بررسی اثرات التیام‌بخشی آلژینات تولید شده میکروبی و عصاره خارشتر بر زخم‌های جلدی موش صحرایی: ترکیبی از پانسمان‌های مدرن و سنتی

پرستو پورعلی[1]، لیلا خجسته[1]، بیژن فهیمی[1]، فاطمه مقیمیان[2]، بهروز یحیایی[1]*

۱- گروه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاداسلامی، دامغان، ایران

*آدرس مکاتبه: شاهرود، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود

تلفن و نمابر: ۳۲۳۹۰۰۷۷ (۰۲۳)

پست الکترونیک: behroozyahyaei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۳۰ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۱۱/۲۸

چکیده

مقدمه: دست آورد پوشاننده زخم زیست سازگار یکی از زمینه‌های جذاب تحقیقات است.

هدف: مطالعه حاضر تلاش در بررسی اثرات التیام‌بخشی آلژینات- عصاره خارشتر در مدل زخم موش صحرایی دارد.

روش بررسی: پس از کشت و شناسایی استرین‌های ***Pseudomonas aeruginosa*** با روش‌های فنوتایپی و ژنوتایپی، آلژینات تولیدی استخراج و برای بررسی سمیت سلولی با روش **MTT** استفاده شد. زخم‌هایی به ابعاد **cm** ۱/۵ × ۱/۵ در پوست موش‌های صحرایی ایجاد شد. حیوانات به ۴ گروه (**n=۸**) تقسیم شدند. سه گروه به صورت مساوی در طول ۲۱ روز به ترتیب با دوزهای غیرسمی از هیدروژل آلژینات، عصاره گیاه و هیدروژل آلژینات- عصاره گیاه تیمار شدند. گروه چهارم بدون تیمار باقی ماند و به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. در سه روز از تیمارها، ۲ موش صحرایی از هر گروه انتخاب و محیط زخم و اثرات هر ماده آنالیز شدند.

نتایج: آلژینات از ***P. aeruginosa* strain K1** استخراج شد. نتایج بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که درصد بسته شدن زخم در دو گروه هیدروژل آلژینات و ترکیب هیدروژل آلژینات- عصاره خارشتر تفاوت معناداری با باقی گروه‌های دیگر دارند (**P** < ۰/۰۵). نتایج بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که بهترین گروه، گروه تیمار شده با ترکیب هیدروژل آلژینات- عصاره خارشتر بود.

نتیجه‌گیری: با وجود اینکه هر دو ماده دارای توانایی خوبی در التیام زخم می‌باشند ولی مطالعات میکروسکوپی نشان داد که ترکیب هیدروژل آلژینات- عصاره خارشتر دارای فعالیت بهتری در مکان زخم بوده است.

گل‌واژگان: ترمیم زخم، عصاره خارشتر، هیدروژل آلژینات، ***Pseudomonas aeroginosa***

مقدمه

زخم و ترمیم آن پدیده بیولوژیکی بیوشیمیایی متشکل از مجموعه‌ای از مکانیسم‌ها شامل تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌باشد. اینکه در روند ترمیم زخم دخالت نمود یا زخم را به حال خود رها کرد تا خود به خود التیام یابد وابسته به شرایط زخم دارد ولی به ۳ فرایند کلی قابل تقسیم می‌باشد: فاز التهاب، فاز تکثیر و فاز بلوغ [۱]. در فاز التهاب که در پاسخ طبیعی بدن به زخم ایجاد شده به وجود می‌آید، رگ‌های خونی موجود در محل زخم ابتدا منقبض و سپس با ایجاد لخته خون، خونریزی بند خواهد آمد. سلول‌های ماکروفاژ و نوتروفیل به همراه فاکتورهای رشد، آنزیم‌ها و مواد غذایی در بستر زخم فعالیت نموده و هموستازی پدید آمده و فاز دوم رخ می‌دهد. در طی فاز تکثیر بافت گرانوله تشکیل می شود که همراه با ایجاد عروق خونی جدید می‌باشد که به آنژیوژنز شهرت دارد و درنهایت فاز بلوغ زمانی رخ خواهد داد که زخم بسته شده است. در این فاز فرم‌های کلاژن از تایپ ۳ به ۱ تغییر نموده و فعالیت سلولی احیا و تعداد عروق خونی کاهش خواهد یافت. زخم‌ها به انواع قابل ترمیم (حاد)، زخم هایی با قابلیت ترمیم بینابینی و زخم‌های غیرقابل ترمیم (مزمن) طبقه‌بندی می‌شوند که بر حسب نوع، برخی آنها توسط خود فرد قابل تیمار می‌باشد و برخی نیاز به مراجعات پزشکی دارد. برخی از انواع زخم نیز زخم‌های حاصل از متاستاز سرطان می‌باشند که غالباً غیرقابل ترمیم هستند [۱].

تسریع روند ترمیم زخم به عنوان یک اصل در علم درمان مورد توجه می‌باشد که هدف از آن کمک به بهبود زخم‌های مزمن است [۳، ۲]. افزایش کیفیت درمان زخم نیز همیشه مورد تاکید دانشمندان بوده است. راه‌هایی وجود دارد که بتوان به کمک آنها به زخم کمک کرد تا سرعت ترمیم زخم را افزایش دهد. ازجمله پوشاننده‌های زخم و پمادهای تهیه شده به روش های شیمیایی و بیولوژیک که هر کدام دارای نواقص، محدودیت‌ها و اثرات جانبی خاص خود می‌باشند [۵، ۴].

پانسمان نقش حیاتی در درمان زخم دارد. پانسمان‌ها به دو گروه جدید و سنتی قابل طبقه‌بندی می‌باشند. به طورکلی نتایج تحقیقات، سنت غلط خشک نگه داشتن زخم برای بهبود آن را رد و مفهوم جدید درمان زخم با حفظ رطوبت (Moist Wound Healing) را مبنای کار متخصصان زخم قرار داد. از گروه پانسمان‌های جدید مرطوب می‌توان به انواع فوم، هیدروژل و هیدروکلویید اشاره نمود. حدوداً ۹۸٪ از حجم پانسمان‌های مرطوب از آب مقطر است که باعث تجزیه و حل شدن بافت نکروز زخم بدون آسیب رساندن به سلول‌های سالم می‌شود. هیدروژل‌ها شبکه‌های سه بعدی از زنجیره‌های پلیمری هیدروفیل با توانایی بالا در نگهداری آب می‌باشند و به دلیل اینکه آب بخش مهمی از سلول‌ها را تشکیل می‌دهد، پلیمرهای مذکور توانایی جذب آب در مقادیر بالا را داشته که آنها را کاندید مناسبی در ترمیم زخم نموده است. هیدروژل‌ها دارای سازگاری با بدن و فاقد سمیت می‌باشند که از میان آنها می‌توان به انواعی نظیر کلاژن، هیالورونات، آلژینات، فیبرین، سلولز، آگارز، دکستران و چیتوزان اشاره نمود. امروزه هیدروژل‌های تولید شده به صورت طبیعی جایگزین انواع مصنوعی شده‌اند که این نوع از ساختارها معمولاً دارای خاصیت ژلاتینی و مکانیکی بالا با توانایی بیشتری در نگهداری آب می‌باشند. این ساختارها در شرایط مختلف بازی و اسیدی و نیز دماهای بالا از لحاظ مکانیکی پایدار می‌باشند. هیدروژل هیدروژل‌ها یه عنوان ابزاری برای دارورسانی استفاده می‌شوند که می‌توان از آنها برای رسانیدن انواعی از پپتیدها و پروتئین‌ها به سلول‌ها استفاده نمود.

از انواع پانسمان‌های مرطوب و از دسته هیدروژل‌ها، آلژینات می‌باشد که مولکول‌های آلژینات کلسیم طی فرآیند تبادل یونی اگزودا را تا حد اشباع شدن جذب می‌کنند و به تدریج یک ژل بسیار نرم تشکیل می‌شود که حفره زخم را پر می‌کند. در این حالت هیدروژل مذکور شرایط درمان مرطوب زخم را فراهم کرده و در عین حال با حفاظت از انتهای آزاد اعصاب درد بیمار را کاهش می‌دهد [۹-۶].

آلژینات اگزوپلی ساکاریدی آنیونی متشکل از واحدهای د- مانورونیک اسید و ال-گلوکورونیک اسید است [۱۰]. این پلی ساکارید توسط انواعی از جلبک‌های قهوه‌ای و برخی از باکتری‌ها نظیر *Pseudomonas aeruginosa* و *Azotobacter* تولید می‌شود [۱۰]. باکتری *Pseudomonas*

aeruginosa یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب و مهم بیمارستانی است [۱۲، ۱۱]. این ارگانیسم با تولید کپسولی از جنس آلژینات به عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری زایی به سلول میزبان چسبیده و به سهولت در بافت هدف تشکیل میکروکلنی می‌دهد [۱۰].

گزارش شده است که فیبرهای آلژینات به دلیل خواص ایجاد ژل منحصر به فرد در مهندسی بافت کاربرد فراوانی دارد، سازگار با بدن بوده و غیر چسبنده عمل می‌کند. این هیدروژل به دلیل ساختار هیدروفیلیک خود با سلول‌ها واکنش داده که سبب جذب محدود پروتئین‌ها می‌شود. انواعی از محصولات تجاری آن مانند Nu-Derm، Curasorb و AlgiSite در دسترس است که به عنوان پوشش‌دهنده زخم عمل می‌کنند. این مواد علاوه بر دارورسانی می‌توانند سلول‌ها را در خود به دام انداخته و جهت مهندسی بافت استفاده شوند [۱۳]. آلژینات دارای قیمت پایین، سهولت دسترسی و توانایی تشکیل ژل می باشد که در اهداف انتقال داروهای شیمیایی کوچک، پروتئین‌ها و نیز در انتقال و پیوند سلول‌ها در مکان خاص از بدن به کار می‌رود. به عنوان پوشاننده زخم توان نگهداری محیط مرطوب را در زخم داشته که می‌تواند جلوی ورود باکتری‌های بیماری زا را به محل زخم بگیرد و سبب تسریع ترمیم زخم شود [۱۳]. مزیت استفاده از باکتری‌ها در تولید آلژینات نسبت به جلبک های قهوه‌ای توانایی دستکاری ژنتیکی در باکتری‌ها است که با تغییرات ژنتیکی بتوان به انواعی از آلژینات دستکاری شده ژنتیکی با توانایی خاص در کاربردهای دارورسانی دست یافت [۱۴].

در گروه پانسمان‌های سنتی در طب سنتی از عسل و عصاره‌های گیاهی نظیر سیر، عصاره زردچوبه، دارچین و مواد طبیعی گوناگونی برای ترمیم زخم‌ها استفاده می‌شود. خارشتر یا آدور با نام علمی *Alhagi maurorum* گیاهی است پایا از خانواده باقلائیان یا Fabaceae و یکی از بنشن‌ها بشمار می‌رود [۱۵]. بررسی‌ها حاکی از حضور انواعی از اسیدهای چرب و استرول‌ها، کومارین‌ها، آلکالوئیدها و ویتامین‌ها در عصاره گیاه خارشتر می‌باشد. دوازده نوع فلاوونوئید، انواعی از گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، استروئیدها، فلوباتانین‌ها، ترپنوئیدها و آنتراکوئینون در عصاره برگ و ریشه گیاه مذکور موجود می‌باشد این درحالی است که گل‌های این گیاه فاقد بسیاری از این ترکیبات هستند. در عصاره بوتانولی حاصل از گیاه خارشتر حداقل ۶ نوع مختلف از فلاوونوئیدها جداسازی شده است که شامل کائمپفرول، کاتکین، کوئریستین و مشتقاتی از آن می‌باشند. دو فلاوونوئید کاتکین و کوئریستین نقش مؤثری در فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه مذکور دارند. مطالعات فیتوشیمیایی نشان داده است که استرول‌های غیرمعمول، تری ترپن‌ها، کربوهیدرات‌ها، آلهاجیتین و آلهاجیدین در عصاره گیاه وجود دارد. همچنین گزارش شده است که عصاره کامل خارشتر به دلیل حضور این ترکیبات پیچیده دارای خواص ضد سرطانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد آلرژی، ضد ویروسی و ضد لخته نیز می‌باشد. برای مثال فلاوونوئیدهای متنوع این گیاه سبب اثرات ضد سرطانی و تانن‌های گیاه دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد ویروسی می‌باشد [۱۵].

برخی از گزارش‌ها حاکی از کاربرد همزمان چند هیدروژل با یکدیگر به عنوان پوشاننده زخم می‌باشند. برای مثال ترکیب آلژینات، چیتوزان و پلی گوتامیک اسید در درمان زخم دیابتیک در مدل موش صحرایی توسط Lee در سال ۲۰۱۲ به کار گرفته شد [۱۶]. همچنین Tabata و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی ژل‌های ترکیبی از آلژینات و هپارین در افزایش آنژوژنز پس از افزودن فاکتور رشد فیبروبلاست پرداخته‌اند [۱۷]. با این حال تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر همزمان هیدروژل آلژینات به عنوان نوعی از پانسمان مدرن و عصاره خارشتر به عنوان نوعی از پانسمان سنتی انجام نشده است. مطالعه حاضر ابتدا به بررسی تولید پلیمر آلژینات توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* و تولید هیدروژل از پلیمر آلژینات پرداخته است که پس از تهیه عصاره آبی از گیاه خارشتر و بررسی اثرات سمیت سلولی آن در کشت سلول، به بررسی اثر التیام‌بخشی هیدروژل آلژینات حاوی دوز غیر سمی از عصاره گیاه خارشتر در زخم‌های جلدی موش صحرایی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها

این مطالعه توصیفی مقطعی مابین سال‌های ۹۵ تا ۹۶ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود بر روی ۱۹ جدایه از *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از نمونه‌های زخم بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان امام رضا (ع) مشهد انجام شد.

آزمون‌های شناسایی

تایید هویت جدایه‌های *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از روش‌های استاندارد فنوتایپی و ژنوتایپی انجام شد.

آزمون‌های فنوتایپی

آزمون‌های فنوتایپی مورد استفاده شامل رنگ‌آمیزی گرم، انجام آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز و کیت شناسایی API 20 NE بودند [۱۸].

آزمون‌های ژنوتایپی

جهت آزمون‌های ژنوتایپی تعداد پنج جدایه که کلنی‌های مخاطی و موکوئیدی بهتری از لحاظ کشسانی تولید کرده بودند، انتخاب و جهت PCR و تعیین توالی بررسی شدند. پرایمرهای مورد استفاده شامل 63F (5´CAGGCCTAACACATGCAAGTC3´) و 1389R (5´ACGGGCGGTGTGTACAAG3´) بودند که ابتدا از روش جوشاندن برای استخراج DNA از نمونه‌ها استفاده شد و سپس PCR طبق پروتوکل موجود در رفرنس مذکور انجام شد. نمونه کنترل منفی که فاقد DNA افزوده شده به آن بود به همراه سایرین در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفت [۱۹].

دمای جوش خوردن پرایمرها از طریق واکنش گرادیانت تعیین شد و پس از الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ به همراه مارکر حضور باند ۱۲۹۹ bp در زیر نور UV در کنار مارکر نشان‌دهنده صحت تولید محصول بود. مابقی محصول PCR به همراه پرایمر 63F جهت تعیین توالی یک جهته به شرکت ژن فن آوران ارسال شد و توالی‌های به دست آمده در برنامه BLASTn در سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) با توالی‌های موجود برای باکتری‌ها مقایسه شد و درنهایت نمونه‌ها از نظر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تایید نهایی شد [۱۹].

تولید آلژینات

جهت تولید آلژینات توسط جدایه‌های تایید شده *Pseudomonas aeruginosa* در محیط مکانکی آگار با ۲٪ گلیسرول جهت تولید پلیمر آلژینات کشت داده شدند و سپس به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵ ^{o}C انکوبه شدند [۲۰].

استخراج آلژینات

جهت استخراج آلژینات و ایجاد پودر خشک از آن رشد سطحی یکی از جدایه‌ها که دارای بیشترین ظاهر مخاطی بود با محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد استریل شسته شد و pH آن با اضافه کردن هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد تنظیم و روی ۸/۵ ثابت شد. مخلوط با سرعت ۵۰۰۰۰ rpm در ۵^{o}C به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد و مایع رویی یک ساعت در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در حمام بخار قرار داده شد تا باکتری‌های باقیمانده و مواد پروتئینی تخریب شود. سپس pH مخلوط با اسید استیک ۵ نرمال به ۴ یا ۵ رسید. مجدداً مخلوط با سرعت ۵۰۰۰ rpm در ۵^{o}C به مدت یک ساعت سانتریفیوژ و مایع رویی جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سه حجم اتانول سرد ۹۶ درصد و متناوباً سدیم استات ۱ درصد به مخلوط جهت رسوب آلژینات اضافه شد. درنهایت مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۷۰۰ rpmو در حرارت ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد تا رسوب موردنظر که همان آلژینات است، به دست آید. رسوب طی ۳ مرحله با الکل شستشو و جهت تبخیر الکل رسوب حاصل مدتی در معرض هوا قرار داده شد [۲۰]. سپس با استفاده از روش کربازول حضور آلژینات بررسی شد [۲۱].

تهیه عصاره آبی از گیاه خارشتر

تهیه گیاه خارشتر از اطراف شهرستان دامغان در اوایل تابستان ۹۳ از بخش‌های هوایی گیاه (عمدتاً شاخه‌ها) انجام شد. بخشی از گیاه خارشتر بعد از جداسازی از خاک به هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران، دانشکده علوم پایه فرستاده شد و پس از تایید توسط کارشناس، ابتدا مابقی نمونه به خوبی شستشو داده شد و پس از خشک شدن در محیطی خنک و به دور از نور آفتاب، ۵۰۰ گرم از نمونه آسیاب و غربال شد و ۱۰ گرم از پودر خشک آن در ۱۰۰ ml آب مقطر وارد و در دمای ۲۰°C بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. پس از فیلتراسیون نمونه توسط کاغذ صافی واتن شماره ۱، عصاره آبی به دست آمده به صورت پودر خشک توسط دستگاه فریز درایر تهیه شد [۲۲].

بررسی سمیت سلولی

برای بررسی سمیت سلولی ترکیبات بدست آمده از آزمون MTT استفاده شد. کلیه مراحل آزمون در پلیت های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شد. ترکیبات مورد استفاده شامل آلژینات خالص به دست آمده از باکتری و عصاره خارشتر بود. مراحل زیر برای عصاره خارشتر می باشد که برای آلژینات نیز تکرار شد.

در هر چاهک از پلیت کشت سلول ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست رده NIH3T3 اضافه‌سازی شد و ۲۰۰ µl از محیط کشت DMEM حاوی پنی‌سیلین-استرپتومایسین به میزان ۱ درصد و FBS ۱۰ درصد وارد شد و جهت رسیدن به تراکم تک لایه سلول‌ها، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض ۵ درصد CO_2 گرمخانه‌گذاری شد. پس از رسیدن به ۸۰ درصد رشد سلول‌ها، محیط کشت خارج شده و ابتدا سطح سلول‌ها بوسیله بافر PBS شستشو داده شد مجددا در تمام چاهک ها محیط کشت دو غلظتی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر وارد و به چاهک شماره۲، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره آبی خارشتر وارد شد. پس از مخلوط نمودن محلول عصاره آبی خارشتر در محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و به چاهک سوم افزوده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک سوم پس از به هم خوردن محیط برداشته شد و به چاهک ۴ اضافه شد. این عمل تا چاهک ۱۰ انجام شد و به این ترتیب میزان محلول عصاره آبی خارشتر در هر چاهک به ترتیب به صورت نصف بود. چاهک شماره ۱۱ تنها حاوی سلول بوده و به عنوان کنترل مثبت باقی ماند. پلیت مجدداً در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و پس از ۲۴ ساعت سمیت سلولی با استفاده از رنگ تترازولیوم تعیین شد. در این حالت رنگ تترازولیوم به میزان ۱۰ میکرولیتر با غلظت ۵ mg/ml به تمام چاهک‌ها از جمله کنترل مثبت اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، تترازولیوم از چاهک‌ها خارج شد و به میزان ۱۰۰ ماکرولیتر DMSO به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه پلیت در شیکر، کاملاً شیک شد. درنهایت میزان بقای سلولی در دستگاه ELISA reader موجود در نانودراپ در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت شد. سپس ابتدا بر اساس میزان جذب هر چاهک و مقایسه آن با کنترل مثبت، میزان IC_{50} (Inhibitory concentration %50) به دست آمد [۲۳]. درنهایت دوزی از خارشتر و آلژینات مورد استفاده قرار گرفت که در چاهک پس از IC_{50} قرار داشته و غیرسمی است.

بررسی‌های بالینی بر روی موش صحرایی

ابتدا مواد مورد آزمایش طبق نتایج به دست آمده از تست سمیت سلولی در دوزهای غیرسمی با یکدیگر مخلوط شدند و درنهایت ۳ ماده مورد استفاده که شامل ترکیب هیدروژل-عصاره خارشتر، هیدوژل و نیز عصاره خارشتر در دوزهای غیرسمی جهت بررسی‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفتند.

۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی۲۵۰-۲۰۰ گرم از موسسه انستیتو پاستور آمل خریداری شد و در مدت زمان انجام کل طرح، دمای محیط ۲±۲۲ درجه سانتی گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و میزان رطوبت ۳۰ درصد برای موش‌های صحرایی مهیا بود. به منظور تطابق موش‌های صحرایی با محیط جدید به مدت ۱۰ روز در حیوانخانه و در قفس‌هایی از جنس PVC نگهداری شدند. جهت ایجاد زخم پوستی، ابتدا موش‌های صحرایی توسط

تزریق درون صفاقی داروی کتامین زایلازین (با دوز ۵۰ mg/kg کتامین و ۱۰ mg/kg زایلازین که معمولاً بر اساس وزن حیوان تعیین می‌شود) بیهوش شدند و موهای قسمت میانی از ناحیه پشت حیوانات به طور کامل تراشیده و محل ایجاد زخم با بتادین و سپس الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد. با استفاده از یک شابلون و یک ماژیک نوک باریک زخمی مربعی شکل به ابعاد ۱/۵×۱/۵ سانتی‌متر بر روی ناحیه تراشیده شده ایجاد شد. روز جراحی، روز صفر درنظر گرفته شد. پس از ایجاد زخم موش های صحرایی به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. در هر گروه ۸ سر موش صحرایی وجود داشت. گروه اول روزانه به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر هیدروژل آلژینات در دوز غیرسمی را دریافت کردند. گروه دوم روزانه به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره خارشتر در دوز غیرسمی تعیین شده طبق مرحله قبل و گروه سوم روزانه به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر ترکیب هیدروژل-عصاره خارشتر در دوز غیرسمی به نسبت ۱:۱ را دریافت نمودند. گروه چهارم کنترل بوده و تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. روزانه تمام گروه‌ها تحت مراقبت و بجز گروه کنترل تحت تیمار قرار گرفتند. قابل ذکر است که در گروه‌های تیمار هیچ‌گونه پانسمان دیگری غیر از پانسمان مرطوب مذکور وجود نداشت [۲۴].

بررسی‌های ماکروسکوپی زخم

روند التیام زخم پوستی و درصد بسته شدن آن به صورت ماکروسکوپی در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ بوسیله کولیس اندازه گیری شد. فرمول مورد استفاده در تعیین درصد بسته شدن زخم طبق روش زیر بود:

درصد بسته شدن زخم= (سایز زخم (mm) (روز اول- روز آزمون)/ سایز زخم (mm) در روز اول) ×۱۰۰

جهت تجزیه و تحلیل آماری پس از تایید نرمال بودن داده‌ها از روش آماری آنوا یک جهته (one way ANOVA) استفاده شد [۲۵، ۲۴].

بررسی‌های میکروسکوپی زخم

درنهایت در روزهای مذکور دو موش صحرایی از هر گروه انتخاب شدند. موش‌های صحرایی با داروی کتامین زایلازین بیهوش و نمونه بافتی جهت مطالعات میکروسکوپی از محل ایجاد زخم تهیه شد. جهت تهیه نمونه‌های بافتی مذکور، نمونه به شکل مربع به ابعاد ۱/۵×۱/۵ سانتی‌متر تمام ضخامت از محل ترمیم زخم به همراه پوست سالم اطراف آن با استفاده از تیغ اسکالپل جدا شد. پس از تهیه نمونه بافتی، نمونه‌ها برای تثبیت کامل بافت به داخل فرمالین ۱۰ درصد منتقل شدند و سپس مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی معمولی بافت (هماتوکسیلین-ائوزین) رنگ‌آمیزی و در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای مورد بررسی میکروسکوپی شامل بررسی میزان آنژیوژنز، ایجاد بافت پوششی، فیبروپلازی، التهاب و حضور سلول‌های التهابی و ایجاد باندل‌های کلاژن بود. کلیه آنالیزهای آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری پس از تایید نرمال بودن داده‌ها از روش آماری آنوا یک جهته (one way ANOVA) استفاده شد [۲۶].

نتایج

آزمون‌های شناسایی

آزمون‌های فنوتایپی

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی تاییدی بر صحت حضور سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* بود.

آزمون‌های ژنوتایپی

باند موجود در موقعیت bp ۱۲۹۹ برای تمامی نمونه‌ها قابل مشاهده بود (شکل شماره ۱). در مجموع از ۵ جدایه *Pseudomonas aeruginosa* که جهت شناسایی تعیین توالی شدند، تنها سه سویه در بانک ژنی موجود بود و شناسایی شد که میزان همسانی آنها با سایر باکتری‌ها در سایت NCBI در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

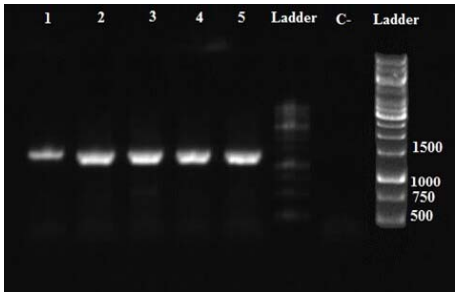
تولید آلژینات

جدایه‌های *Pseudomonas aeruginosa* در محیط مکانکی آگار با ۲ درصد گلیسرول جهت تولید پلیمر آلژینات کشت داده شدند و حضور کلنی‌های مخاطی حاوی آلژینات در نمونه‌ها مشاهده شد. شکل شماره ۲ پلیت حاوی کلنی‌های مخاطی باکتری

Pseudomonas aeruginosa را نشان می‌دهد.

استخراج آلژینات

در این مرحله یکی از جدایه‌ها که دارای بیشترین ظاهر مخاطی بود و طبق نتایج ژنوتایپی سویه‌ای از *P. aeruginosa* strain K1 بود، مجدداً کشت داده شد. پس از تولید و استخراج آلژینات، ظهور پودر سفید رنگ در لوله آزمایش نشان دهنده حضور آلژینات بود که صحت ساختار آن با روش کربازول تایید شد. شکل شماره ۳ نشان‌دهنده رسوب آلژینات در کف لوله‌های آزمایش است.

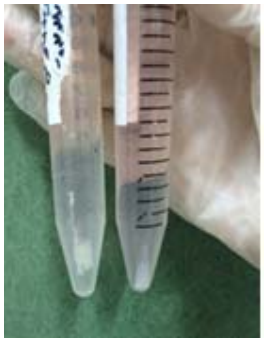


شکل شماره ۱- موقعیت باند bp ۱۲۹۹ در کنار مارکر. چاهک‌های ۱ تا ۵ مربوط به محصول PCR نمونه‌های مختلف است. چاهک C کنترل منفی و فاقد نمونه DNA می‌باشد.

جدول شماره ۱- میزان همسانی جدایه‌ها با سایر باکتری‌ها در سایت NCBI

نام جدایه	شماره دسترسی	بالاترین شباهت%
P. aeruginosa strain R4 16S ribosomal RNA gene	KU321274.1	۹۵
P. aeruginosa strain K1 16S ribosomal RNA gene	KT718770.1	۹۸
P. aeruginosa strain K2 16S ribosomal RNA gene	KT835035.1	۹۹

شکل شماره ۲- محیط مکانکی آگار حاوی ۲ درصد گلیسرول. کلنی‌های مخاطی *Pseudomonas aeruginosa* در سطح پلیت قابل مشاهده می‌باشند.



شکل شماره ۳- آلژینات استخراج شده از *Pseudomonas aeruginosa*. رسوب سفید در انتهای لوله نشان‌دهنده حضور آلژینات است.

بررسی سمیت سلولی

بر اساس نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی ترکیبات مورد آزمایش بوسیله آزمون MTT این ترکیبات در دوزهای غیرسمی رقیق شدند. با توجه به تست MTT رقیق‌سازی به اینصورت انجام گرفت: برای پلیمر آلژینات ۱ گرم از پودر خشک این پلیمر به همراه ۲ میلی‌لیتر PBS رقیق شد. برای عصاره آبی گیاه خارشتر ۰/۰۲۵ گرم پودر گیاه خارشتر با ۱ میلی‌لیتر PBS رقیق شد و برای پلیمر ترکیبی آلژینات- خارشتر، ۱ میلی‌لیتر پلیمر تهیه شده با ۰/۰۲۵ گرم پودر خارشتر ترکیب شد و با استفاده از این ترکیبات دوره درمان روی زخم پوستی موش‌های صحرایی انجام شد.

بررسی‌های بالینی در موش صحرایی

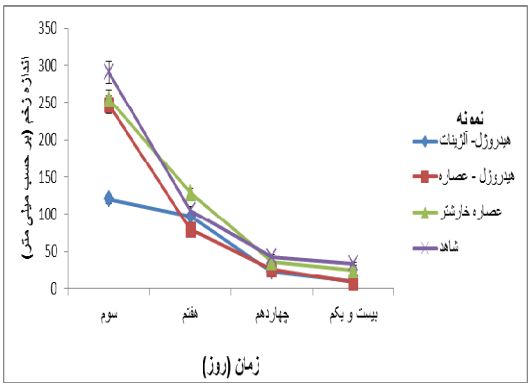
بررسی‌های ماکروسکوپی زخم

پوست آسیب‌دیده در چهار گروه هشت‌تایی، تأثیر هیدروژل آلژینات، عصاره خارشتر، ترکیب عصاره- هیدروژل و گروه کنترل تحت مطالعات ماکروسکوپی قرار گرفتند و سه فاکتور نوع نمونه، تأثیر زمان و تأثیر نوع نمونه و زمان بر اندازه‌ی زخم مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها از روش آماری آنوا یک جهته (one way ANOVA) استفاده شد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بین اندازه زخم‌ها و نمونه‌های به کار رفته رابطه معناداری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). به طور کلی درصد بسته شدن زخم‌های گروه دریافت‌کننده ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر و هیدروژل آلژینات نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود، ولی بین این دو ماده در ترمیم زخم تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

در بررسی تأثیر نوع نمونه و زمان بر اندازه‌ی زخم مشاهده شد که دو گروه تیمار شده با هیدروژل آلژینات و ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر در روز ۲۱ بیشتر از سایر گروه‌ها بر روی بهبود زخم‌ها مؤثر بوده و دارای اختلاف معنادار با سایر گروه‌ها بوده‌اند ($P < ۰/۰۵$). گروه ترکیب هیدروژل-عصاره خارشتر با تفاوت کمی بهتر از هیدروژل آلژینات به تنهایی روی بهبود زخم‌ها مؤثر بود. با این حال تفاوت آماری معناداری بین این دو گروه مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). عصاره خارشتر و گروه کنترل به ترتیب در رده‌های بعدی درمان قرار گرفتند (نمودار شماره ۱).

نتایج حاصل از این پژوهش با توجه به درصد جمع‌شدگی زخم نشان داد که در روز سوم تیمار، ۴۷ درصد از موش‌های صحرایی به هیدروژل آلژینات، در روز هفتم ۶۵ درصد موش‌های صحرایی به ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر، در روز چهاردهم ۹۱ درصد موش‌های صحرایی به هیدروژل آلژینات و در روز بیست و یکم ۹۷ درصد موش‌های صحرایی به ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر و ۹۶ درصد موش‌های صحرایی به هیدروژل آلژینات پاسخ مثبت دادند و قطر زخم‌ها کاهش یافت. در مجموع بر اساس آنالیز آماری اثر بخشی ترکیب هیدروژل-عصاره خارشتر و نیز هیدروژل آلژینات به تنهایی نسبت به سایر تیمارها بیشتر و تفاوت معناداری با سایر گروه‌ها داشت ($P < ۰/۰۵$). جدول شماره ۲ نشان‌دهنده درصدهای به دست آمده می‌باشد.



نمودار شماره ۱- تأثیر نوع نمونه و زمان بر اندازه زخم (mm)

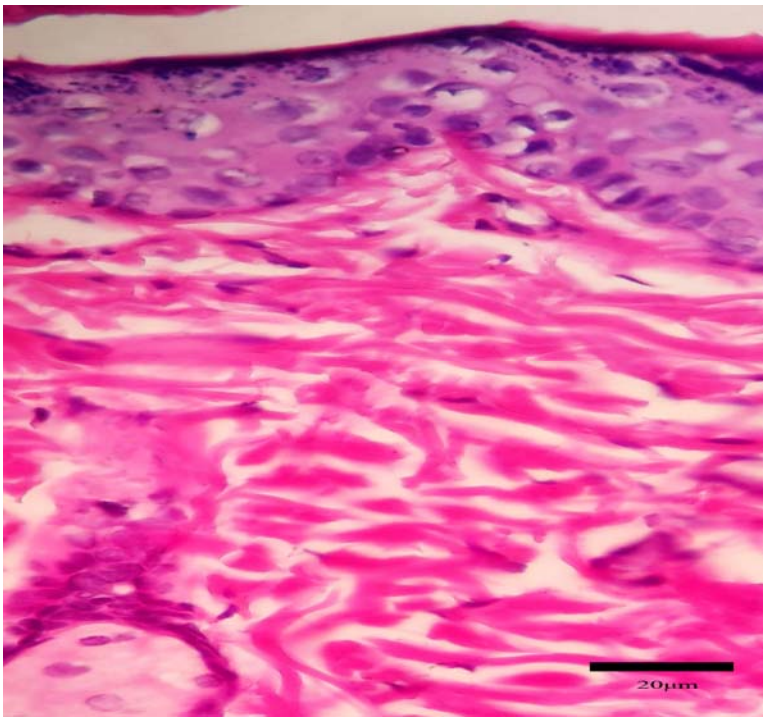
جدول شماره ۲- درصد جمع‌شدگی زخم (mean% ± SEM)

گروه/روز	۲۱	۱۴	۷	۳
هیدروژل آلژینات	۰/۲±۹۶	۰/۶±۹۱	۰/۳±۵۷	۰±۴۷
هیدروژل- عصاره	۰/۲±۹۷	۰/۵±۸۹	۰±۶۵	۰/۱±۹
عصاره خارشتر	۱±۹۴	۰±۸۴	۰±۴۳	۰±۱۳
کنترل	۰/۱±۹۰	۰/۱±۸۵	۰/۳±۵۴	۰/۶±۲۹

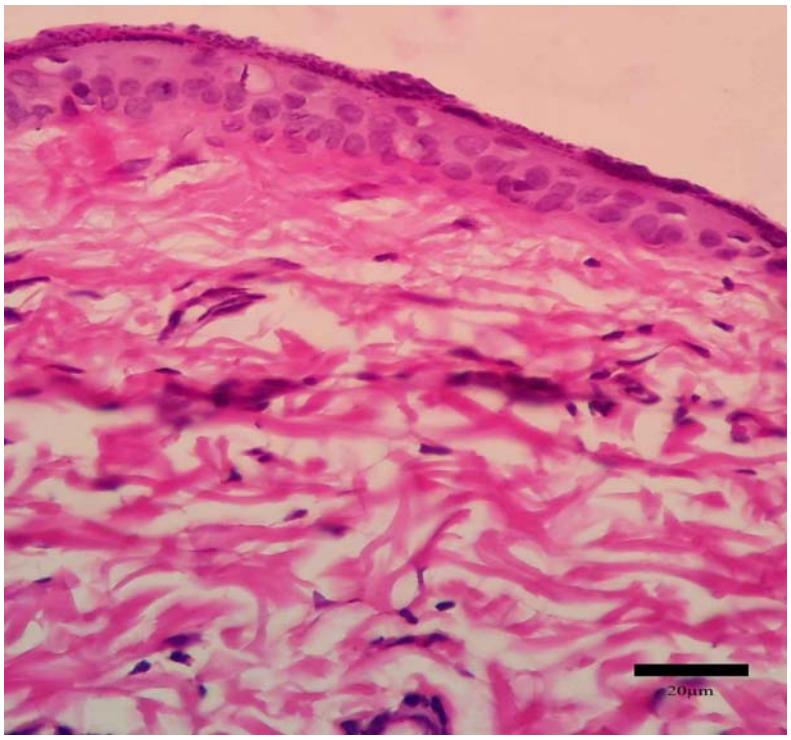
بررسی‌های میکروسکوپی زخم

درخصوص مطالعات بافت‌شناسی در کل، کاهش اندازه زخم متاثر از کاهش میزان التهاب و پیشرفت ترمیم زخم بود و یافته‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی در این مطالعه بیانگر تأثیر مثبت هیدروژل آلژینات، عصاره خارشتر و ترکیب این دو در روند ترمیم زخم پوستی موش صحرایی بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیشترین موش های صحرایی نسبت به هیدروژل آلژینات در روز بیست و یکم (۹۶ درصد) و روز چهاردهم (۹۱ درصد) پاسخ مثبت دادند. تأثیر هیدروژل آلژینات بر روی زخم نسبت به بقیه نمونه‌ها در روز سوم ۴۷ درصد مثبت بود و در این گروه‌ها از روز هفتم تقریباً به میزان تأثیر هیدروژل آلژینات رسید. طبق یافته‌های میکروسکوپی، در گروه هیدروژل آلژینات در روز ۷ بافت پوششی به صورت کامل ولی نازک تشکیل شد و در روز ۲۱ نیز باندل‌های ضخیم کلاژن قابل مشاهده بودند. گروه ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر در روز ۷ باندل‌های کلاژن به شکل مناسب و با ضخامت زیاد مشخص است. همچنین بافت پوششی تشکیل شده، از میزان آنژیوژنز و سلول‌های التهابی کاسته شده است. ۱۴ بافت پوششی کامل و دارای لایه شاخی بود و ضخامت باندل‌های کلاژن مناسب و طبیعی بود. در روز ۲۱، در گروه مذکور بافت پوششی با ضخامت مناسب قابل رویت بوده و ناحیه درم حاوی بافت متراکم نامنظم با ضخامت مناسب است. باندل کلاژن تیپ ۱ کاملاً مشخص می‌باشند (شکل‌های شماره ۴ و ۵). در گروه عصاره خارشتر در روز ۱۴ بافت پوششی تازه تشکیل شد و قابل مشاهده بود و در روز ۲۱ رشته‌های کلاژن نسبتاً قطور مشاهده شدند. در گروه کنترل در روز ۱۴ بافت پوششی با ضخامت خیلی کم تشکیل شد و در روز ۲۱ باندل‌های کلاژن تقریباً مناسب بودند.

گرچه در طی بررسی‌های ماکروسکوپیک زخم تفاوت معناداری میان دو گروه هیدروژل آلژینات و ترکیب هیدروژل آلژینات- عصاره خارشتر مشاهده نشد ($P < ۰/۰۵$)، لیکن بررسی‌های میکروسکوپیک زخم حاکی از اثرات میکروسکوپی بیشتر گروه ترکیب هیدروژل آلژینات- عصاره خارشتر بوده است.



شکل شماره ۴- فتومیکروگراف پوست موش صحرایی، گروه ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر، روز ۷ (H&E×۴۰۰)



شکل شماره ۵- فتومیکروگراف پوست موش صحرایی، گروه ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر، روز ۲۱ (H&E×۴۰۰)

بحث

همان‌گونه که در مقدمه آمده است، امروزه گرایش جهت استفاده از پانسمان‌های مرطوب که رطوبت زخم را حفظ نمایند، از ورود باکتری‌ها به دلیل شبکه سه بعدی خود به محل زخم جلوگیری کنند و به ترمیم راحت‌تر زخم بپردازند، مورد توجه قرار گرفته است که از دسته پانسمان‌های مرطوب مدرن انواعی از پلیمرها نظیر سلولز، هیالورونیک اسید، چیتوزان و نیر آلزینات را می‌توان نام برد [۹-۶]. دکتر وینتر در سال ۱۹۶۲ میلادی ثابت نمود که التیام و ترمیم زخم، زمانی که از یک پانسمان نگه‌دارنده رطوبت استفاده می‌شود (محیط مرطوب) بسیار سریع‌تر از زمانی است که زخم در معرض هوا خشک شود. بعدها صدها بررسی و تحقیق دیگر این نکته را تأیید نمودند و امروز این یک اصل بدیهی در درمان زخم محسوب می‌شود. مکانیسم‌های زیادی در این میان دخیل هستند که از آن جمله می‌توان به حضور رطوبت در تسهیل مهاجرت سلولی، تحریک فیبروبلاست‌ها برای ترشح کلاژن، تشکیل بستر مناسب برای انتقال آنزیم‌ها و هورمون‌ها مانند هورمون رشد، تحریک ماکروفاژها و غیره اشاره نمود. تا به امروز آلژینات‌های تجاری از منابع جلبکی تهیه شده است ولی باکتری‌ها برای تهیه آلژینات‌هایی با خواص یکسان و مطلوب مناسب‌تر از جلبک‌ها هستند، زیرا آلژینات‌های باکتریایی در بیوراکتور و در شرایط کنترل شده تولید می‌شود ولی آلژینات های جلبکی از جلبک‌های قهوه‌ای موجود در دریا استخراج می‌شود. در جلبک‌ها ترکیب و درصد اسیدهای اورونیک تحت تأثیر شرایط محیطی و فصلی و یا نوع و سن بافت جلبک قرار دارد. به همین دلیل آلژینات‌های باکتریایی در سال‌های اخیر مجدداً مورد توجه قرار گرفته‌اند. علاوه بر این آلژینات تولیدی توسط باکتری‌ها توانایی دستکاری‌های ژنتیکی را دارد و می توان جدا از کاربرد معمول آن، تولید آلژینات را در باکتری‌ها هدفمندتر ساخت [۱۳، ۱۰]. به همین دلیل در مطالعه حاضر به بررسی تولید و استخراج آلژینات از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* پرداخته شد. *Pseudomonas aeruginosa* باکتری بیماریزای انسانی می‌باشد که آلژینات یکی از عوامل بیماری‌زای سطحی این باکتری است و در چسبیدن باکتری به سلول‌های میزبان نقش دارد. در این پژوهش از *Pseudomonas aeruginosa* استفاده شد زیرا این باکتری نسبت به *Azotobacter vinelandii* که تولیدکننده مشابه برای آلژینات می‌باشد، دسترسی و امکان رشد بهتر و ساده‌تری دارد. علاوه بر این مطالعه حاضر سعی در کاربردی کردن باکتری‌های بیماری‌زا در صنعت داشت.

آلژینات پلیمری تولید شده از باکتری های مذکور می باشد پلیمری با قابلیت بالا در جذب آب، سازگار با بدن و قابل تجزیه زیستی می باشد که دارای توانایی بالا در کاربرد در اهداف دارورسانی و ترمیم زخم می باشد. نشان داده شده است که این پلیمر دارای توانایی در ترمیم زخم های سوختگی می باشد. پلیمر مذکور در محل زخم پایدار با خواص چسبندگی اندک به بافت است که میتوان آن را به راحتی با نرمال سالین از روی محل پانسمان جداسازی نمود [۱۴]. بنابراین *Pseudomonas aeruginosa* به عنوان یک کارخانه کوچک تولید آلژینات در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

در گروه پانسمان‌های سنتی در ترمیم زخم می‌توان به انواعی از عصاره‌های گیاهی و عسل اشاره نمود [۲۷]. در برخی از منابع اثر التیام‌بخشی خارشتر ذکر شده است ولی بررسی‌های علمی روی این خصوصیت گیاه خارشتر به خوبی انجام نشده بود، به همین دلیل گیاه خارشتر برای این پژوهش انتخاب شد. همان‌طور که در مقدمه اشاره شد، گزارش شده است که این گیاه دارای ترکیبات پیچیده می‌باشد و دارای خواص ضد سرطانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد آلرژی، ضد ویروسی و ضد لخته نیز می‌باشد [۱۵]. در پژوهش حاضر پس او تولید و استخراج آلژینات باکتریایی، سمیت ماده مذکور بررسی شد و سپس از بخش‌های هوایی گیاه خارشتر عصاره آبی تهیه و به عنوان نوعی از پانسمان سنتی در دوز غیر سمی خود به ساختمان هیدروژل آلژینات تهیه شده با آب مقطر وارد شد. هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی التیام‌بخشی پانسمان های گروه سنتی و مدرن و ترکیب آن دو با یکدیگر بوده است تا به این ترتیب ثابت شود که هنوز پانسمان‌های سنتی جایگاه مناسبی در ترمیم زخم را دارا هستند.

درخصوص بررسی‌های سمیت سلولی، رده سلولی مورد استفاده فیبروبلاست غیرسرطانی موشی بود و از آنجا که فیبروبلاست سلولی همیشگی در بافت همبند می‌باشد و تقریباً در تمامی ارگان‌های بدن از جمله ساختار پوست به کار رفته است، از این رده سلولی استفاده شد [۲۸]. نتایج سمیت سلولی حاکی از سمیت کم آلژینات و عصاره گیاهی بود. با این حال پودر عصاره گیاهی دارای سمیت می‌باشد و نتایج نشان داد که باید از پودر در درصدهای پایین‌تری استفاده نمود.

به این ترتیب بررسی‌های دوره‌ای منظم بر روی زخم‌ها حاکی از تأثیرات مثبت هر ۳ گروه نسبت به گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند و زخم به صورت خشک رها شده بود، بود. به این ترتیب نتایج نشان داد که حضور محیط مرطوب در زخم چنانچه پیش از این نیز اثبات شده بود، نسبت به خشک بودن زخم در ترمیم آن مؤثر تر عمل می‌کند. علاوه بر این مطالعات میکروسکوپی حاصل از سرعت التیام بافت با ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. مطالعات نشان داده است که خارشتر دارای خواص ضد التهابی می‌باشد که علاوه بر آن خواص ضد میکروبی نیز داراست که ترکیب این دو می‌تواند آن را کاندید مناسبی جهت ترمیم زخم کند [۱۵]. با این حال استفاده از ترکیب آن با پانسمان مدرن خواص التیام بخشی مناسب‌تری را نشان داد. به این ترتیب در تحقیق حاضر ترکیب اثرات مثبت دو پانسمان مورد مطالعه در زخم مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد که آلژینات و عصاره گیاه خارشتر دارای اثرات هم افزایی در ترمیم زخم می باشند. نتایج حاصل از بررسی تصاویر میکروسکوپی نشان داد که به تدریج و با گذشت زمان زخم قسمت‌های مختلف بافت در حال ترمیم هستند و سرعت التیام بافت با ترکیب هیدروژل- عصاره بیشتر از سایر نمونه‌ها بوده است. سرعت ترمیم بافت به ترتیب در گروه هیدروژل آلژینات، عصاره خارشتر و درنهایت گروه کنترل مشاهده شد. بنابراین با مشاهده بافت می‌توان نتیجه گرفت که هیدروژل آلژینات و ترکیب هیدروژل- عصاره می‌تواند به عنوان دارویی مناسب برای ترمیم زخم‌ها استفاده شود.

مطالعات فراوانی پیرو کاربردهای مختلف آلژینات در درمان زخم و نیز در دارورسانی وجود دارد [۱۴]. از دسته مطالعاتی که به صورت ترکیبی از این ماده استفاده شده است می توان به مطالعه Wang و همکاران اشاره نمود که به بررسی اثر التیام‌بخشی توام کمپلکس آلژینات – چیتوزان پرداخته اند و نشان داده‌اند که پس از ۱۴ روز از درمان نسبت به گروه کنترل، زخم بسته شده است و بررسی‌های میکروسکوپی نشان‌دهنده قطر مناسب لایه شاخی و حضور ضمائم پوست در نمونه گروه تیمار بوده است [۲۹]. همچنین Roh و همکاران به بررسی خاصیت التیام‌بخشی ترکیب آلژینات و سیلک پرداخته‌اند و نشان داده‌اند نسبت به ۳ گروه دیگر مورد آزمون که شامل گروه سیلک، گروه آلژینات و گروه کنترل بوده‌اند، ترکیب این دو ماده در بسته شدن زخم بهتر عمل نموده‌اند [۳۰]. Hashimoto و همکاران نیز به بررسی ترمیم زخم ترکیب آلژینات، لامینین و الاستین پرداخته‌اند و قدرت بیولوژیکی آن را در ترمیم زخم تأیید نموده‌اند [۳۱]. در تحقیق که توسط Swamy و همکاران انجام شده است عصاره برگ‌های گیاه *Embelia ribes* (برنج کابلی) در درون هیدروژل آلژینات وارد و مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل، ایجاد بافت پوششی با سرعت بیشتری رخ داده است [۳۲]. بنابراین به طور کلی در تحقیقات نشان داده شده است کاربرد ترکیبی از مواد به همراه هیدروژل آلژینات می‌تواند باعث افزایش خواص درمانی آن شود که در تحقیق حاضر نیز همین امر نشان داده شده است.

با این حال آنچه باید در نظر داشت آن است که تنها بسته شدن سریع زخم‌ها توسط پانسمان‌ها مدنظر نباید باشد بلکه اثرات آنها بر فاکتورهای مختلف موجود در محل زخم به صورت میکروسکوپی نیز باید مدنظر قرار گیرد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که اثر پانسمان‌ها باید در فاز سوم در ترمیم زخم که فاز پس از بسته شدن زخم می‌باشد نیز مورد بررسی قرار گیرد. به احتمال زیاد در تحقیق حاضر پانسمان مرطوب حاوی هیدروژل آلژینات- عصاره گیاهی خارشتر در فاز سوم بهتر عمل نموده است. مطالعات بیشتری پیرامون مکانیسم عمل دو ترکیب مورد استفاده در مطالعه حاضر در محل زخم موردنیاز است.

نتیجه‌گیری

در مجموع در مطالعات ماکروسکوپی بین اثربخشی هیدروژل آلژینات و ترکیب هیدروژل- عصاره خارشتر تفاوت معناداری وجود ندارد و نسبت به سایر تیمارها این دو نمونه ارجحیت دارند. با این حال مطالعات میکروسکوپی حاکی از اثرات مناسب تر گروه ترکیب هیدروژل آلژینات- عصاره خارشتر بود. با توجه به نتایج حاصله امید است که بررسی‌های بیشتری در رابطه با اثر ترمیمی هیدروژل آلژینات و ترکیب آن با عصاره گیاه خارشتر بر بهبود بریدگی و زخم‌های جراحی در انسان صورت گیرد.

منابع

1. Akbik D and et al. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sciences* 2014; 116 (1): 1-7.

2. Cardoso C and et al. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. *Immunobiol.* 2011; 216 (3): 409-415.

3. Cohen I.K and et al. Wound healing: biochemical and clinical aspects. *Plast. Reconstr. Surg*. 1992; 90 (5): 926.

4. Boirivant M and Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2007; 23 (6): 679-692.

5. Janis J.E., R.K. Kwon and D.H. Lalonde. A practical guide to wound healing. *Plast. Reconstr. Surg*. 2010; 125 (6): 230e-244e.

6. Bolton L. Operational definition of moist wound healing. *J. Wound Ostomy Continence Nurs*. 2007; 34 (1): 23-29.

7. Bolton L.L. 4 Moist Wound Healing from Past to Present. The Epidermis in Wound Healing. 2004, p. 89.

8. McGhee D. and et al. Hydrogel wound dressing and the method of making and using the same, 2005, *Google Patents*.

9. Thu H.-E., M.H. Zulfakar and S.-F. Ng. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *Int. J. Pharm*. 2012; 434 (1-2): 375-383.

10. Sharma G. and et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals* 2014; 42 (1): 1-7.

11. Defez C. and et al. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J. Hosp. Infect*. 2004; 57 (3): 209-216.

12. Harris A.D. and et al. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Cli. Infect. Dis.* 2002; 34 (3): 340-345.

13. Zhu J and R.E. Marchant. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* 2011; 8 (5): 607-626.

14. Lee K.Y. and D.J. Mooney. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci*. 2012; 37 (1): 106-126.

15. Ahmad N. and et al. Traditional uses and pharmacological properties of *Alhagi maurorum*: A review. *Asian Pac. J. Tro. Dis*. 2015; 5 (11): 856-861.

16. Lee Y.-H. and et al. Acceleration of wound healing in diabetic rats by layered hydrogel dressing. *Carbohydr. Polym*. 2012; 88 (3): 809-819.

17. Tabata Y. and et al. Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. *J. Biomater. Sci*. Polymer Edition, 2000; 11 (9): 915-930.

18. Ciocan O.A. and et al. Isolation and Identification of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Producing β-Lactmases (ESBL) and Carbapenemases (MBL) of Human Origin. *Bulletin USAMV Bucharest Veterinary Medicine*, 2015; 61 (2): 254-257.

19. Pourali P. and et al. Impregnation of the bacterial cellulose membrane with biologically produced silver nanoparticles. *Curr. Microbiol*. 2014; 69 (6): 785-793.

20. Anastassiou E. and et al. Alginate production by clinical nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Clin. Microbiol*. 1987; 25 (4): 656-659.

21. Knutson C.A. and A. Jeanes. A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Anal. Biochem*. 1968; 24 (3): 470-481.

22. Yu J.Q. and et al. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochem. Syst. Ecol*. 2003; 31 (2): 129-139.

23. Pourali P. et al. and Biosynthesis of gold nanoparticles by two bacterial and fungal strains, Bacillus cereus and *Fusarium oxysporum*, and assessment and comparison of their nanotoxicity in vitro by direct and indirect assays. *Electron. J. Biotechnol*. 2017; 29: 86-93.

24. Pourali P., Razavian Zadeh N and Yahyaei B. Silver nanoparticles production by two soil isolated bacteria, *Bacillus thuringiensis* and *Enterobacter cloacae*, and assessment of their cytotoxicity and wound healing effect in rats. *Wound Repair and Regen*. 2016; 24 (5): 860-869.

25. Hesaraki S and Yahyaei B. Histopathological comparison of the effects of Ceylon cinnamon, Plantago lanceolata and Flaxseed linum on experimental cutaneous wound healing process in rats. *Koomesh* 2016; 17 (3): 752-760.

26. Pourali P and Yahyaei B. Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2016; 34: 22-31.

27. Bonjar S. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *J. Ethnopharmacol*. 2004; 94 (2-3): 301-305.

28. Alberts B and et al. Fibroblasts and their transformations: the connective-tissue cell family. 2002.

29. Wang L. and et al. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2002; 63 (5): 610-618.

30. Roh D.-H. and et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2006; 17 (6): 547-552.

31. Hashimoto T and et al. Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials* 2004; 25 (7-8): 1407-1414.

32. Swamy H.K. and et al. Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of Embelia ribes Burm. *J. Ethnopharmacol*. 2007; 109 (3): 529-534.

Assessment the Wound Healing Efficiency of the Microbial Produced Alginate and the Extract of Persian Mannaplant in the Rat Wounds: the Complex of the Modern and Traditional Dressings

Pourali P (Ph.D.)[1], Khojasteh L (M.D.)[1], Fahimi B (Ph.D.)[1], Moghimian F (M.Sc.)[2], Yahyaei B (Ph.D.)[1*]

1- Department of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
2- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
*Corresponding author: Department of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
Tel: +98-23-32390077
Email: behroozyahyaei@yahoo.com

Abstract

Background: Achievement the new biocompatible wound dressing is one of the attractive areas of research.

Objective: The present study attempts to examine the healing effects of the alginate - Persian mannaplant extract in the induced rat wounds.

Methods: After culturing and detecting of the *Pseudomonas aeroginosa* strains by phenotyping and genotyping methods, the produced alginate was extracted and used for cell cytotoxicity assessment by MTT assay. 1.5×1.5 cm wounds were made on the tested rat skins. The animals were divided in 4 groups (n= 8). Three groups were equally treated for 21 days with nontoxic doses of alginate hydrogel, herb extract, and alginate hydrogel- herb extract, respectively. The forth group remained as the negative control. In different days after treatments 2 rats from each group were selected and the wound areas and the effects of each material were analyzed.

Results: Alginate was extracted from *P. aeruginosa* strain K1. Results from the macroscopic examination showed that the wound contraction percentage in alginate hydrogel and alginate hydrogel- Persian mannaplant groups had significance difference with the rest other groups (P value < 0.05). Microscopic examination showed that the best group was the one which was treated by alginate hydrogel- Persian mannaplant complex.

Conclusion: Although both materials had a good ability to heal the wounds but microscopic examinations showed that the alginate hydrogel- Persian mannaplant complex had better activity in the wound site.

Keywords: Alginate hydrogel, Persian mannaplant extract, *Pseudomonas aeroginosa*, Wound healing