکل است چون آنها معمولاً به شکل زخمهای غیر قابل علاج با بافت فیبروتیک، بافت نکروتیک مرده و دارای عفونتهای متعدد هستند (۲۶).

ناامید شدن از پیشرفت درمان زخمهای مزمن باعث شد بسیار از پزشکان و محققان نگاهی به گذشته تاریخ پزشکی بیاندازند و تکنولوژیهای اولیه را با ابزار های پیشرفته و دانش قرن ۲۱ بررسی کنند. یکی از این تکنولوژیهای دوباره آزمایش شده لارو درمانی (larval therapy) است (۲۰).

امروزه لارو درمانی به عنوان یک روش درمانی مؤثر، ایمن و مقرون به صرفه شناخته شده است (۱۶ . ۲۱). لارو درمانی همچنین به عناوین ماگوت تراپی (Maggot therapy)، بیودبریدمان (Bio debridement) یا ماگوت دبریدمان تراپی (Maggot debridement therapy)(MDT) نیز شناخته می شود. در لارو درمانی از لارو زنده مگس برای رسیدن به دبریدمان، ضدعفونی و در نهایت تسریع بهبود زخم استفاده می شود (۲۶). این روش اغلب زمانی استفاده می شود که درمانهای پزشکی و جراحی در توقف تخریب بافت و ترمیم زخم دچار شکست شوند (۲۲). همچنین مطالعات زیادی اثرات ضد باکتریایی این لاروها را نیز اثبات کرده است (۷)

لاروهایی که اغلب برای لارو درمانی استفاده می شود لاروهای مگس سبز آبی هستند که برای تواناییشان در تغذیه بافتهای مرده بدون آسیب به بافت زنده انتخاب شده‌اند (۱۵). لارو رایجی که به طور معمول استفاده می‌شود لارو مگس بطری سبز *Lucilia sericata* است. که متعلق به خانواده مگسهای لاشه (*Calliphoridae*)، و راسته دو بالان (*Diptera*)می باشد. (۱۷).

در این پژوهش اثر عصاره کامل لارو در درمان زخمهای پوستی موش و سلولهای فیبروبلاستی موش 3T3 مورد بررسی قرار گرفته است و سرعت بسته شدن زخم در موش، فعالیتهای تکثیر و میزان مهاجرت سلولی، در حضور و عدم حضور عصاره، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

عصاره ماگوت: لاروهای استریل مگس *Lucilia sericata* تازه تفریخ شده تهیه شد (دکتر عباس میراب زاده)، سپس به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استریل در انکوباتور دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در این مدت لاروها با گوشت خام گوساله تغذیه شدند. پس از این مدت لاروهای سن ۳ جمع آوری گردید. به منظور جداسازی مواد خارجی از بدن لاروها تعداد ۱۶۰ لارو یک دور با ۱۱۰ میلی لیتر آب مقطر اتوکلاو شده شستشو داده شدند و

سپس با دور g ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی کاملاً خارج شد و لاروها در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از منجمد شدن، به منظور استخراج عصاره، لاروها از فریزر خارج شده و با میله شیشه ای استریل هموژنیزه شدند. ۱۲۰ میلی لیتر PBS به عصاره لاروها اضافه شد و با دور g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. پس از انتقال به هود بیولوژیک کلاس دو، محلول به دست آمده ابتدا از فیلتر μ ۴۵/. و سپس از فیلتر μ ۲۲/. عبور داده شد. غلظت عصاره استریل به دست آمده توسط روش بردفورد مشخص و سپس عصاره جهت آزمایشات بعدی در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی گراد ذخیره شد.

کشت سلول: برای بررسی مطالعات *in vitro* رده سلولی فیبروبلاستی 3T3 انتخاب شدند(پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه فردوسی)، این سلولها در فلاسک T_{25} و با استفاده از محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی سرم ۱۰FBS درصد (Gibco) و آنتی بیوتیک پنیسیلین استرپتومایسین (Sigma) به مدت لازم در انکوباتور انکوباتور CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و هر دو روز پاساژ داده شدند تا سلول از نظر کیفی و کمی به حد مطلوب آزمایشات برسد.

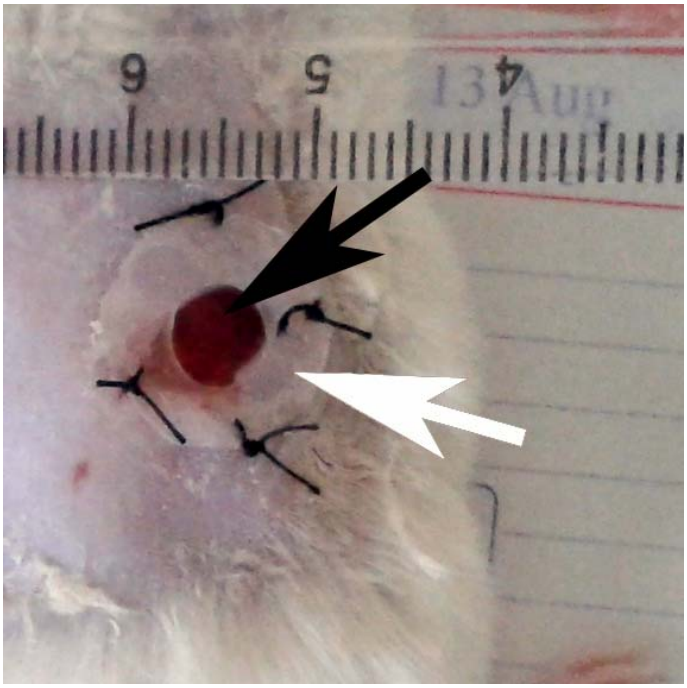
تست MTT: MTT به طور گسترده برای اندازه گیری فعالیتهای متابولیکی سلولها استفاده می شود. اساس این روش بر قابلیت سلولهای زنده در تبدیل نمک زرد MTT قابل حل در آب به کریستالهای بنفش غیر قابل حل در آب فورمازان است (۲۷). برای انجام این تست از سه پلیت ۹۶ خانه برای سنجش در سه روز متوالی استفاده شد. در چاهکهای اطراف پلیتهای ۹۶ خانه برای جلوگیری از تبخیر، ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده ریخته شد. سلولهای 3T3 با تراکم ۵۰۰۰ سلول به حجم ۲۰۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک قرار گرفتند. سلولها در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت که سلولها به کف چاهکها متصل شدند محیط قبلی خارج و غلظتهای ۳/۵، ۷، ۱۲/۵، ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره و برای هر غلظت ۴ تکرار به داخل هر چاهک اضافه گردید. برای هر گروه از غلظتها، گروه کنترل به صورت جداگانه در نظر گرفته شد که به جای عصاره همان میزان PBS در محیط کشت اضافه شد. در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اضافه کردن عصاره به سلولها، طبق دستورالعمل کیت، محیط کشت رویی خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول RPMI 1640 (Gibco) به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر MTT به هر چاهک اضافه گردید. پلیت به مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از تشکیل کریستالهای فورمازان، محیط قبلی خارج گردیده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (Sigma) اضافه شد با سمپلر چندین بار پیپت شد تا کریستالهای فورمازان حاصل حل گردد. پلیتها به مدت ۱۰ دقیقه در داخل انکوباتور قرار داده شدند و سپس جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر خوانده شد.

بررسی رشد و مهاجرت سلولی: برای بررسی مهاجرت و تکثیر سلولی از پتری دیشهای ۳۵ میلی متری مخصوص کشت و مهاجرت سلولی(ibidi,Germany) استفاده شد. این پتری دیشها حاوی یک قطعه سیلیکونی هستند که توسط یک تیغه میانی به ضخامت ۵۰۰ میکرومتر به دو قسمت مجزا تقسیم شده است که مانع از رشد سلولها در قسمت میانی می شود. برای انجام این تست، سلولهای 3T3 با تراکم ۳۵۰۰۰ سلول و به حجم ۷۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک قرار گرفت و سپس در داخل انکوباتور در داخل انکوباتور با شرایط ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت که سلولها به کف متصل شدند، قطعه سیلیکونی با استفاده از پنس استریل برداشته شده و سلولها با غلظتهای ۳/۵، ۱۲/۵ و ۱۷/۵میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره لارو تیمار شدند،

یک پتری دیش نیز به عنوان گروه کنترل بدون عصاره در نظر گرفته شد. حجم نهایی هر پتریدیش به ۲ میلی لیتر رسانده شد به گونه ای که روی تمام سطوح سلولی پوشانده شود. در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار از سلولها با استفاده از میکروسکوپ معکوس(Leica) و دوربین دیجیتال (canon) عکس تهیه شد.

مدل حیوانی: در این پژوهش از ۲۱ سر موشهای سوری نر بالغ با وزن ۱۰±۲۷ گرم که از موسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد تهیه شده بود، استفاده گردید. در تمام مدت زمان استفاده از این حیوانات، آنها در حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه حکیم سبزواری نگهداری شدند و به صورت انفرادی در قفس و تحت شرایط نگهداری حرارت ۲۴ درجه سانتی گراد و چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعت قرار گرفتند. تغذیه موشها با پلت آماده (جوانه خراسان)، به صورت هر روز ۵ گرم برای هر موش انجام گرفت.

برای بیهوشی از مواد بیهوش کننده کتامین و زایلازین (Sigma) و به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. بعد از بیهوشی، موهای سطح پشتی موش توسط ماشین اصلاح برداشته شد. سپس با استفاده از کرم موبر سطح پوست جهت ایجاد زخم آماده شد. بعد از مدت زمان ۲ دقیقه پوست توسط پنبه الکلی پاک و سطح پوست با الکل ضد عفونی شد. در شرایط استریل با استفاده از پانچ، دو زخم به قطر ۵ میلی متر در پشت هر موش ایجاد گردید. برای شبیه سازی زخم پوست موش به زخم انسان از حلقه سیلیکونی در اطراف زخم استفاده شد که انقباض پوست اطراف زخم موش با این مدل به حداقل می رسد (۲). در این مطالعه از حلقه هایی به قطر خارجی ۱ سانتیمتر و قطر داخلی ۶ میلی متر استفاده شد. بعد از ایجاد زخم بر روی پوست موش، و در حالت بیهوشی، حلقه سیلیکونی ابتدا توسط چسب فوری در زخم طرف راست ثابت شده و سپس توسط نخ بخیه ۴ صفر ، بر روی پوست موش بخیه زده شد (شکل ۱).



شکل ۱- زخم ایجاد شده بر روی پوست موش: ابتدا موش بیهوش شد و پس از از بین بردن موهای پشت موش توسط پانچ زخمی با قطر ۵ میلی متر در همه موشهای کنترل و تیمار به وجود آمد.خود زخم با فلش تیره بالایی نمایش داده شده و حلقه سلیکونی بخیه زده شده بر روی پوست موش که با فلش سفید پایینی نمایش داده شده است، قطر زخم ۵ میلی مترو قطر بیرونی حلقه ۱۰ میلی متر است.

سپس این موشها به صورت تصادفی به ۳ گروه ۷تایی تقسیم شدند. گروه کنترل که فقط ژل لوبریکانت دریافت کردند. گروه تیمار که غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره همراه با ژل لوبریکانت را دریافت می کردند. گروه تیمار که غلظت ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره همراه با ژل لوبریکانت را دریافت می کردند.

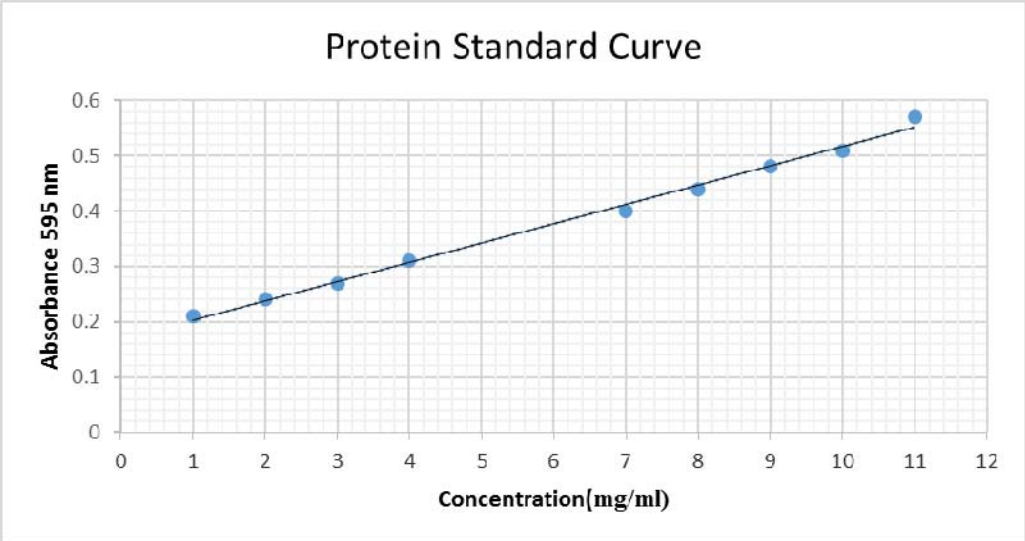
ارزیابی آماری: بعد از جراحی از محل زخم عکس برداری و به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. در طول دوره درمان که ۷ روز بعد از جراحی بود، هر روز با دوربین از زخم و خط کشی عمود به زخم به عنوان مقیاس ، عکس گرفته شد. عکسها به نرم افزار Digimizer منتقل شدند و با استفاده از این نرم افزار مساحت زخم در روز های مختلف بر حسب میلی متر مربع به دست آمد. درصد بهبودی زخم از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بسته شدن زخم در روزهای i ام} = \frac{\text{مساحت زخم در روز i ام} - \text{مساحت زخم در ابتدای ایجاد زخم}}{\text{مساحت زخم در ابتدای ایجاد زخم}} \times 100$$

برای بررسی روند ترمیم زخم در طول دوره درمان، درصد بهبودی زخم گروههای مختلف، بر اساس آزمون یک طرفه ANOVA و آزمون توکی نرم افزار آماری SPSS 21 با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

استخراج عصاره و غلظت سنجی: به منظور سنجش غلظت پروتئین موجود در عصاره از تست برادفورد استفاده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی به دست آمده از پروتئین استاندارد BSA (شکل ۲) به صورت زیر محاسبه شد. عصاره جذب ۱/۵ را در ۵۹۵ نانومتر نشان داد که با توجه به غلظت پروتئین استاندارد دارای غلظت ۰/۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

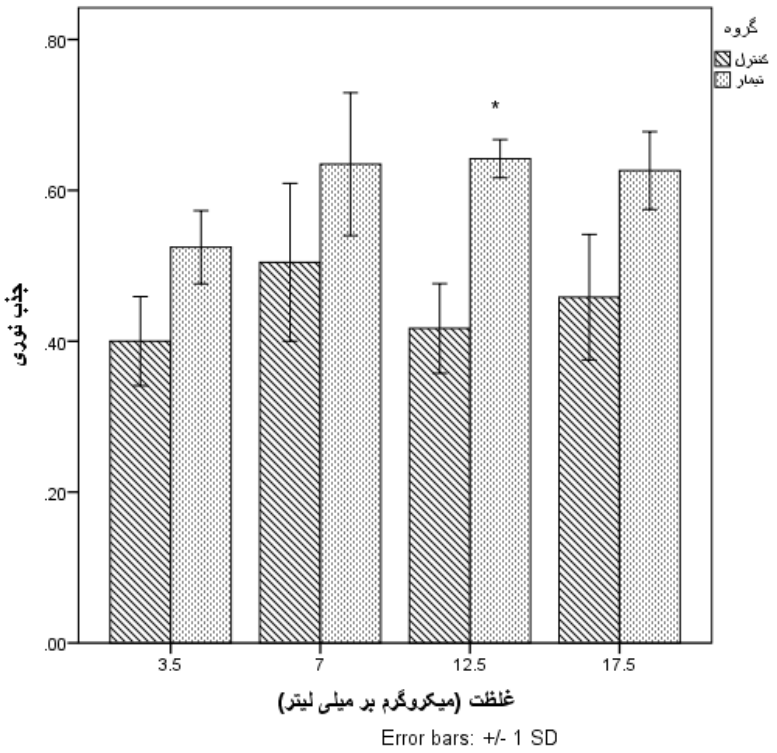


شکل ۲- منحنی استاندارد پروتئین BSA به روش برادفورد

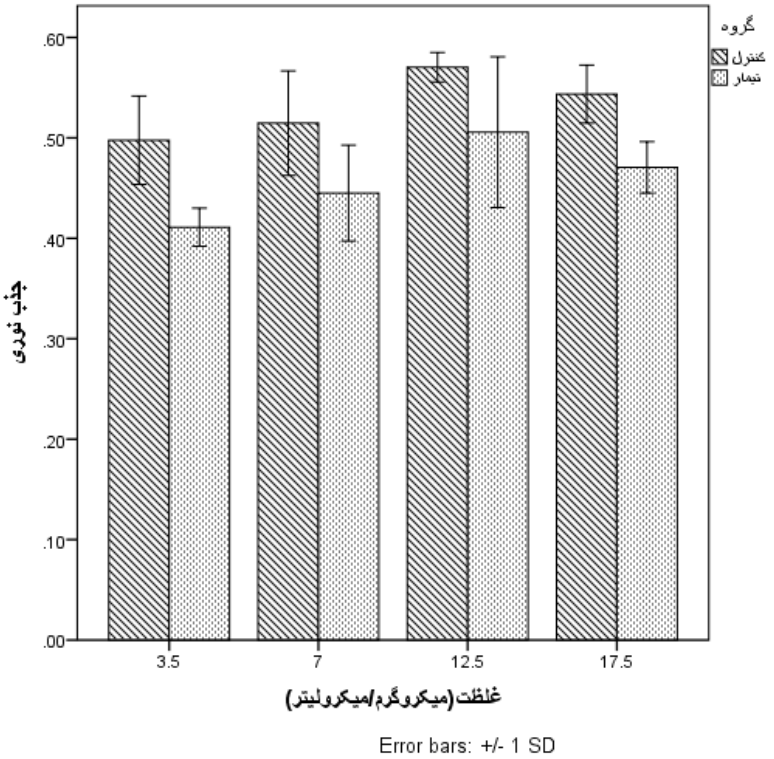
آزمون سمیت سنجی MTT: شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الایزا ریدر در پلیتهای ۹۶ خانه مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد سلولهای زنده در چاهکها با جذب نوری سوسپانسیون سلولی در ارتباط است. در ابتدا غلظتهای صفر الی ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت پیش تست بررسی شد که در ۲۴ ساعت اول به IC_{50} منجر نشد اما در ۴۸ ساعت مقدار IC_{50} برابر با ۲۸/۷ میکروگرم بر میلی لیتر ارزیابی شد و در ۷۲ ساعت مقدار IC_{50} برابر با ۲۳/۴۵ گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

نتایج MTT نشان داد که درصد تکثیر سلولها در۲۴ ساعت اول نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است و در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره نتایج نسبت به گروه کنترل معنی دار ($P<0.05$) است و در سایر غلظتها و با گذشتن زمان میزان سلولهای زنده کاهش می یابد (شکل های ۳، ۴ و ۵).

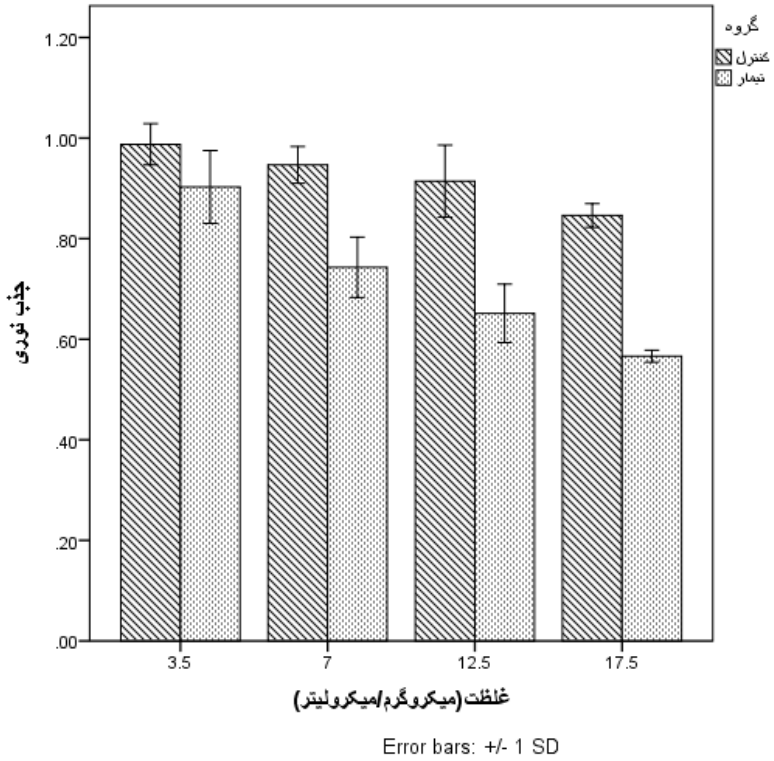
بررسی میکروسکوپی مورفولوژی سلولها: مورفولوژی سلولها قبل و بعد از تیمار و همچنین در غلظتهای مختلف توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. سلولها در غلظتهای کمتر از ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره مورفولوژی سلولهای فیبروبلاستی را حفظ کرده و به حالت دوکی شکل ظاهر شدند اما پس از تیمار با غلظتهای بالاتر از این مقدار و پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلولها دارای سیتوپلاسم به شدت گرانوله و چند هسته ای در مقایسه با گروه کنترل بودند و تمایل به تمایز را نشان می دادند (شکل ۶).



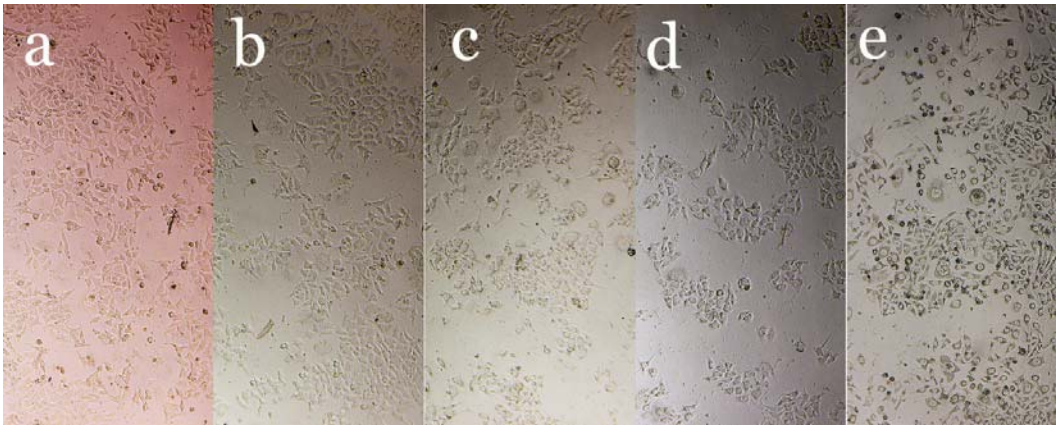
شکل ۳- میزان تکثیر سلولهای 3T3 تیمار داده شده با عصاره کامل لارو طی ۲۴ ساعت



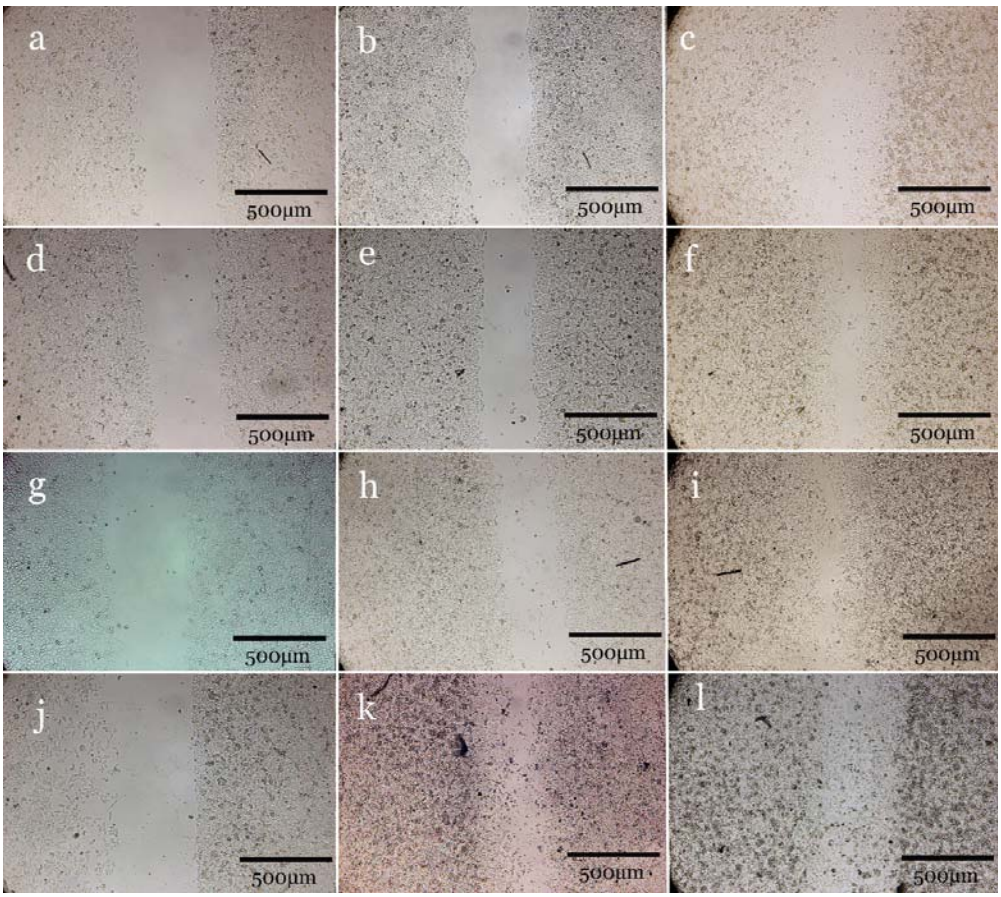
شکل ۴- میزان تکثیر سلولهای 3T3 تیمار داده شده با عصاره کامل لارو طی ۴۸ ساعت



شکل ۵- میزان تکثیر سلولهای 3T3 تیمار داده شده با عصاره کامل لارو طی ۷۲ساعت



شکل ۶- تغییرات مورفولوژی سلولهای تیمار شده با عصاره بعد از ۲۴ ساعت. a) سلولهای کنترل b) سلولهای تیمار شده با غلظت ۳/۵ µg/ml. c) سلولهای تیمار شده با غلظت ۷ µg/ml. d) سلولهای تیمار شده با غلظت ۱۲/۵µg/ml. e) سلولهای تیمار شده با غلظت ۱۷/۵µg/ml. (بزرگنمایی ۱۰X)

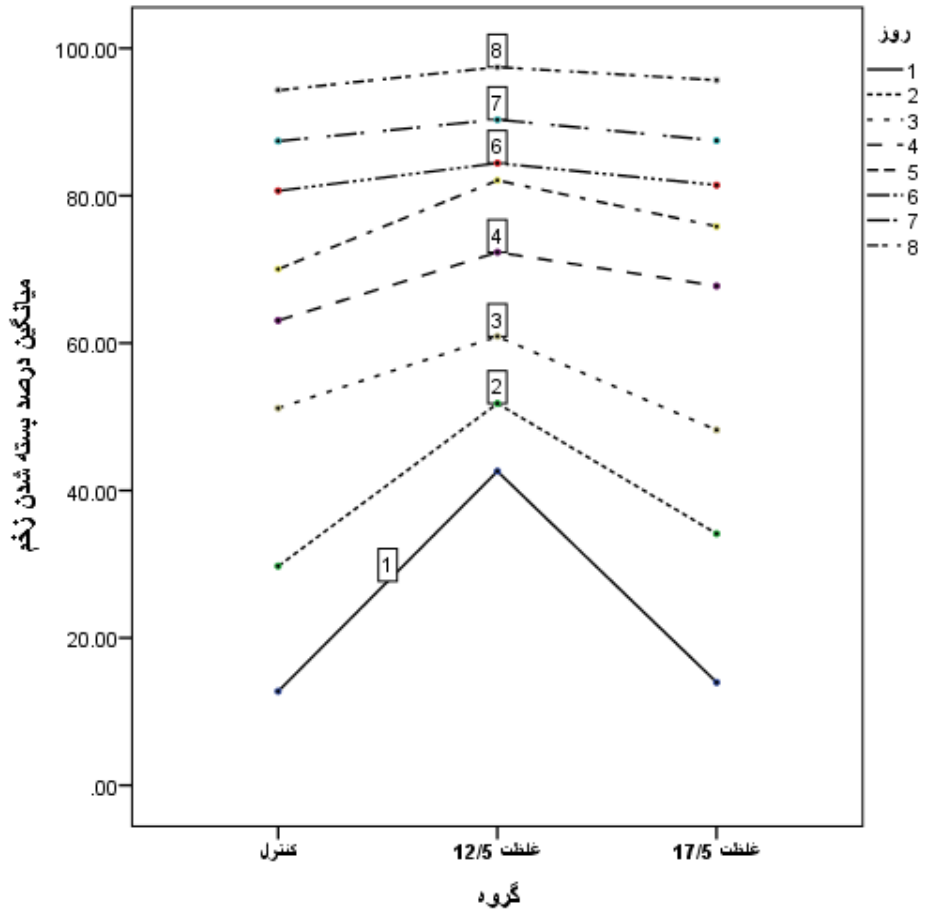


شکل۷ - مهاجرت سلولهای فیبروبلاستی در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار با غلظتهای مختلف عصاره.بزرگ نمایی۱۰X. شکلها به ترتیب:a نمونه کنترل روز صفر، b نمونه کنترل روز اول،c نمونه کنترل روز دوم، dنمونه باتیمار ۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز صفر،e نمونه باتیمار۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز اول، f نمونه باتیمار۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز دوم، gنمونه باتیمار۱۲/۵میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز صفر،h نمونه با تیمار ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز اول، i نمونه با تیمار ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز دوم، j نمونه باتیمار۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز صفر، k نمونه با تیمار۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز اول، l نمونه باتیمار۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره روز دوم

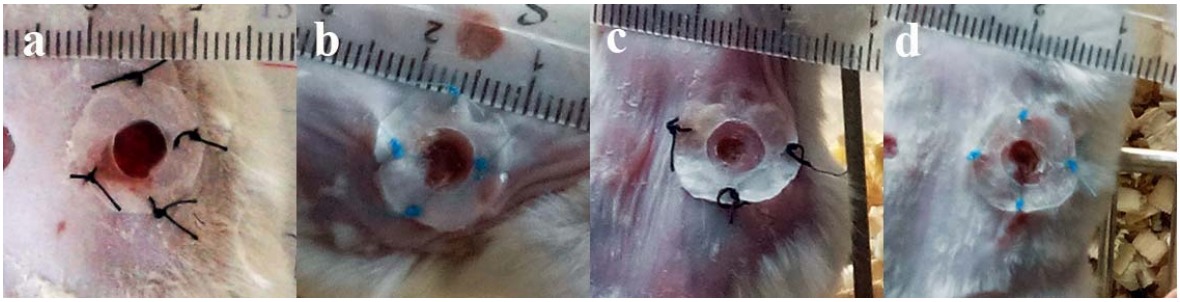
نتایج حاصل از بررسی مهاجرت سلولی: فضای خالی بین سلولها توسط نرم افزار Digimizer اندازه گیری و بررسی شد. نتایج حاصل از مهاجرت سلولها پس از تیمار نشان داد که در ۲۴ ساعت اول مهاجرت درصد بسته شدن خراش در گروه ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل ولی تفاوت معنی داری بین سایر گروهها مشاهده نشد (شکل ۷).

اما هر چند درصد بسته شدن خراش در گروه ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت بیشتر از سایر گروهها است اما این اختلاف معنی دار نبود ($p>0.05$).

نتایج حاصل از ترمیم زخم موش: آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون توکی متعاقب آن نشان دادند که در دو روز اول میانگین درصد بسته شدن زخم گروه با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر ($n=6$) به طور معنی داری بیشتر از دو گروه کنترل و گروه با غلظت ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر است ($P<0.05$) و میانگین درصد بسته شدن زخم دو گروه کنترل و گروه با غلظت ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تفاوت معنی داری ندارند($P>0.05$). در سایر روزها تفاوت معنی داری بین گروهها مشاهده نشد (شکلهای ۸ و ۹).



شکل ۸- درصد بسته شدن زخم در موش طی ۷ روز، در این آزمایش میزان ترمیم زخم به نسبت سطح اولیه محاسبه شده و به صورت درصد ترمیم یا بسته شدن زخم گزارش گردید، همان طور که مشخص است در روزهای ابتدایی با غلظت ۱۲/۵ زخم به میزان بیشتری ترمیم می شود.



شکل ۹- ترمیم زخم در ۴۸ ساعت پس از دریافت عصاره ماگوت، با استفاده از پانچ یک زخم پوستی به اندازه ۵ میلی متر ایجاد گردید و توسط حلقه سیلیکونی اطراف زخم مهار گردید سپس هر روز عصاره با غلظت مشخص به زخم اضافه شد و پس از ۴۸ ساعت عکس محل زخم تهیه گردید a) نمونه کنترل در ساعت اول جراحی b) نمونه کنترل پس از ۴۸ ساعت بدون دریافت عصاره c) نمونه تیمار دریافت کننده ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت d) نمونه تیمار دریافت کننده ۱۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره ماگوت

بحث

از ابتدای قرن نوزدهم و با پیشرفت پزشکی مدرن گرچه تمرکز اصلی مطالعات ترمیم زخم در پزشکی نوین بر روی استفاده از داروهای شیمیایی بوده است اما مطالعات دهه اخیر یک گرایش به استفاده از مواد بیولوژیک از جمله عصاره های گیاهی و جانوری را نمایان می سازد(۳ و ۱۱). در استفاده از یک عصاره و یا ماده بیولوژیک ممکن است ایجاد سمیت و یا آپوپتوز مورد نظر باشد(۱) ، همچنین با پیشرفتهای اخیر در مورد سلولهای بنیادی گاهی از عصاره های زیستی جهت ایجاد تمایز نیز استفاده می شود(۲) ، در این میان مطالعات بسیاری نیز در مورد اثر این عصاره ها برروی فاز های مختلف ترمیم زخم انجام شده است.(۲۴) ماگوتها امروزه در درمان زخمهای مزمن به خصوص زخمهای دیابت به طور ویژه ای مورد توجه قرار گرفته اند. (۸)

در این مطالعه اثر عصاره کامل ماگوت *Lucilia sericata* بر روی رشد سلولهای فیبروبلاستی و همچنین ترمیم زخم پوستی موش بررسی شد. لاروها به علت داشتن هوک و قطعات دهانی ویژه می توانند دبریدمان و برداشت بافت مرده و نکروز را در داخل زخم انجام دهند، اما همین مسئله می تواند گاهی برای بیمار بسیار دردناک باشد (۲۳) به همین دلیل جایگزین کردن لارو سالم با عصاره لارو می تواند در صورت داشتن بخشی از ویژگیهای لارو راهکار مناسبی باشد، همچنین به دلایل روانی حضور لارو زنده در درون زخم برای بیماران خوشایند نخواهد بود، لذا استفاده از عصاره لارو می تواند پاسخگوی درمانی بهتری در نظر گرفته شود.

در گام اول تأثیر عصاره لارو *Lucilia sericata* بر روی سلامت سلول در کشت سلولی مورد توجه قرار گرفت، این بررسی از دو طریق کیفی یعنی بررسی مورفولوژی سلول و همچنین کمی از طریق انجام تست MTT انجام پذیرفت. با توجه به مطالعه انجام شده مشخص شد که با گذشت دو روز پس از اضافه کردن عصاره (غلظتهای بالاتر از7 میکروگرم بر میلی لیتر) به محیط کشت مورفولوژی سلولی شروع به تغییر می کند اما در روز اول تنها تراکم بالای سلولی جلب توجه می کند، بررسی تست MTT مشخص کرد که سلولها در روز اول نسبت به گروه کنترل رشد بالاتری داشته که در روزهای دوم و سوم رو به کاهش دارد، با توجه به اینکه عصاره به طور قابل توجهی در ۲۴ ساعت اول باعث رشد و تکثیر سلولی می شود اما در ۴۸ و ۷۲ ساعت به مرور ادامه این مسیر در *In vitro* رشد سلولی را کاهش می دهد که با توجه به تغییر مورفولوژی و شکل سلولها و امکان ارتباط این موضوع با توانایی تمایزی این عصاره نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه احساس می شود. همچنین در غلظت بالاتر از ۱۲/۵

میکروگرم بر میلی لیتر عصاره می تواند سمیت ایجاد کرده و باعث مرگ سلولهای کشت شده گردد. بنابراین همانند هر ماده دیگر می توان مرز مشخصی در استفاده از عصاره ماگوت تعریف کرد مرزی که معنای آن بهبود و یا مرگ سلولی خواهد بود که موارد اشاره شده در سال ۲۰۱۵ توسط Li و همکاران در بخشی از مطالعاتشان بر روی موش صحرایی انجام شده و نتایج مشابهی دارد، این تیم متوجه اثربخشی عصاره از طریق تأثیر بر مسیر سیگنالی TGF-beta/Smad3 و STAT3 شدند و این مسیر را به عنوان مهم ترین مسیر سیگنالی تحت تأثیر عصاره ماگوت می دانند و معتقدند لزوم هماهنگی صحیح اجزا این مسیر در ترمیم بسیار مهم است (۲۹).

با توجه به رفتار این عصاره در محیط آزمایشگاه، آزمایشات حیوانی جهت بررسی بیشتر مورد توجه قرار گرفت. از نظر رفتاری و حال عمومی تفاوتی بین موشهای دریافت کننده تیمار نسبت به گروه کنترل دیده نشد که می تواند حاکی از عدم تحریک رفتاری باشد بنابراین استفاده از عصاره به نسبت استفاده از لارو زنده در صورت پاسخگویی به ترمیم در زمان مناسب بسیار بهتر خواهد بود. همچنین در مدل *in vivo* مطالعه مشخص می کند که غلظت بهینه در این آزمایش ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد و در غلظتهای پایین تر و بالاتر مورد آزمایش ترمیم زخم به این میزان گزارش نمی شود که خود می تواند با توجه به نتایج کشت سلول و بررسی مهاجرت دلیلی بر ارتباط غلظت دارویی این عصاره باشد و بنابراین در آزمایشات تکمیلی در نظر گرفتن مرز ظریف غلظت دارویی و غلظت سمی بایستی در نظر گرفته شود.

کارهای انجام شده بر روی اثر ES (Excretion Secretion) عصاره لارو روی سلولهای فیبروبلاستی نشان داده است که ES نقش مهمی را در فرآیندهایی همچون تکثیر سلول و بازسازی بافت ایفاء می کند. Horobin و همکارانش نشان دادند که در یک محیط سه بعدی حاوی فیبرونکتین و کلاژن به عنوان سوبسترا، ترشحات لارو به طور مشخص مهاجرت فیبروبلاستهای انسان را در ماتریکس تحریک می کند و مورفولوژی سلولها را تغییر می دهد. ES لارو حاوی پروتئینازهایی است که در بازسازی اجزای ماتریکس خارج سلولی درگیرند و موجب تخریب فیبرین و آزاد شدن عوامل مؤثر در تکثیر می شوند. بنابراین یکی از مکانیسمهایی که از طریق آن لاروها تشکیل بافت را در زخم افزایش می دهد از طریق افزایش تحرک فیبروبلاستها، تسریع بازسازی ماتریکس خارج سلولی و تنظیم پاسخ سلولی است (۱۳ و ۱۴).

Smith و همکارانش نیز با اثر دادنES لارو بر روی سلولهای فیبروبلاستی نشان دادند که ES چسبندگی فیبروبلاستها را به کلاژن کاهش داده و موجب مهاجرت سلولهای فیبروبلاستی نیز می گردد. در این مطالعه انجام شده، مشاهده شد که ES لارو اگرچه موجب افزایش تحرک سلولی می شود اما هیچ گونه اثر میتوژنیک قابل توجهی بر روی سلولهای فیبروبلاستی ندارد و این نتیجه متناقض با یافته های قبلی را به استفاده از محیط فاقد سرم نسبت داد (۲۵).

در سال ۲۰۱۵، Pinilla و همکارانش با تأیید مطالعات قبلی، نشان دادند که ES تکثیر و مهاجرت سلولهای فیبروبلاستی را در یک محیط فاقد سرم افزایش می دهد و موجب تغییرات مورفولوژی در سلولها می گردد. Pinilla پروتئینهای ES را در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت غیر فعال کرده و آن را به سلولهای فیبروبلاستی اثر داد و مشاهده کرد که ES اثر قابل توجهی بر روی رشد، اندازه فیبروبلاستها یا کاهش چسبندگی سلولها به سوبسترا ندارد. بنابراین آنزیم های پروتئولیتیک نقش مهمی را در این رویدادها دارند (۱۸). تحقیق پیش رو این آزمایشات را تأیید می کند. نتایج این تحقیق اثر افزایشی عصاره کامل لارو را بر روی تکثیر سلولهای فیبروبلاستی و هم تسریع بهبود زخم در موش را نشان می دهد.

نتیجه گیری نهایی: بر اساس یافته های بحث شده علاوه بر لارو زنده که توانایی ترمیم زخمهای مزمن را داراست، عصاره لارو هم می تواند بر ترمیم زخم مؤثر باشد این مورد در غلظت مشخصی صورت می گیرد و در مقادیر کمتر و یا بیشتر اثر بخشی آن متفاوت خواهد بود، رشد سلولهای فیبروبلاستی خود به طور مستقیم در ترمیم زخم مؤثر است که در این مقاله به آن پرداخته شد اما سلولهای فیبروبلاستی تنها بخش کوچکی از روند ترمیم زخم هستند بنابراین جهت آشکار شدن حقایق علمی این موضوع آزمایشات تکمیلی در سطوح ایمنی و فیزیولوژی و سلولی مولکولی به شدت مورد نیاز است.

تقدیر و تشکر

نویسنگان مایلند بدین وسیله از جناب آقای دکتر عباس میراب زاده به دلیل فراهم نمودن لارو استریل و جناب آقای دکتر علیرضا قدسی به جهت مشاوره محاسبات آماری و سرکار خانم دکتر ناهید ارغیانی به دلیل مشاوره علمی تشکر نمایند، همچنین لازم به اشاره است که گرنت تحقیقاتی این پروژه توسط مرحوم بانو طاهره تیموری شبان تأمین شد روحش شاد و یادش گرامی.

منابع

۱- عطاری، فرنوش. سپهری، حوری. اژدری، سهیلا. گلیایی، بهرام.دلفی، لادن (۱۳۸۸). القای آپوپتوز و نکروز به وسیله اسید پکتیک، مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران)

۲- مریم مهرابی، سامان حسینخانی ، سیروس جلیلی و علی مصطفایی (۱۳۹۴) تمایز سلولهای بنیادی پوست انسان به سلولهای سازنده انسولین در محیط برون تن با استفاده از گلوکز و عصاره پانکراس ترمیمی، مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران)

3- Adiele LC, Adiele RC, Enye JC. (2014) Wound healing effect of methanolic leaf extract of Napoleona vogelii (Family: Lecythidaceae) in rats. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 7(8):620-4.

4- Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. (2012) Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 26(7):812-20.

5- Bohova J, Majtan J, Takac P .(2012) Immunomodulatory properties of medicinal maggots Lucilia sericata in wound healing process. *TANG International Journal of Genuine Traditional Medicine*. 2(3):1-7.

6- Cooper L, Johnson C, Burslem F, Martin P. (2004) Wound healing and inflammation genes revealed by array analysis of'macrophageless' PU. 1 null mice. *Genome biology*. 6(1):R5.

7- Daeschlein G, Mumcuoglu KY, Assadian O, Hoffmeister B, Kramer A. (2007) In vitro antibacterial activity of Lucilia sericata maggot secretions. *Skin pharmacology and physiology*. 20(2):112-5.

8- Doerler M, Reich-Schupke S, Altmeyer P, Stucker M. (2012) Impact on wound healing and efficacy of various leg ulcer debridement techniques. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = *Journal of the German Society of Dermatology* : JDDG. 10(9):624-32.

9- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. (2007) RETRACTED: Gene therapy and wound healing. *Clinics in dermatology*. 25(1):79-92.

10- Flanagan M. (2009) The physiology of wound healing. *Journal of wound care*. 9(6):299-30.٠

11- George BP, Parimelazhagan T, Kumar YT , Sajeesh T. (2015) Antitumor and Wound Healing Properties of Rubus ellipticus Smith. *Journal of acupuncture and meridian studies*. 8(3):134-41.

12- Guo S, DiPietro LA. (2010) Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*.89(3):219-29.

13- Horobin AJ. (2005) Maggots and wound healing: the effects of Lucilia sericata larval secretions upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix proteins: University of *Nottingham*.

14- Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. (2006) 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.* 126(6):1410-8.

15- Horobin A, Shakesheff K, Woodrow S, Pritchard D. (2003) Maggots and wound healing: the effects of Lucilia sericata larval secretions upon human dermal fibroblasts. *European Cells and Materials.* 6(2):3.

16- Mumcuoglu KY. (2001) Clinical applications for maggots in wound care. *American journal of clinical dermatology.* 2(4):219-27.

17- Nigam Y, Dudley E, Bexfield A, Elizabeth Bond A, Evans J, James J. (2010) The physiology of wound healing by the medicinal maggot, Lucilia sericata. *Advances in insect physiology*. 39:39.

18- Pinilla YT, Patarroyo MA, Velandia ML, Segura NA, Bello FJ. (2015) The effects of Sarconesiopsis magellanica larvae (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions on fibroblasts. *Acta tropica*. 142:26-33.

19- Schreml S, Szeimies R-M, Prantl L, Landthaler M, Babilas P.(2010) Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 63(5):866-81.

20- Sherman RA. (2009) Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. *Journal of diabetes science and technology.* 3(2):336-44.

21- Sherman RA. (2014) Mechanisms of Maggot-Induced Wound Healing: What Do We Know, and Where Do We Go from Here? Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

22- Sherman RA, Mumcuoglu KY, Grassberger M, Tantawi TI. Maggot therapy. Biotherapy-History, Principles and Practice: Springer; 2 .۰۱۳ p. 5-29.

23- Sherman RA. (2014) Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? Evidence-based complementary and alternative medicine : *eCAM*. 592419.

24- Shi GB, Wang B, Wu Q, Wang TC, Wang CL, Sun XH, et al. (2014) Evaluation of the wound-healing activity and anti-inflammatory activity of aqueous extracts from Acorus calamus L. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 27(1):91-5.

25- Smith AG ,Powis RA, Pritchard DI, Britland ST. (2006) Greenbottle (Lucilia sericata) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. Biotechnology progress. 22(6):1690-6.

26- Sun X, Jiang K, Chen J, Wu L, Lu H, Wang A, et al. (2014) A systematic review of maggot debridement therapy for chronically infected wounds and ulcers. *International Journal of Infectious Diseases.* 25:32-7.

27- van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer Cell Culture: Springer; 201 .۱p. 237-45.

28- Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC.(2010) Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *BioMed Research International*.

29- Li PN, Li H, Zhong LX, Sun Y, Yu LJ, Wu ML, Zhang LL, Kong QY, Wang SY, Lv DC.(2015) Molecular events underlying maggot extract promoted rat in vivo and human in vitro skin wound healing.Wound Repair Regeneration. 23(1):65-73

Mouse skin wound Healing using *Lucilia sericata* maggot extract

Sanjari T., Momeni-Moghaddam M., Vatandoost J. and Hajjar T.

Biology Dept., Faculty of sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

Abstract

Wounds are one of the clinical problems and can be seen in the form of acute or chronic, due to its importance wound care management and medical treatment is a priority. All the products and processes that can minimize healing time can help to solve the problems of patients. Now a day new look to traditional medicine and biological products as opposed to synthetic drugs has emerged in this case. In this study the effect of *Lucilia sericata* maggot extract on wound healing were studied, for the purpose the extract was evaluated by MTT assay to assess its *in vitro* effect on cell growth and its effect on cell migration and *in vivo* effects in created mouse skin wound healing were also evaluated. The study shown that IC_{50} was not detected for 24 hours but for 48 and 72 hours were 28.7 and 23.45 microgram per milliliter respectively. Results showed that best healing can take place during first 24 hours using 12.5 microgram per milliliter, resulting in the induction of cell proliferation and cell migration but during 48 hours this effect get decreased and in 72 hours resulted to cell growth inhibition. And the results of animal modeling also showed that the 12.5 microgram per milliliter extract promotes mice wound healing. According to the results of this study and the positive effect of the extract within 24 hours on skin wound healing and also cell growth and because of some physical as well as psychotherapists hardness in live larva administration on the wounds of patients, it is suggested study get expand and experimental level then be studied on human wounds.

Key words: Healing, maggot therapy, Larva therapy