

بررسی اثر هم‌زمان ویتامین D و عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina*) بر بیان $VEGF-A$ و $1TGF\beta$ در سلول های فیبرو بلاست انسانی

زهرا شکيبا

کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر هم‌زمان ویتامین D و عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina*) بر بیان ژن‌های $VEGF-A$ و $TGF\beta 1$ در سلول‌های فیبروبلاست انسانی انجام شد. عصاره گیاه با روش خیساندن هیدروالکلی استخراج گردید و سمیت سلولی با آزمون MTT ارزیابی شد. نتایج نشان داد غلظت‌های بالای عصاره (۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و ویتامین D پس از ۷۲ ساعت، بقای سلولی را به‌طور معناداری کاهش می‌دهند. همچنین، تیمار هم‌زمان این دو عامل موجب کاهش مهاجرت سلولی و تغییرات مورفولوژیک نظیر کروی شدن سلول‌ها شد. بررسی بیان ژن با Real-time PCR افزایش معنادار بیان $VEGF-A$ و $TGF\beta 1$ را در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه شاهد نشان داد. این یافته‌ها حاکی از نقش احتمالی ترکیبات مؤثر گیاه نسترن کوهی و ویتامین D در تنظیم ژن‌های کلیدی مرتبط با ترمیم زخم و فیبروز است. مطالعه حاضر زمینه را برای توسعه درمان‌های ترکیبی مبتنی بر گیاهان دارویی و مکمل‌های ویتامینی در مدیریت اسکار و بهبود زخم فراهم می‌کند.

کلیدواژه‌ها: ویتامین D، عصاره نسترن کوهی، $VEGF-A$ ، $TGF\beta 1$ ، فیبروبلاست انسانی.

مقدمه

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیلیه داروهای بیخطر برای انسان تلقی میشوند، در این زمینه ایران یکی از غنی ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار میرود. از جمله این گیاهان دارویی، نسترن کوهی با نام علمی *Rosa canina* از خانواده ی گل سرخیان (*Rosaceae*) می باشد. گل رز (*Rosa canina*) به طور گسترده در کشورهایمانند لهستان، فنلاند، آلمان، رومانی و سوئد و کشورهای آسیایی از جمله کشور خودمان ایران مصرف می شود و منبع مهمی از غذا، دارو و درمان های طبیعی است. علاوه بر این، به دلیل غنی بودن از ویتامین C، پودر گل رز *Rosa canina* با موفقیت به عنوان یک مکمل سلامت مورد استفاده قرار می گیرد. ویتامین C به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی که دارد از سیستم ایمنی محافظت می کند و به مبارزه با عفونت ها کمک می کند.

تخمین زده می شود که هر سال بیش از ۱۰۰ میلیون بیمار دچار اسکارهای جدید می شوند (۱) که منجر به نگرانی های زیبایی شناختی فزاینده می شود. می توان شواهد قوی مبنی بر کاهش شدید کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به اسکارهای هیپرتروفیک و کلئوید پیداکرد. بیماران احساس اضطراب و خودآگاهی با اسکارهای جزئی صورت را گزارش می کنند که اهمیت درمان های مؤثر برای مدیریت اسکار را برجسته می کند (۲). جای زخم نه تنها برای بیماران و سازمان های بهداشتی بار مالی دارد، بلکه برای بسیاری از بیماران، زخم ها می توانند عوارض روانی سنگینی داشته باشند.

مبانی نظری

سلول های فیبروبلاست

فیبروبلاست، فراوانترین سلول در بافت همبند است که همه انواع رشته های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه ای را سنتز می کند. فیبروبلاست، سلولی است با هسته بیضوی و روشن و دارای کروماتین ظریف است که حاوی یک یا دو هسته واضح می باشد. اندامک های دخیل در پروتئین سازی در فیبروبلاست به طور گسترده دیده می شوند. فیبروبلاست ها بسته به محل استقرار و میزان فعالیت، به اشکال مختلفی دیده شوند (۱۳).

ساختار و عملکرد فیبروبلاست ها

فیبروبلاست ها دارای سیتوپلاسمی منشعب می باشد که یک هسته بیضی شکل لکه دار دارای ۱-۲ هسته را احاطه نموده است. فیبروبلاست های فعال بواسطه شبکه آندوپلاسمی خشن گسترده خود شناخته می شوند. فیبروبلاست های غیرفعال که فیبروسیت نیز نامیده می شوند کوچکتر و دوکی شکل می باشند. شبکه آندوپلاسمی خشن آن ها گستردگی کمی دارد. اگرچه فیبروبلاست ها در یک سطح بزرگ به صورت پراکنده و جدا از هم قرار می گیرند ولی در صورت تراکم زیاد آرایشی به شکل خوشه های موازی به خود می گیرند (۱۷).

نقش سیگنال دهی خانواده TGF- β

در طی ترمیم بافت، فیبروبلاست ها ترشح می کنند و به صورت مکانیکی مقادیر زیادی ECM جدید را تغییر می دهند. برای انجام این عملکردها، فیبروبلاست ها باید از حالت استراحت، زمانی که تولید ECM حداقل است، به حالت میوفیبروبلاست انقباضی، زمانی که سنتز ماتریز را تنظیم می کنند و دستگاه انقباضی را فعال می کنند، تبدیل شوند.

فیبروبلاست های اختصاصی بافت

علیرغم خواص مشابه، عملکردها و دودمان های فیبروبلاست خاص بافت برای نیازهای رشدی، هموستاتیک و ترمیم بافت های خاص وجود دارد. این فیبروبلاست های بافتی خاص در طول رشد جنینی پدید می آیند، زیرا دودمان های سلولی متعدد با هم همگرا می شوند و فیبروبلاست هایی را تشکیل می دهند که اندام هایی را که از هر سه لایه زایای جسمی ایجاد می شوند، مانند پوست و غدد پستانی مشتق شده از اکتودرم، عضله اسکلتی یا قلب مشتق شده از مزودرم، و ریه مشتق از اندودرم تشکیل می دهند (۲۴).

گیاه شناسی *Rosa canina*

جنس *Rosa* (از خانواده *Rosaceae*) شامل ۲۰۰ گونه و ۲۰۰۰۰ رقم گسترده است که در برخی از نقاط جهان به ویژه در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری نیمکره شمالی پراکنده شده است. پدیده‌های بیولوژیکی در زیست‌شناسی تولیدمثلی، ویژگی‌های مورفولوژیکی و تشریحی ناکافی برای تمایز بین گونه‌ها و تأثیرات انسانی توسط پرورش *Rosa* آن را به یک جنس بسیار متنوع تبدیل کرده است. به طور معمول به چهار زیرجنس (*Hulthemia Focke*, *Platyrhodon Rehder*, *Hesperhodos* و *Cockerell* و *Rosa*) تقسیم می‌شود. زیرجنس *Rosa* بیش از ۹۵ درصد از همه گونه‌ها را تشکیل می‌دهد و به ده بخش تقسیم می‌شود (۲۹).

ترکیب شیمیایی *R. canina*

مشخصات فیتوشیمیایی و پتانسیل بیولوژیکی *R. canina* به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. میوه‌های روزا کانینا (RCFs) منبع ارزشمندی از مواد مغذی گیاهی، قندها، اسیدهای آلی، پکتین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، کاروتنوئیدها (β -کاروتن، لیکوپن، و ایزومرهای روبیگزانتین)، ویتامین‌ها (به ویژه اسید اسکوربیک و همچنین ویتامین B1، B2، K، D و E) و اسیدهای چرب (لینولئیک، اولئیک، لینولنیک، پالمیتیک، استئاریک و اسید آراشیدونیک)، عناصر ماکرو و میکرو هستند (۳۱).

کاربرد فارماکولوژی *R. canina*

فعالیت آنتی اکسیدانی

R. canina سرشار از ویتامین‌ها (به ویژه ویتامین C) و ترکیبات فنلی است. بنابراین خواص مفید آن است تا مربوط به ترکیبات فنلی و میزان بالای ویتامین C است. علاوه بر این، اسید اسکوربیک، به عنوان اصلی‌ترین آنتی اکسیدان محلول در آب در بدن، دارای خواص ضد سرطان و سایر خواص بیولوژیکی است. علاوه بر این، اسید اسکوربیک عملکرد تنظیمی قابل توجهی در سراسر بدن دارد زیرا در سنتز هورمون‌ها، عوامل آزاد کننده هورمون و انتقال دهنده‌های عصبی نقش دارد (۳۵). میزان این ترکیبات و خواص آنتی اکسیدانی این گیاه به موقعیت جغرافیایی، مرحله رشد، شرایط آب و هوایی، زمان برداشت و روش‌های نگهداری و استخراج آن بستگی دارد (۳۶).

پیشینه تحقیق

Ramirez و همکاران (۲۰۱۰) مهار ویتامین D اثرات پیش فیبروتیک فاکتور رشد تبدیل کننده $\beta 1$ در فیبروبلاست‌های ریه و سلول‌های اپیتلیال بررسی کردند. ابتدا حضور گیرنده‌های ویتامین D را در NIH/3T3 کشت شده و فیبروبلاست‌های ریه تأیید شد. فیبروبلاست‌های ترانسفکت شده با ساختار گزارشگر عنصر پاسخ ویتامین D و در معرض متابولیت فعال ویتامین D، $1,25(OH)2D3$ ، افزایش فعالیت پرموتر را نشان دادند که نشان دهنده عملکرد گیرنده‌های ویتامین D در این سلول‌ها است. با آزمایش اثرات $1,25(OH)2D3$ روی فیبروبلاست‌های درمان شده با فاکتور رشد تبدیل کننده $\beta 1$ ($TGF\beta 1$) که عامل بسیاری از اختلالات فیبروتیک در نظر گرفته می‌شود، مشاهده شد که $1,25(OH)2D3$ تکثیر فیبروبلاست ناشی از $TGF\beta 1$ را در یک دوز مهار می‌کند. مد وابسته $1,25(OH)2D3$ همچنین تحریک $TGF\beta 1$ بیان و پلیمریزاسیون اکتین عضله صاف α را مهار کرد و از تنظیم مثبت فیبرونکتین و کلاژن در فیبروبلاست‌های تیمار شده با $TGF\beta 1$ جلوگیری کرد. در نهایت، بررسی شد که چگونه $1,25(OH)2D3$ بر تحول اپیتلیال-مزانشیمی سلول‌های اپیتلیال ریه پس از قرار گرفتن در معرض $TGF\beta 1$ تأثیر می‌گذارد. نشان داده شد که تنظیم دخیل نشانگرهای سلولی مزانشیمی ناشی از $TGF\beta 1$ و بیان غیر طبیعی نشانگرهای سلول اپیتلیال توسط $1,25(OH)2D3$ کم‌رنگ شد. این مشاهدات نشان می‌دهد که تحت تحریک $TGF\beta 1$ ، $1,25(OH)2D3$ فنوتیپ پروفیبروتیک فیبروبلاست‌های ریه و سلول‌های اپیتلیال را مهار می‌کند (۴۹).

Mazzara و همکاران (۲۰۲۳) مایکروویو هیدرودیفیوژن و استخراج گرانشی ویتامین C و ترکیبات آنتی اکسیدانی از گل سرخ (*Rosa canina* L) بررسی کردند. هدف این کار استفاده و بهینه سازی برای اولین بار استخراج هیدرودیفیوژن و گرانش

مایکروویو (MHG) گل رز، به عنوان یک کاربرد جدید از استخراج مایکروویو بدون حلال بود که قبلاً به روشی مشابه فقط بر روی توت، توت فرنگی و توت فرنگی انجام شده بود. پیاز بهینه سازی از طریق یک طرح مرکب مرکزی (CCD) با ارزیابی اثر پارامترهای تجربی بر عملکرد انجام شد. محتوای پلی فنول تام، فلاونوئید و آنتوسیانین؛ فعالیت پاکسازی رادیکال؛ و محتوای ویتامین C در عصاره های به دست آمد. در نتیجه، پیش تصفیه آب به وضوح نشان داده شد که نقشی محوری در کیفیت عصاره گل رز دارد. در میان پاسخ های ارزیابی شده، عملکرد، محتوای آنتوسیانین و فعالیت آنتی اکسیدانی به خوبی توسط مدل آماری توصیف شد. قابل ذکر است، عصاره MHG بهینه شده با عصاره های به دست آمده با استخراج با حلال معمولی مقایسه شد که مقادیر بالاتری از ویتامین C، پلی فنول ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها را نشان می داد، در حالی که عصاره های سنتی از نظر بازده عملکرد بهتری داشتند. در نتیجه، MHG یک جایگزین امیدوارکننده برای روش های استخراج استاندارد برای به دست آوردن عصاره گل رز غنی از ویتامین C و ترکیبات آنتی اکسیدانی است (۵۲).

Outaki و همکاران (۲۰۲۴) عصاره آبی *Rosa Canina*: خصوصیات شیمیایی و سنتز سبز نانوذرات نقره و مس بررسی کردند. در این پژوهش، نانوذرات نقره و مس را از دانه های گیاه دارویی مراکشی *Rosa canina* سنتز شد و خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی آن ها را در برابر سه سویه باکتری در غلظت های مختلف اندازه گیری شد. بر اساس مطالعات TEM، زتاسایزر، UV و FTIR، نانوذرات به دست آمده به شکل کروی و اندازه ۵۰ نانومتر هستند. با توجه به نتایج، غلظت بیشتر نانوذرات نقره (۱۰ میلی مولار) اثر ضد باکتریایی قابل توجهی را نشان داد. در واقع، یک اثر ضد میکروبی قوی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی گزارش شده است. بعد از نانوذرات مس، فعالیت نانوذرات نقره همتر از یا بیشتر از آنتی بیوتیک های معمولی بود. این نتایج نشان می دهد که سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی *Rosa canina* می تواند به عنوان یک مهارکننده رشد مؤثر میکروارگانیسم های مختلف مورد استفاده قرار گیرد، و آنها را برای دستگاه های پزشکی متنوع و سیستم های کنترل ضد میکروبی قابل استفاده می کند (۵۳).

روش اجرای تحقیق

عصاره گیری از گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina*)

برای استخراج عصاره هیدروالکلی از گیاه *Rosa canina* ابتدا بافت مورد نظر گیاه (میوه) را جدا و تمیزشسته شد و بعد از خشک کردن گیاه در سایه توسط آسیاب پودر شد. سپس مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک را در ۱۰۰ میلی لیتر هیدروالکل (۷۰ میلی لیتر الکل و ۳۰ میلی لیتر آب مقطر) خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق روی شیکر نگهداری شد. پس از طی شدن زمان مورد نظر، عصاره را صاف شد. با توجه به نوع کاربرد، عصاره مورد نظر را می توان هم به صورت مایع و یا پودر مورد استفاده قرارداد. بدین منظور از دستگاه روتاری برای تغلیض و از دستگاه انکوباتور برای خشک کردن عصاره هیدروالکلی استفاده شد (۵۷).



شکل ۱- خشک کردن گیاه نسترن کوهی



شکل ۲- عصاره گیری از گیاه نسترن کوهی



شکل ۳- دستگاه روتاری

کشت سلول های فیبروبلاست

در این مطالعه از رده سلولی فیبروبلاست که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵٪ گاز CO_2 کشت داده شدند. جهت انجام آزمایشات وانکوباسیون سلول ها بامواد موردنظر پس از رشد وازدیاد سلول ها، سلول های چسبنده به کمک تریپسین ۰.۲۵٪ از کف فلاسک جدا شدند و پس از شمارش به میزان ۵۰۰۰ سلول به چاهک های پلیت ۹۶ حفره ای منتقل شدند. در تمامی موارد

برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته و کلیه آزمایشات دو یا سه بار تکرار شدند. از آنجائی که برخی از سلول‌ها فوق چسبنده بوده و جهت ارزیابی باید در شرایط طبیعی رشد قرارداشته باشند، تمامی آزمایشات بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در چاهک‌های پلیت کشت سلول (چسبیدن کامل سلول به پلیت) انجام گرفت. بعد از گذشت ۱۸ ساعت به منظور چسبیدن کامل سلول به سطح پلیت، غلظت‌های مختلف عصاره (صفر به عنوان شاهد، و غلظت‌های مد نظر از عصاره ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۲۰ میکرو گرم در میلی لیتر) به سلول‌ها اضافه شدند و پلیت‌ها در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد.



شکل ۴- کشت سلول‌های فیبروبلاست در فلاسک

آزمون سمیت شناسی MTT

جهت تهیه محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر، ۵ میلی گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی لیتر از PBS ۱۵ درصد حل شد. هنگام استفاده در رنگ آمیزی ۱۰ برابر با PBS رقیق شد و محلول ۵ میلی گرم در میلی لیتر MTT به دست آمد. لازم به ذکر است که پس از تهیه PBS محلول اتوکلاو شد. پس از انکوباسیون سلول‌های فیبروبلاست انسانی با غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و پلیت‌هایی که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 دانکوبه شد. با محلول MTT، ۵ میلی گرم در میلی لیتر رنگ آمیزی شد. پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع رویی برداشته شد و ۲۰۰ میکرو لیتر محلول ایزوپروپانول به حفره‌های مربوطه اضافه و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و در نهایت جذب در طول موج ۵۷۰ توسط دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت شد.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = (1 - (\text{OD of the test sample}) / (\text{OD of the control})) \times 100$$



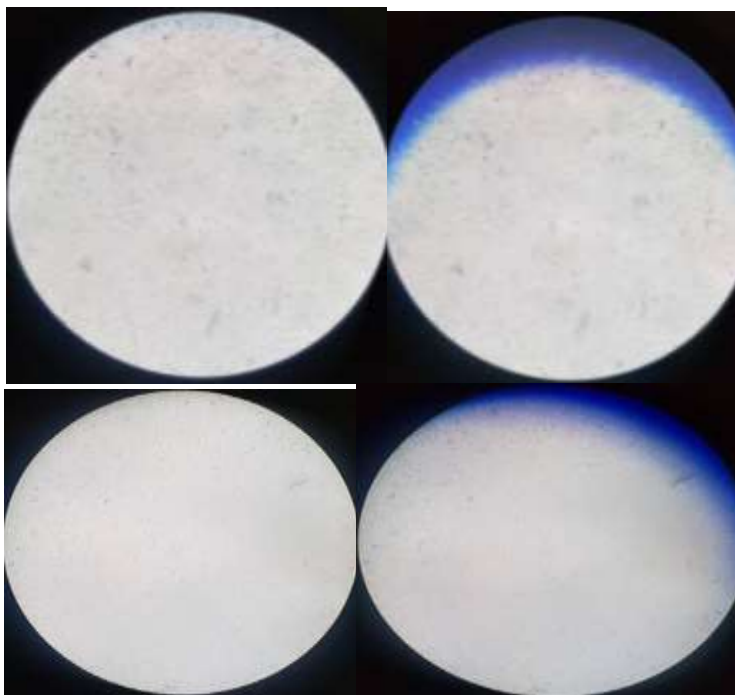
شکل ۵- آزمون سمیت شناسی MTT

سنجش مهاجرت سلول های فیبروبلاست

مهاجرت سلول های فیبرو بلاست پس از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت تیمار با عصاره هیدرو الکلی (*Rosa canina*) و Vitamin D نسبت به سلول های شاهد بررسی شد. داده ها باید نشان دهند که مهاجرت سلول های فیبروبلاست تیمار شده با عصاره هیدرو الکلی (*Rosa canina*) و Vitamin D در ۲۴ ساعت ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول های تیمار نشده بهبود یافته یا تغییری نکرده است (۵۸).

مطالعات ریخت شناسی

تغییرات مورفولوژیکی مطابق با تکثیر سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری معمولی مشاهده شد. سلول ها به مدت ۹۶ ساعت با عصاره هیدرو الکلی (*Rosa canina*) و Vitamin D تیمار شدند. از سلول های تیمار نشده برای کنترل منفی استفاده شد. تغییرات مورفولوژیکی سلول ها در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از درمان مشاهده شد (۵۹).



شکل ۶- بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول ها

استخراج RNA

جهت بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت ها در همه گروه های مورد بررسی، انجام گرفت. ابتدا به سلول ها ۱ میکرو مول ترانیرول اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس ۲۰۰-۳۰۰ میکرومول فنل و کلروفرم اضافه و دوباره به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه محلول با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد. قسمت بالایی لوله شفاف که حاوی RNA می باشد را به آرامی برداشته در یک میکروتیوب قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میکرومول ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. وقتی این دو محلول باهم مخلوط شد. محلول کدری به دست آمد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه قرار گرفت تا رسوب کند. پس از افزودن ایزوپروپانول نمونه ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی را تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ درصد اضافه شد.

مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۵ میکرومول آب مقطر ۵۵ درجه بر روی رسوب ریخته شد. بررسی درجه خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (نانودراپ) در این روش با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه ی زیر می توان درجه خلوص نمونه ی RNA بررسی گردید.

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \epsilon \times d/1000$$

C: غلظت

A₂₆₀: جذب نوری در طول موج 260 نانومتر

ε: ضریب خاموشی مولی برای RNA برابر 40 و برای DNA برابر 50

d: ضریب رقت

مقدار ناخالصی ناشی از حضور پروتئین یا DNA در محلول RNA را می توان با محاسبه ی نسبت A₂₆₀/280 به دست آورد. در نمونه خالص RNA این نسبت برابر ۰/۱۵ ± ۲ و در نمونه خالص DNA برابر ۰/۱۵ ± ۸/۱ می باشد. اگر نسبت محاسبه شده کمتر از میزان استاندارد باشد، نشان دهنده ی آلودگی بیشتر با پروتئین است.

ساخت cDNA

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده USA (Fermentas)، انجام شد و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمر های طراحی شده مربوط به تمامی ژن ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن ها با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد.

فرآیند ریل تایم (Real-Time PCR)

در Real-Time PCR تاثیر عصاره هیدرو الکلی گیاه نسترن کوهی *Rosa canina* و Vitamin D بر بیان ژن های *TGFβ1* و *VEGF* بررسی شد.

جدول ۱- مواد مورد نیاز Real-Time PCR

مواد افزوده شده	بر حسب (میکرومول)
SYBR Green Master mix	5 μL
پرایمر Forward	0.5 μL
پرایمر Reverse	0.5 μL
cDNA	1 μL
DDW	3 μL

جدول ۲- چرخه حرارتی Real-Time PCR

زمان	حرارت	مرحله	تعداد چرخه
۲۰ ثانیه	۹۴°C	واسرشت سازی اولیه	۱
۲۰ ثانیه	۹۴°C	واسرشت سازی	۳۵
۳۰ ثانیه	۵۸-۶۰°C	اتصال پرایمر	۳۵
۳۰ ثانیه	۷۲°C	تکثیر	۳۵
۳۰ ثانیه	۷۲°C	تکثیر نهایی	۱

جدول ۳- پرایمر

<i>TGFβ1</i>	Forward	CAACGAAATCTATGACAAGTTCAA
	Reverse	GAATTGTTGCTGTATTTCTGGTAC
<i>VEGF</i>	Forward	CTGCTCTACCTCCACCAT
	Reverse	ATGAACTTCACCACTTCGT
<i>GAP3DH</i>	Forward	CAACAGATACAAGAACGTGAAG
	Reverse	CATAAATATAGGGGATGGGCTT

بررسی بیان ژن

نسبت بیان ژن های مورد بررسی در این مطالعه با روش مقایسه ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) با استفاده از قرار دادن داده ها در فرمول زیر ارزیابی شد.

$$CT = (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}) \times \text{Time} - (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}) \times \text{Time} \times \Delta\Delta R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم شد. میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

تمامی نتایج بدست آمده در این پژوهش بر اساس حداقل سه تکرار انجام شد که با میانگین و محاسبات انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار prism با استفاده از تست های آماری t-test و One-Way با سطح معنی دار $p < 0.05$ انجام شد.

سوالات پژوهش

- ۱- آیا عصاره هیدرو الکلی گیاه نسترن کوهی *Rosa canina* و Vitamin D بر بیان ژن های *TGFβ1* و *VEGF* اثر دارد؟
- ۲- آیا افزایش بیان ژن های *TGFβ1* و *VEGF* در ترمیم زخم در فیبرو بلاست ها مؤثر است؟
- ۳- آیا می توان از عصاره این گیاه *Rosa canina* دارو تهیه کرد؟

فرضیات پژوهش

فرض بر این است که عصاره هیدرو الکلی گیاه نسترن کوهی *Rosa canina* و Vitamin D همزمان در بیان ژن های *TGFβ1* و *VEGF* اثر دارد و بیان ژن *TGFβ1* و *VEGF* باعث بهبود و التیام زخم ها به صورت بهینه و در مدت زمان کمتر و با هزینه کمتر می شود.

تجزیه و تحلیل یافته های پژوهش

آزمون سمیت شناسی MTT

جدول ۴- شاخص LC₅₀ عصاره هیدرو الکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بر زنده ماندن سلول های فیبروبلاست انسانی

زمان (ساعت)	عصاره (μg/ml)	ویتامین D (μg/ml)
۲۴	۹۶۹/۹ ± ۰/۴۳	۹۴۷/۳ ± ۰/۳۸
۴۸	۹۱۲/۰۷ ± ۰/۴۶	۸۷۸/۱۷ ± ۰/۳۵
۷۲	۸۷۶/۸ ± ۰/۳۷	۸۳۴/۶ ± ۰/۴۵

جهت بررسی اثر کشندگی عصاره هیدرو الکلی گیاه نسترن کوهی با غلظت های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ویتامین D با غلظت های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر سلول های فیبروبلاست انسانی

پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از روش MTT استفاده شد. اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی با غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ویتامین D با غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی پس از ۲۴ نشان می‌دهد، غلظت‌های ۱۲ و ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D اختلاف معناداری با گروه شاهد نداشت. اما غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بقایای سلول‌های فیبروبلاست انسانی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش داد. بنابراین شاخص LC50 عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی به ترتیب ۹۶۹/۹ و ۹۴۷/۳ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد (جدول ۴).

اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی با غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ویتامین D با غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی پس از ۴۸ نشان می‌دهد، غلظت‌های ۱۲ و ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D اختلاف معناداری با گروه شاهد نداشت. اما غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بقایای سلول‌های فیبروبلاست انسانی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش داد. بنابراین شاخص LC50 عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بر روی بقایای سلول‌های فیبروبلاست انسانی به ترتیب ۹۱۲/۰۷ و ۸۷۸/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد (جدول ۴).

همچنین اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی با غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ویتامین D با غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی پس از ۷۲ نشان می‌دهد، غلظت ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D اختلاف معناداری با گروه شاهد نداشت. اما غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بقایای سلول‌های فیبروبلاست انسانی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش داد. ولی غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بیشترین تاثیر را بر روی بقایای سلول‌های فیبروبلاست انسانی نشان داد و منجر به کاهش معنادار سلول‌ها نسبت به گروه شاهد گردید. بنابراین شاخص LC50 عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D بر روی بقایای سلول‌های فیبروبلاست انسانی به ترتیب ۸۷۶/۸ و ۸۳۴/۶ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد (جدول ۴). بنابراین طبق نتایج می‌توان گفت که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D و زمان ۷۲ ساعت بیشتر تاثیر بر کشندگی سلول‌های فیبروبلاست نشان داد، پس تاثیر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D وابسته به دوز و زمان است.

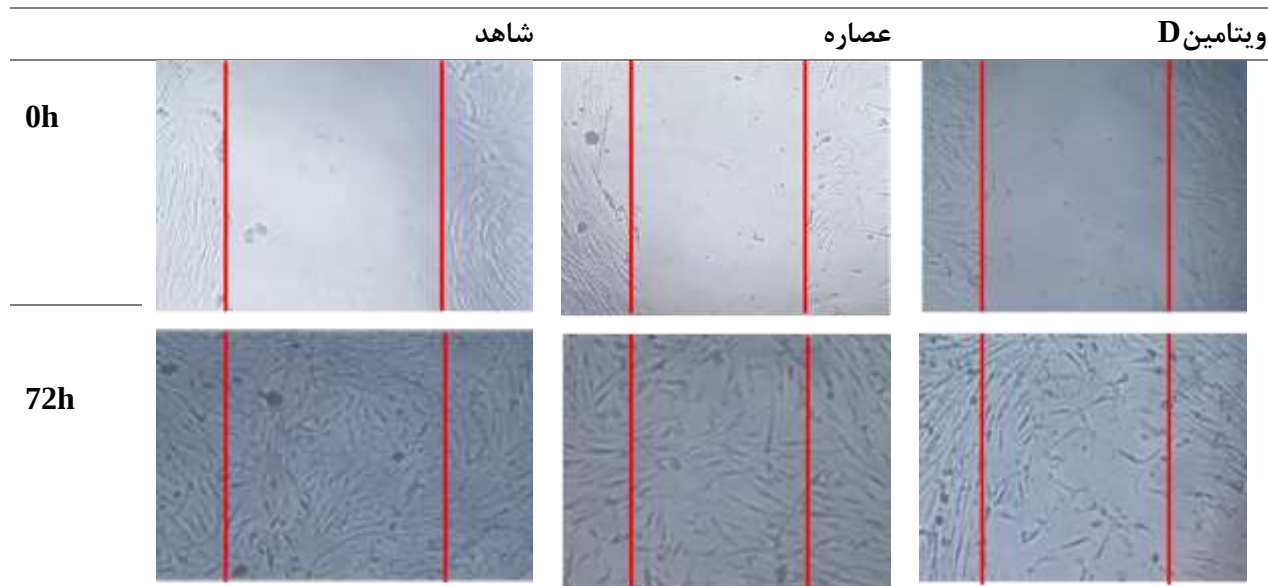
مطالعات ریخت شناسی

تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تحت تاثیر تیمار عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D نسبت به شاهد بیشتر است. سلول‌های تحت تاثیر تیمار عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D به شدت آسیب دیده‌اند و تغییر شکل آنها و ضایعات سلولی به طور واضح دیده می‌شوند. اما سلول‌های تحت تاثیر تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی نسبت به ویتامین D تغییرات مورفولوژیکی بیشتری داشتند. همچنین مورفولوژی سلول‌ها به شکل کروی متمایز شده، تراکم و انقباض هسته و سیتوپلاسم و تاولی شدن غشا که می‌تواند از علایم مرگ باشد، دیده می‌شود.

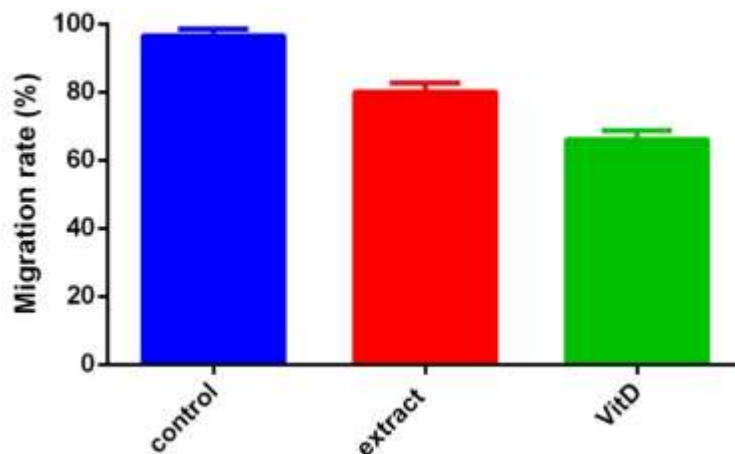
سنجش مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست

شکل ۷ مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست در گروه شاهد، تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در ساعت اولیه (صفر) سلول‌های شاهد شروع به مهاجرت کرده‌اند. اما پس از ۷۲ ساعت سلول‌های شاهد مهاجرت سریع تری نسبت به دو گروه تیمار داشت. بنابراین همانطور که مشاهده می‌شود، مهاجرت

سلول‌های تیمار شده با ویتامین D نسبت به گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و شاهد اختلاف معناداری نشان داد و مهاجرت سلول‌ها کاهش یافت. همچنین مهاجرت سلول‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری نشان داد و مهاجرت سلول‌ها کاهش یافت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D تاثیر معناداری در کاهش تهاجم سلول‌ها دارد (شکل ۸).



شکل ۷- مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست در گروه شاهد، تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D



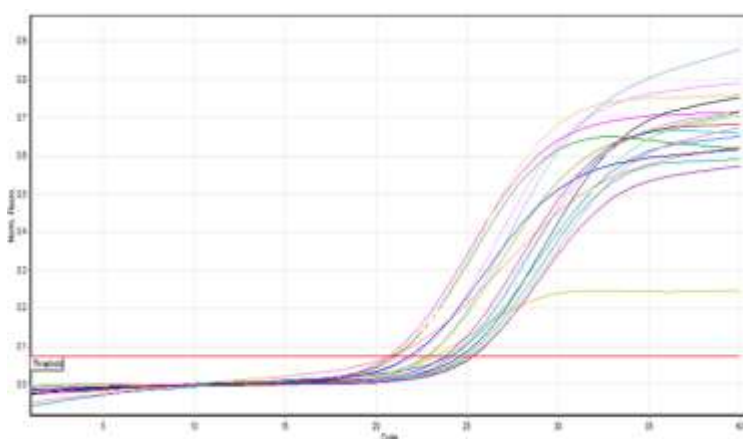
شکل ۸- درصد مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست در گروه شاهد، تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D

بررسی بیان ژن

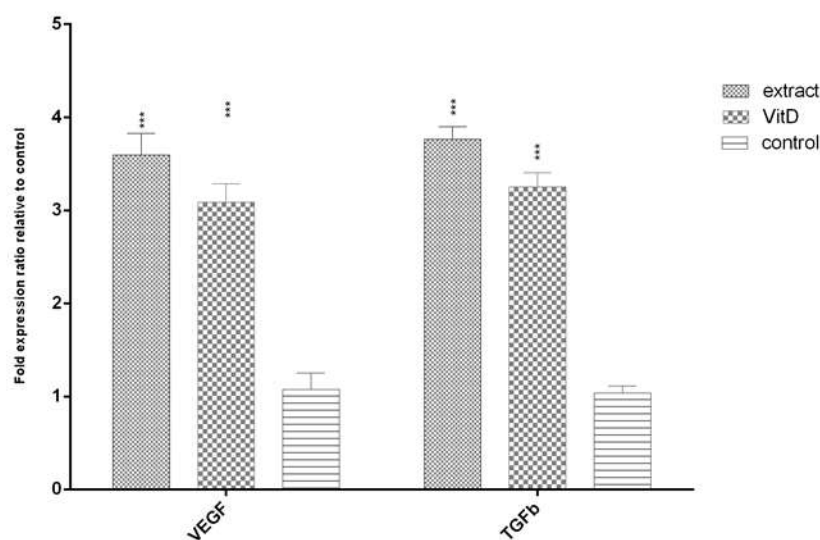
شکل ۹ نمونه‌ای از منحنی‌های Real-time PCR مربوط به منحنی‌های بیان ژن‌های *VEGF* و *TGFβ1* تحت تاثیر تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D می‌باشد. در این نمودار محور افقی نشان دهنده تعداد چرخه‌های PCR (C_t) و محور عمودی میزان نسبی بیان ژن را نشان می‌دهد. در چرخه‌های ابتدایی PCR منحنی بیان ژن‌های *VEGF* و *TGFβ1*

تحت تاثیر تیمار با عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D افزایش می یابد، اما به تدریج به حالت اشباع می رسند که نشان دهنده مراحل پایان تکثیر می باشد.

شکل ۱۰ و جدول ۵ میزان تغییرات بیان ژن های *VEGF* و *TGFβ1* پس از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D و گروه شاهد را نشان می دهد. میزان بیان ژن های *VEGF* و *TGFβ1* تیمار شده با عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی نسبت به گروه تیمار شده با ویتامین D و گروه شاهد اختلاف معناداری نشان داد. همچنین میزان بیان ژن های *VEGF* و *TGFβ1* تیمار شده با ویتامین D نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری نشان داد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D منجر به افزایش بیان ژن های *VEGF* و *TGFβ1* در سلول های فیروبلست انسانی گردید. تغییرات بیان ژن *VEGF* تحت تاثیر عصاره هیدرالکلی نسترن کوهی و ویتامین D به ترتیب برابر با $3/6 \pm 0/37$ و $3/09 \pm 0/42$ است. همچنین تغییرات بیان ژن *TGFβ1* تحت تاثیر عصاره هیدرالکلی نسترن کوهی و ویتامین D به ترتیب برابر با $2/25 \pm 0/57$ و $3/76 \pm 0/45$ است.



شکل ۹- منحنی تکثیر بیان ژن های *VEGF* و *TGFβ1*



شکل ۱۰- تغییرات میزان بیان ژن های *VEGF* و *TGFβ1* پس از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D

جدول ۵- تغییرات میزان بیان ژن های $TGF\beta 1$ و $VEGF$ پس از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D

۷۲ (ساعت)	شاهد	عصاره	ویتامین D
VEGF	$1/0.23 \pm 0.33$	$3/6 \pm 0.37$	$3/0.9 \pm 0.42$
TGF$\beta 1$	$1/13 \pm 0.55$	$3/76 \pm 0.45$	$2/25 \pm 0.57$

بحث و نتیجه گیری

زخم با ایجاد آسیب و تخریب پوست، منجر به اختلال در آناتومی ساختاری و از دست رفتن عملکرد پوست می شود. فاکتورهای مختلفی در تقسیم بندی انواع زخم وجود دارد. زمان لازم برای ترمیم زخم، یکی از مهم ترین فاکتورها در تقسیم بندی انواع زخم است. بر اساس این فاکتور، زخم ها در دو گروه حاد و مزمن قرار می گیرند (۶۰). التیام زخم، فرایند بسیار پیچیده ای است که طی آن، پوست در پاسخ به آسیب های وارد شده، خود را تعمیر می کند. فرایند التیام زخم به چند مرحله تقسیم می شود: هموستاز، التهاب، فاز تکثیری و در نهایت فاز بازسازی. این مراحل به طور پیوسته و همراه با برخی وقایع بیوشیمیایی رخ می دهد و در انتها منجر به ترمیم بافت آسیب دیده می شوند (۶۱). 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 حساب می آیند. بنابراین کنترل التهاب و تنظیم بیان ژن های مفید در ترمیم زخم، در پیشبرد ترمیم زخم بسیار اهمیت دارد (۶۲). سلول های فیبروبلاست، از جمله مهم ترین سلول های درگیر در ترمیم زخم هستند. این سلول ها تقریباً در تمامی مراحل ترمیم زخم فعالیت دارد و منجر به پیشبرد این فرایند می شوند. فیبروبلاست ها به لخته فیبرینی حمله می کنند، لخته فیبرینی را تخریب و حذف می کنند و مسیر را برای مهاجرت خود و سایر سلول های ترمیمی به فضای زخم باز می نمایند (۶۳). ماتریکس خارج سلولی، یکی از مهم ترین فاکتورهای دخیل در پیشبرد صحیح ترمیم زخم به شمار می آید. فیروپلاست ها با تولید و ترشح اجزای ماتریکس خارج سلولی به فضای زخم و همچنین تعامل و میان کنش با این اجزا، نقش اساسی در پیشبرد زخم را ایفا خواهند کرد. ماتریکس خارج سلولی، داربست و تکیه گاه فیزیکی را برای تشکیل بافت تازه، فراهم و به عنوان مخزن ذخیره سایتوکاین های ترمیمی عمل می کند (۶۴). بنابراین تکثیر و فعالیت فیبروبلاست ها در تنظیم تولید و ترشح اجزای ماتریکس خارج سلولی و در نهایت ترمیم صحیح و به موقع زخم عمل می کند. فیبروبلاست ها علاوه بر نقشی که در تولید ماتریکس خارج سلولی دارند، با تولید آنزیم های پروتئولیتیک (مانند پروتئینازها) در تخریب هدایت شده اجزای ماتریکس خارج سلولی آسیب دیده و تأمین مسیر مناسب برای مهاجرت سلول ها، رگزایی، تکثیر سلول ها و بازسازی بافت، نقش دارند (۶۵). ترکیبات تولید شده توسط فیبروبلاست ها در مراحل اولیه ترمیم زخم، نقش ایفا می کنند. سپس سلول های فیبروبلاست، خود، در مراحل بعدی وارد می شوند و ترمیم زخم را به پیش می برند. فیبروبلاست ها تکثیر می شوند و بخش اعظمی از سلول های بافت ترمیم شده را تشکیل می دهند (۶۶). در نهایت، فیبروبلاست های حاضر در لبه های زخم به میوفیبروبلاست تمایز یافته، منقبض می شوند و منجر به بسته شدن زخم می گردند. فیبروبلاست ها با کنترل تشکیل بافت فیبروپلازیا و تولید و ترشح سایتوکاین های ترمیمی، نقش اساسی در تنظیم ترمیم زخم دارند (۶۷).

فاکتور رشد تغییر دهنده بتا^۱ (β -TGF) فاکتور مهمی در روند بهبود زخم است که توسط پلاکت ها و ماکروفاژها سنتز می شود و از طریق تحریک رونویسی زن کلاژن پروتئو گلیکان ها و فیبرونکتین تولید پروتئین های ماتریکس خارج سلولی را افزایش می دهد. β -TGF همچنین بر میزان ترشح پروتئین بازدارنده بافتی متالوپروتئینازها تأثیر گذاشته و با تحریک سنتز آن تجزیه ماتریکس را کاهش می دهد؛ بنابراین یکی از فاکتورهای رشدی مهم در روند ترمیم زخم است. در مطالعات مختلف افزایش بیان

¹Factor Growth Transforming

انواع مختلفی از اعضای این خانواده در محل زخم دیده شده است (۶۸). به دنبال آسیب در محل زخم در انسان، بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی^۲ (VEGF) توسط کراتینوسیت ها و ماکروفاژها، افزایش می یابد. بیان گیرنده آن نیز در عروق خونی یافت های گرانوله شده نشان داده شده است (۶۹). مطالعات مختلف نقش VEGF را در ترمیم زخم نشان داده است و کاهش با تجزیه آن، باعث اختلال در ترمیم زخم می شود. در پاسخ به آسیب بافتی VEGF از طریق مکانیسم پاراکرینی موجب تحریک رگزایی در محل زخم می شود (۷۰).

در این پژوهش نتایج حاصل از سنجش MTT نشان داد که عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D تکثیر در یک الگوی وابسته به دوز و زمان در سلول های فیبروبلاست مهار می کند. نتایج حاصل از سنجش زنده مانی درصد بقای سلولی نشان داد که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر که عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار، موجب القای سلول های فیبروبلاست مورد مطالعه گردید. ویتامین D می تواند از طریق فعال سازی برخی مسیرهای سیگنالی خاص، مانع تکثیر سلول ها شود. بنابراین در سلول های فیبروبلاست ها باعث کاهش رشد و زنده مانی شد. همچنین گیاه نسترن کوهی دارای ترکیبات فعال زیستی مثل فنول ها، فلاونوئیدها و ویتامین C است که خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی دارند. در دوزهای بالا، این ترکیبات ممکن است باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول ها شوند که به مرگ سلولی یا آپوپتوز منجر می شود (۷۱). پور علی و یعقوبی (۱۴۰۱) در بررسی اثر عصاره تهره نندی روی بقا، تکثیر و القای آپوپتوزیس در سلول های سرطانی پروستات، روده بزرگ و سلول طبیعی فیبروبلاست انسان، در نتایج مطالعه خود بیان کردند که زنده مانی سلول های سرطان پروستات، روده بزرگ و فیبروبلاست در حضور بیشترین مقدار از عصاره به ترتیب کاهش یافت. عصاره میران ساخت DNA را نیز به ترتیب به میزان ۳۲ و ۳۷ و ۱۵ درصد در سلول های سرطان پروستات، روده و فیبروبلاست کاهش داد. مرگ آپوپتوزی پس از تیمار با عصاره در سلول های سرطانی پروستات و روده بزرگ نیز به ترتیب ۳۱ و ۴ درصد مشاهده شد (۷۲). ضمیری اخلاقی و همکاران (۲۰۱۱) عصاره اتانولی گل محمدی را روی سلول سرطانی Hela اثر داده و میزان زنده مانی سلول را پس از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت به روش MTT سنجیدند. اختلاف در زنده مانی سلول پس از ۷۲ ساعت به طور مشهودی معنی دار بود (۷۳). توانگرریزی و همکاران (۱۳۹۹) سمیت سلولی ویتامین D بر روی رده سلولی فیبروبلاستومای انسانی بررسی کردند، نتایج نشان داد، بالاترین سمیت سلولی غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ویتامین D مربوط به زمان تیمار ۴۸ ساعت است (۵۶). بنابراین نتایج این مطالعات همانند پژوهش اثر سمیت تیمارها وابسته به دوز و زمان است.

همچنین نتایج حاصل از تست مهاجرت نشان داد که عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D پس از گذشت ۷۲ ساعت موجب کاهش مهاجرت سلول های فیبروبلاست نسبت به گروه شاهد گردید. همچنین نتایج مطالعات ریخت شناسی نشان داد که تغییرات مورفولوژیکی سلول های تحت تاثیر تیمار عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D نسبت به شاهد بیشتر است.

بنابراین ترکیبات فعال زیستی در عصاره نسترن، مانند فنول ها و فلاونوئیدها، دارای خواص ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی هستند که ممکن است در روند مهاجرت سلول ها اختلال ایجاد کنند. در فرایند مهاجرت، سلول ها به سیگنال های محیطی نیاز دارند تا بتوانند به سمت نقاط خاص حرکت کنند، و خاصیت ضدالتهابی ممکن است این سیگنال ها را تعدیل کند (۷۴). همچنین ویتامین D می تواند بر بیان ژن ها و مسیرهای سیگنالی مرتبط با حرکت سلولی اثر بگذارد. ویتامین D با فعال سازی گیرنده های خاص، بر برخی ژن های تنظیم کننده رشد و مهاجرت سلول اثر می گذارد که می تواند باعث کاهش حرکت و مهاجرت سلول های فیبروبلاست شود (۷۴).

قرارگیری و انکوباسیون فیبرونکتین همراه با ویتامین D و ترکیبات موجود در نسترن کوهی منجر به شکست فیبرونکتین می شود. به عبارتی ویتامین D و ترکیبات موجود در نسترن کوهی با تأثیر بر فیبرونکتین و تغییر در ساختار فیبرونکتین منجر به کاهش

²Factor Growth Endothelial Vascular

اتصال فیبروبلاست به فیبرونکتین می شود و امکان مهاجرت فیبروبلاست ها را فراهم می کند (۷۵). در واقع با افزایش بیان ژن β -TGF در سلول های فیبروبلاست، میزان تکثیر این سلول ها افزایش می یابد، این سلول ها در محل زخم تجمع می یابند، β -TGF محرک تولید اجزای ماتریکس خارج سلولی در سلول های فیبروبلاست می باشد، تشکیل و بازسازی ماتریکس خارج سلولی، منجر به مهار بیان ژن و تولید β -TGF می گردد و تکثیر سلول های فیبروبلاست و تولید ماتریکس خارج سلولی در این سلول ها متوقف خواهد شد (۷۶). فیبروبلاست ها اجزای ماتریکس خارج سلولی را تولید و ترشح می کنند. سپس سلول های فیبروبلاست از طریق گیرنده های خود با اجزای ماتریکس خارج سلولی، میان کنش می دهند که در اثر این میان کنش، رفتار سلول ها مانند تکثیر، مهاجرت و تمایز، تنظیم و کنترل می شود (۷۷). به این شکل، تجمع سلول ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی در یک محدوده کنترل شده انجام می پذیرد و زخم مزمن، بهبود خواهد یافت و از پیشرفت ترمیم در راستای پاسخ پاتولوژی، جلوگیری خواهد شد (۷۸).

Horobin و همکاران (۲۰۱۶) در نتایج مطالعه خود نشان دادند که فیبروبلاست ها ۴۸ ساعت پس از قرار گرفتن در مجاورت عصاره گوارشی لارو در دو جهت افقی و عمودی مهاجرت کرده بودند و دارای شکل گسترده تری نسبت به نمونه کنترل بودند. در حالی که غلظت بالای عصاره گوارشی لارو منجر به مهار مهاجرت سلول های فیبروبلاست نسبت به نمونه کنترل شده بود (۷۹). همچنین در مطالعه کمالی و همکاران (۱۳۹۸) حضور سلول های فیبروبلاست در مجاورت عصاره گوارشی لارو مگس منجر به کاهش تعداد سلول های فیبروبلاست متصل به ماتریکس شده بود. سلول های فیبروبلاست در مجاورت عصاره گوارشی لارو دارای سطح کم تر و ظاهر گردتری نسبت به نمونه کنترل داشتند. در بعضی از این سلول ها فیلوپودیا نیز تشکیل شده بود (۸۰). Atiba و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر مصرف خوراکی آلوئه ورا بر زخم های باز در موش های صحرایی دیابتی نوع ۲ را بررسی کردند. نتایج نشان داد که انفیلتراسیون سلولی التهابی رگزایی رسوب ماتریکس خارج سلولی و اپیتلیال شدن به ترتیب ارتقا یافته است، بنابراین رگزایی و اپیتلیال شدن و بهبود زخم مشاهده گردید که احتمالاً $TGF\beta 1$ در مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست نقش داشته و در نهایت فیبروبلاست ها ماتریکس خارج سلولی جدیدی را سنتز و رسوب می کنند که از سلول ها و رگ های خونی پشتیبانی می کنند و ماکروفاژها فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) را آزاد می کنند که باعث رگزایی می شود و در نهایت منجر به بهبودی زخم می شود (۸۱). بنابراین این مطالعات با پژوهش ما همخوانی دارد.

نتایج بررسی بیان ژن نشان داد که عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی و ویتامین D پس از ۷۲ ساعت منجر به افزایش بیان ژن های $TGF\beta 1$ و $VEGF$ در سلول های فیبروبلاست انسانی گردید. اما عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی نسبت به ویتامین D بیان ژن های $TGF\beta 1$ و $VEGF$ اختلاف معناداری نشان داد. صرف نظر از اهمیت میانکنش های سلول و ماتریکس سلول در ترمیم زخم، تمامی مراحل ترمیم زخم توسط طیف وسیعی از فاکتورهای رشدی و سیتوکین ها کنترل می شود (۸۲). مطالعه زیادی اثر سودبخش بسیاری از فاکتورهای رشد را مانند GF-S و فاکتور ماکروفاژ گرانولوسیت تحریک کننده کلونی GM-CSF مشتق از پلاکت در فرآیند ترمیم زخم اثبات کرده است. با این وجود نقش فاکتورهای رشد داخلی در فرآیند ترمیم تا حدودی مشخص شده است و در اغلب موارد عملکردی که برای هر یک از این فاکتورها پیشنهاد شده است (۸۳). $TGF\beta 1$ و $VEGF$ نقش مهمی در پیوستن ماکرومولکول ها در فرایند ترمیم زخم دارند. $TGF\beta 1$ در سنتز پلی پپتیدها، رشد سلول ها و تمایز آنها در طی فرایند ترمیم زخم دخالت دارد. این فاکتور نقش چند گانه در ترمیم زخم دارد و علاوه بر کمک به پیشبرد آنژیوژنز، در التهاب تکثیر فیبروبلاست سنتز کلاژن و بازسازی ماتریکس خارج سلولی نقش دارد. افزایش بالای فاکتور $TGF\beta 1$ ممکن است منجر به تشکیل اسکار در محل زخم شود (۸۴). $VEGF$ در سنتز ماکرومولکول های ماتریکس سلولی در طی فرایند ترمیم نقش دارد و تشکیل کلاژن و اپیتلیزاسیون را تحریک می کند. این فاکتور رشد، به عنوان یک فاکتور مهم در فرایند آنژیوژنز شناسایی شده است (۸۵). بنابراین با توجه به نقش ویتامین C در روند بهبود زخم می توان افزایش بیان ژن را به وجود ویتامین C در عصاره هیدروالکی گیاه نسترن کوهی نسبت داد (۸۶).

fang-Hui و همکاران (۲۰۲۰)، بیان افزایشی $TGF\beta 1$ را در روزهای ۷ و ۱۱ و ۱۴ بعد از القای مدل حیوانی سوختگی درجه سوم نشان دادند؛ اما در روز ۲۱ بعد از سوختگی بیان کاهشی در $TGF\beta 1$ مشاهده شد. که احتمالاً یک مزیت برای جلوگیری از تشکیل اسکار در ناحیه زخم است (۸۷). محمد و همکاران (۲۰۱۶)، در مطالعه ای نشان دادند که ویتامین C باعث تکثیر فیبروبلاست ها و افزایش بیان $VEGF$ می شود. آنها زخم با ضخامت کامل را در موش هایی که توانایی سنتز ویتامین C را نداشتند، ایجاد کردند و در گروه های مورد مطالعه، مقادیر مختلف از ویتامین C را به صورت زیر صفاقی به موش ها تزریق کردند. نتایج نشان داد که ویتامین C می تواند باعث مهار سایتوکاین های پیش التهابی شده و روند بهبود زخم را با افزایش تکثیر فیبروبلاست ها و افزایش بیان $VEGF$ سرعت بخشید (۸۸). کمالی و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه ای نشان دادند که عصاره لارو مگس سرکه باعث افزایش بیان ژن $TGF\beta$ نسبت به گروه کنترل گردید، با توجه به اثر افزایشی بر رشد فیبروبلاست و تأیید مولکولی ژن های فوق پیشنهاد می شود این عصاره با افزایش بیان ژن $TGF\beta$ دارای توانایی برای درمان زخم می باشد (۸۰). چراغی و همکاران (۱۴۰۱)، تاثیر عصاره جلبک سارگاسوم ا یلیسیفولیوم بر بیان ژن های $TGF\beta$ و $VEGF$ بررسی کردند، نتایج نشان داد که عصاره جلبک سارگاسوم به علت خواص ضد باکتریایی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و به علت وجود آلژینات در آن از لحاظ بیومتری در فرآیند بهبود زخم مؤثر است، حتی نسبت به پماد آلفا موجود در بازار عملکرد بهتری داشته است. توجه به اثر آن در افزایش معنادار بیان ژن $TGF\beta$ و $VEGF$ پیشنهاد می شود این عصاره دارای توانایی داشته است و برای درمان زخم است (۸۹).

نتیجه گیری کلی

عصاره های نسترن معمولاً حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند که می توانند به محافظت از سلول های فیبروبلاست در برابر آسیب های اکسیداتیو کمک کنند. همچنین نسترن کوهی ممکن است به ترمیم بافت و افزایش سرعت بهبود زخم ها کمک کند، که این امر می تواند به دلیل وجود ویتامین C و دیگر مواد مغذی موجود در آن باشد. ویتامین D نقش مهمی در رشد و تمایز سلول ها دارد و می تواند به تنظیم متابولیسم کلسیم و فسفر در سلول های فیبروبلاست کمک کند، و با خواص ضد التهابی است که می تواند به بهبود عملکرد سلول های فیبروبلاست و کاهش عوارض التهابی کمک کند. بنابراین نتایج حاصل از تحقیق ما نشان داد که در دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پس از ۷۲ عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن و ویتامین D به طور موقت استرس یا سمیت در سلول ها به دلیل تولید گونه های فعال اکسیژن یا اختلال در تعادل داخلی سلول ها رخ داد که منجر به کاهش زنده ماندن و تغییرات مورفولوژیکی سلول ها گردید. همچنین در بررسی بیان ژن نشان داده شد که بیان ژن های $TGF\beta 1$ و $VEGF$ در سلول های فیروبلست تحت تاثیر تیمارها در مواجهه با استرس یا آسیب سلولی به عنوان مکانیزمی جبرانی برای ترمیم سلول های آسیب دیده جدید افزایش یافت.

پیشنهادهات

- ۱- بررسی تاثیر سایر ویتامین ها، عصاره های گیاهی بر بیان $ITGF\beta$ و $VEGF-A$ در سلول های فیرو بلاست انسانی
- ۲- بررسی اثر هم زمان ویتامین D و عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina*) بر بیان سایر ژن ها در سلول های فیبرو بلاست انسانی
- ۳- بررسی اثر هم زمان ویتامین D و عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina*) بر بیان $ITGF\beta$ و $VEGF-A$ در سلول های سرطانی
- ۴- بررسی اثر هم زمان ویتامین D و عصاره هیدروالکلی گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina*) بر بیان $ITGF\beta$ و $VEGF-A$ در سلول های فیرو بلاست انسانی با دوز ها و زمان های مختلف

منابع

1. <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/products/the-antiaging-power-of-rosehip-botanical-extract.html>
2. https://journal.rums.ac.ir/browse.php?a_id=2090&sid=1&slc_lang=fa&html=1
3. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(08\)60878-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)60878-8/fulltext) -Dr Thomas G Weiser, MD Scott E Regenbogen, MD Katherine D Thompson, BA Alex B Haynes, MD Stuart R Lipsitz, ScD
4. Young, V Leroy M.D.; Hutchison, John Ph.D., F.R.C.P., F.F.P.M.. Insights into Patient and Clinician Concerns about Scar Appearance: Semiquantitative Structured Surveys. *Plastic and Reconstructive Surgery* 124(1):p 256-265, July 2009
5. Bock O, Schmid-Ott G, Malewski P, Mrowietz U. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring. *Arch Dermatol Res.* 2006 Apr;297(10):433-8. doi: 10.1007/s00403-006-0651-7. Epub 2006 Mar 10.
6. [https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/2116/3131-itation/Cómo citar este artículo: Eren T, OK S, Yilmaz E. 2023. Comprehensive characterization of physicochemical, thermal, compositional, and sensory properties of cold-pressed rosehip seed oil. *Grasas y Aceites* 74 \(4\), e534.](https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/2116/3131-itation/Cómo citar este artículo: Eren T, OK S, Yilmaz E. 2023. Comprehensive characterization of physicochemical, thermal, compositional, and sensory properties of cold-pressed rosehip seed oil. Grasas y Aceites 74 (4), e534.)
7. <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/a-0725-8456>
8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039610905705764?via%3Dihub>
9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039610905705764?via%3Dihub>
10. Bock O .Schmid-Ott G .Malewski P .Mrowietz U.. *Arch Dermatol Res* . 2006 ; 297 (10): 433 - 438
11. <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=57497>
12. https://www.traumamon.com/article_100136_be0fd20590721f2050cc2a80f671f2_1d.pdf
13. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020; 877:173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090
14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811776->
15. Wei, K., Nguyen, H.N. and Brenner, M.B., 2021. Fibroblast pathology in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 131(20).
16. Talbott, H.E., Mascharak, S., Griffin, M., Wan, D.C. and Longaker, M.T., 2022. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell stem cell*, 29(8), pp.1161-1180.
17. Lynch, M.D. and Watt, F.M., 2018. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *The Journal of clinical investigation*, 128(1), pp.26-35.
18. Fernandes, I.R., Russo, F.B., Pignatari, G.C., Evangelinellis, M.M., Tavorali, S., Muotri, A.R. and Beltrão-Braga, P.C.B., 2016. Fibroblast sources: Where can we get them?. *Cytotechnology*, 68, pp.223-228.
19. Nojavan, S., Khalilian, F., Kiaie, F.M., Rahimi, A., Arabanian, A. and Chalavi, S., 2008. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of food composition and analysis*, 21(4), pp.300-305.
20. Marstrand, K. and Campbell-Tofte, J., 2016. The role of rose hip (*Rosa canina* L) powder in alleviating arthritis pain and inflammation—part II animal and human studies. *Botanics: Targets and Therapy*, pp.59-73.
21. Lips, P., 2006. Vitamin D physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*, 92(1), pp.4-8.

22. Adams, J.S. and Hewison, M., 2010. Update in vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), pp.471-478.
23. Tsiaras, W.G. and Weinstock, M.A., 2011. Factors influencing vitamin D status. *Acta Dermato Venereologica*, 91(2), p.115.
24. Holick, M.F. and Slominski, A.T., 2024. Photobiology of vitamin D. In *Feldman and Pike's Vitamin D* (pp. 27-45). Academic Press.
25. Hossein-nezhad, A. and Holick, M.F., 2013, July. Vitamin D for health: a global perspective. In *Mayo clinic proceedings* (Vol. 88, No. 7, pp. 720-755). Elsevier.
26. Chen, T.C., Lu, Z. and Holick, M.F., 2010. Photobiology of vitamin D. *Vitamin D: physiology, molecular biology, and clinical applications*, pp.35-60.
27. Utiger, R.D., 1998. The need for more vitamin D. *New England Journal of Medicine*, 338(12), pp.828-829.
28. Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Kaneko, I., Haussler, C.A., Hsieh, D., Hsieh, J.C. and Jurutka, P.W., 2013. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified tissue international*, 92, pp.77-98.
29. Kimball, S., Fuleihan, G.E.H. and Vieth, R., 2008. Vitamin D: a growing perspective. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 45(4), pp.339-414.
30. Heaney, R.P., 2008. Vitamin D in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(5), pp.1535-1541.
31. Ramirez, A.M., Wongtrakool, C., Welch, T., Steinmeyer, A., Zügel, U. and Roman, J., 2010. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β 1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 118(3), pp.142-150.
32. Gisbert-Ferrándiz, L., Cosín-Roger, J., Hernández, C., Macias-Ceja, D.C., Ortiz-Masiá, D., Salvador, P., Esplugues, J.V., Hinojosa, J., Navarro, F., Calatayud, S. and Barrachina, M.D., 2020. Diminished vitamin D receptor protein levels in Crohn's disease fibroblasts: effects of vitamin D. *Nutrients*, 12(4), p.973.
33. Peña, F., Valencia, S., Tereucán, G., Nahuelcura, J., Jiménez-Aspee, F., Cornejo, P. and Ruiz, A., 2023. Bioactive compounds and antioxidant activity in the fruit of rosehip (*Rosa canina* L. and *Rosa rubiginosa* L.). *Molecules*, 28(8), p.3544.
34. Mazzara, E., Caprioli, G., Simonelli, G., Mustafa, A.M., Maggi, F. and Cespi, M., 2023. Microwave hydrodiffusion and gravity extraction of vitamin C and antioxidant compounds from rosehips (*Rosa canina* L.). *Foods*, 12(16), p.3051.
35. Outaki, M., Zefzoufi, M., Sammama, A., Sammama, H. and Bouamama, H., 2024. Rosa Canina Aqueous Extract: Chemical Characterization and Green Synthesis of Silver and Copper Nanoparticles. In *Technical and Technological Solutions Towards a Sustainable Society and Circular Economy* (pp. 117-130). Cham: Springer Nature Switzerland.

۳۶. اطمیابی ناهید، نیکنام گلشاد، نصیری سیدمهدی، طاهری محمد. بررسی اثر عصاره ی گیاهی برگ انجیر بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای (MMPs) در کشت سلول های فیبروبلاست (HEP2). مجله دامپزشکی ایران (دانشگاه شهید چمران اهواز). ۱۳۹۶، ۱۳(۱): ۱۳-۲۵.

۳۷. مروج فرشی حمیده، محمودی راد مهناز، مصفا نریمان، میرزایی منصوره، طوسی پرویز. بررسی امکان تهیه و تولید بانک استاندارد فیبروبلاست انسانی. ۱۳۹۶. ۱۹۹-۲۰۳.

۳۸. توانگرریزی، شیرین و هادی، فرانک و حجازی، حسام الدین و آذربانی، فریده، ۱۳۹۹، بررسی سمیت سلولی ویتامین دی بر روی رده سلولی فیبروبلاستومای انسانی، هفتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران، تهران.
39. J. M. Hollis; F. J. Lovas; P. R. Jewell; L. H. Coudert (2002-05-20). "Interstellar Antifreeze: Ethylene Glycol". *The Astrophysical*
40. Talbott, Heather E et al. "Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis." *Cell stem cell* vol. 29,8 (2022)
41. Negahdari S, Galehdari H, Kesmati M, Rezaie A, Shariati G. Wound Healing Activity of Extracts and Formulations of Aloe vera, Henna, Adiantum capillus-veneris, and Myrrh on Mouse Dermal Fibroblast Cells. *Int J Prev Med*. 2017 Mar 10; 8:18.
60. Qian B, Li J, Guo K, Guo N, Zhong A, Yang J, et al. Antioxidant biocompatible composite collagen dressing for diabetic wound healing in rat model. *Regen Biomater*. 2023 ; 4 (2): 1 –11.
61. Elbially ZI, Atiba A, Abdelnaby A, Al -Hawary II, Elsheshtawy A, El -Serehy HA, et al. Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and α -SMA genes expression. *BMC Veterinary Research*. 2020;16(352):1 -11.
62. Liu Y, Xiao X, Ji L, Xie L, Wu S, Liu Z. Camellia cake extracts reduce burn injury through suppressing inflammatory responses and enhancing collagen synthesis . *Food Nutr Res*. 2020;(11): 3 -35 .
63. Zhu KQ, Engrav LH, Armendariz R, Muangman P, Klein MB, Carrougner GJ, et al. Changes in VEGF and nitric oxide after deep dermal injury in the female, red Duroc pig further similarities between female, Duroc scar and human hypertrophic scar. *Burns* . 2005 ;13(1) : 5 -10.
69. Friedrich EE SL, Natesan S, Zamora DO, ChristyRJ, Washburn NR. Effects of hyaluronic acid conjugation on anti -TNF - α inhibition of inflammation in burns. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(5):1527 –1536.
70. Mimura ECM, Favoreto JPM, Favero ME, Bonifacio KL, Peixe TS, Morita AA, et al. Silver serum levels in burned patients treated with silver sulfadiazine and its toxicity on inflammatory cells. *Burns*. 2020;46(5):1120 -7.
71. Fahimi S, Hajimehdipoor H, Abdollahi M, Mortazavi S. Burn healing plants in Iranian Traditional Medicine. *RJP*. 2015;2(1):53 -68.
۷۲. پورعلی، مسعود، یعقوبی، محمدمهدی. مطالعه اثر عصاره تمرهندی روی بقا، تکثیر و القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پروستات، روده بزرگ و سلول طبیعی فیبروبلاست انسان. *سلول و بافت*. ۱۴۰۱. ۱۳ (۱): ۱۱-۲۲.
73. Zamiri Akhlaghi A, Rakhshandeh H, TayaraniNajaran Z, Mousavi S-H (2011) Study of cytotoxic properties of Rosa damascena extract in human cervix carcinoma cell line. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 1(2):74-77.
74. Gupta A. A review of the use of maggots in wound therapy. *Annals of plastic surgery*. 2008;60(2):224-7.
75. Indrawati, R., et al., Encapsulation of brown seaweed pigment by freeze drying: characterization and its stability during storage. *Procedia chemistry*, 2015. 14: 353 -360.
76. Shams M., Afsharzadeh S., Balali Gh ., Valinassab T .and De Clerck O .2013 12 31 :New records of Sargassum species (Sargassaceae ,Phaeophyta)from the Persian Gulf and oman sea in Iran. - Iran .*J.Bot* ,19(2):250 -258.
77. Kuznetsova TA, Andryukov BG, Besednova NN, Zaporozhets TS, Kalinin AV. Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: A review. *J . Marine Science and Engineering*. 2020 Jul;8(7):481.

78. Madkour FF, Hassan MM, Abdo W, Khalil WF. Wound healing activity of brown algae plus polyherbal extract in normal and alloxan -induced diabetic rats. J . Advanced Veterinary Research. 2013 Jul 1;3(3):102 -8.

79. 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.

۸۰. کمالی، شهرام. بوذرپور، سهراب و مومنی مقدم، مجید. تعدیل بیان $TGF-\beta$ و $TNF-\alpha$ به نفع ترمیم زخم توسط عصاره لارو مگس. دوره ۲۸، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰، صفحه ۹۳-۹۸.

۸۹. چراغی، نیلوفر و حیدری نصرآبادی، میترا، ۱۴۰۱، تاثیر عصاره جلبک سارگاسوم ایلیسیفولیوم بر میزان بیان ژن $TGF\beta$ ۱ و VEGFA در خلال ترمیم زخم خطی پوستی.