مطالعه تأثیر عصاره ریسه طبیعی و کشت شده و اجزای همزیست اوسنئا آرتیکولاتا بر ترمیم زخم‌های پوستی در رت ویستار

طاهره ولدبیگی[1*]، سمیه راشکی[2]

۱- استادیار زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
*آدرس مکاتبه: ایلام، خیابان پژوهش، دانشگاه ایلام، دانشکده علوم پایه، صندوق‌پستی: ٥١٦ - ٦٩٣١٥
تلفن: ۰۹۱۲٦۰۹۲۱۹۷
پست الکترونیک: tvaladbeigi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۷ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۱۲/۷

چکیده

مقدمه: گلسنگ‌ها جهت مطالعات بیوتکنولوژی یکی از مدل‌های زیستی مناسب هستند که متابولیت‌های ثانویه متنوعی با استفاده از کشت این ویترو تولید می‌کنند. این متابولیت‌ها دارای فعالیت‌های زیستی متعددی از قبیل خواص ضدویروسی، ضدباکتری، ضدتوموری، ضدالتهابی و ضدپروتوزوآ می‌باشند.

هدف: هدف از تحقیق حاضر مطالعه اثر ترمیمی عصاره ریسه طبیعی و کشت شده و اجزاء همزیست (جلبک و قارچ به طور مجزا) اوسنئا آرتیکولاتا بر زخم‌های پوستی در شرایط این ویوو می‌باشد.

روش بررسی: نمونه‌های جمع‌آوری شده شسته و در سایه خشک شدند. ریسه و اجزای همزیست گلسنگ (پس از جداسازی) به طور جداگانه کشت شدند. کروماتوگرافی لایه نازک برای ریسه طبیعی و ریسه کشت شده و اجزای همزیست انجام گرفت. سپس عصاره متانولی ریسه‌ها و اجزای کشت شده تهیه و اثر آنها بر ترمیم زخم بررسی شد.

نتایج: عصاره متانولی ریسه طبیعی دارای فقط اسنیک اسید و کشت بافت ریسه دارای اسنیک اسید و دو ترکیب ناشناس بودند. اجزای همزیست فاقد اسنیک اسید بودند. عصاره متانولی ریسه طبیعی و کالوس آن در روند بهبود زخم مؤثر بودند. آنها اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌های تحت درمان نشان دادند. در حالی‌که عصاره متانولی کالوس قارچ و جلبک بر روند ترمیم زخم تأثیری نداشتند.

نتیجه‌گیری: تشکیل اسنیک اسید بر پایه ارتباط فیزیولوژیک قارچ - جلبک می‌باشد به همین دلیل در اجزاء به طور جداگانه یافت نشد.

گل‌واژگان: اسنیک اسید، اوسنئا آرتیکولاتا، پوست، قارچ

مقدمه

گلسنگ ارتباط بین قارچ (Mycobiont) و جلبک (Phycobiont) سبز و یا سیانوباکتر است. این ارگانیسم‌ها دارای ترکیبات شیمیایی متنوعی (مانند مشتقات پلی‌کتید، دپسیدها و دپسیدون‌ها هستند. اگرچه این ارگانیسم‌ها در داروسازی سنتی با اهمیت دانسته شده‌اند اما ارزش آنها در صنعت داروسازی مدرن به دلیل مشکلات در کشت‌های خالص (Axenic) طراحی شده و محدودیت‌های رشد نادیده گرفته شده است [۱].

در زمینه جداسازی و کشت قارچ‌های گلسنگ می‌توان به کارهای انجام شده توسط Bonnier، Ahmadjian و Behera et al. اشاره کرد [۳، ۲، ۱]. این محققین متابولیت‌های یکسانی در ریسه‌های طبیعی و همچنین در کشت بافت سه گونه *Graphis guimarana*، *G. nakanishiana* و *G. schizograpta* یافتند. توماس (Thomas) اولین کسی بود که به طور مؤثری به تأثیر محیط کشت حاوی مواد غذایی مناسب و روش‌های مطلوب کشت پرداخت [٤]. او برای اولین‌بار قارچ‌های متعددی تحت شرایط فیزیولوژیک متفاوت کشت داد. همچنین نشان داد که فاکتورهای استرس محیطی مانند خشکی و آب‌دهی متناوب و افزایش دما، رشد و تکامل گلسنگ را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این محقق همچنین موفق به سنتز دوباره *Cladonia pyxidata* از اجزای همزیست شد. بعد از آن Ahmadjian روش‌های کشت قارچ و جلبک را بهبود و اولین دستورالعمل جهت دوباره بازسازی گلسنگ از اجزای آن را ارائه نمود. گلسنگ‌شناسان زیادی به مطالعه همزیستی گلسنگ و تکامل آن بر اساس جداسازی قارچ از اسپورها و همچنین جلبک همزیست به وسیله جداسازی یک تک سلول با استفاده از میکروپیپت‌ها (Micropipette) پرداختند [٦، ٥]. با این حال در زمینه بررسی مراحل تکوینی تشکیل ریسه مطالعات اندکی انجام شده است [۷]. کشت بافت‌های گلسنگ‌های بوته‌ای مانند *Alectoria*، *Ramalina* و *Usnea* در مقایسه با ریسه طبیعی، رشد بسیار سریع‌تری دارند. این مسأله در مورد تمام گلسنگ‌ها صادق است. نوع بافت استفاده شده جهت کشت و شرایط محیط کشت در طول مراحل تکامل ریسه تأثیر قابل توجهی دارد. تکامل ریسه *Peltigera didactyla* (بخصوص در آخرین مرحله تکامل) در مقایسه با سایر گونه‌های این جنس سریع‌تر است. همچنین تکامل ریسه در صورت استفاده از سوردیا نسبت به سایر بخش‌ها، ٤ – ۲ بار سریع‌تر می‌باشد [۷۸].

گلسنگ‌ها همانند اغلب گیاهان، از دوران باستان به عنوان داروهای طبیعی استفاده می‌شوند. آنها و بعضی ارگانیسم‌های دریایی از منابع مهم ترکیبات بیولوژیکی فعال هستند. بسیاری از متابولیت‌های گلسنگی مانند دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، دی‌بنزوفوران‌ها، دی‌بنزوپیرانون‌ها، دپسیدها، دپسیدون‌ها، آنتراکوئینون‌ها، گزانتون، اسنیک اسید و پلوینیک اسید دارای فعالیت‌های زیستی آنتی‌مایکوباکتریایی، آنتی‌ویروسی، آنتی‌اکسیدانی، مسکنی، سیتوتوکسیکی، آنتی‌میکروبی و ضدقارچی هستند [۸]. کاربرد دارویی برخی از گونه‌های گلسنگ در جدول شماره ۱ آمده است. به طور کلی در زمینه اثرات دارویی گلسنگ‌های بومی ایران و حتی خواص ترمیمی زخم گونه مورد مطالعه در دنیا تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است.

زخم به عنوان اصلی‌ترین و مهم‌ترین مسأله در جراحی از دیرباز مورد توجه خاص پزشکان و فیزیولوژیست‌ها بوده است [۹]. به طوری‌که یکی از اهداف اصلی درمان در علم پزشکی در جوامع امروزی، ترمیم زخم در زمان کوتاه‌تر و با عوارض جانبی کمتر می‌باشد. به طورکلی یکی از بهترین روش‌هایی که می‌تواند ما را در رسیدن به هدف فوق یاری کند استفاده از مواد بیولوژیک خالص شده است [۱۰].

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گلسنگ

حدود یک کیلو گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا (*Usnea articulata*) در اوایل مهر ماه سال ۹۱ از جنگل‌های مازندران جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها به آزمایشگاه دانشگاه ایلام منتقل شدند. سپس چند بار با آب مقطر شستشو و در سایه خشک شدند. گلسنگ مورد نظر با استفاده از کلید استاندارد [۱۱] و همچنین مقایسه با نمونه‌های معتبر در هرباریوم برلین توسط مولف اول شناسایی شد.

جدول شماره ۱- کاربرد دارویی برخی از گونه‌ها و ترکیبات گلسنگی

گونه یا ترکیبات گلسنگ	خانواده	کاربرد پزشکی	منابع
Parmelia kamstchandalis	Parmeliaceae	درمان سیاه سرفه و اختلالات معده	۱۰
Flavoparmelia caperata	Parmeliaceae	بهبود سوختگی و پایین‌آورنده تب	۱۱
Stereocaulon foliolosum	Stereocaulaceae	درمان اختلالات ادراری و تاول‌های روی زبان	۱۲
Parmelia sulcata	Parmeliaceae	بیماری‌های عصبی	۹
Lobaria pulmonaria *Cetraria islandica*	Lobariaceae Parmeliaceae	سل ریوی	۱۳
Lobaria isidiosa	Stictaceae	بیماری‌های پوستی و قفسه سینه	۱٤
Phaeophyscia hispidula	Physciaceae	اختلالات کلیوی	۱۵
Usnea barbata	Parmeliaceae	بیماری‌های پوستی	۱٦
Heterodermia leucomela	Physciaceae	بهبوددهنده زخم	۱۲
Lecanora flavidorufa	Lecanoraceae	اختلالات خونی و قلبی درمان	۱٤
Everniastrum cirrhatum	Parmeliaceae	بهبوددهنده زخم، ضدعفونی‌کننده و درمان برونشیت	۱۲
اسنیک اسید جداسازی شده از *Usnea diffracta*	Parmeliaceae	تب‌بر، مسکن	۱۷
α- گلوکان و هتروگلیکان‌ها	Parmeliaceae	مؤثر روی ماکروفاژها	۹

جداسازی اجزای همزیست

این روش جهت جداسازی قارچ و جلبک به طور همزمان استفاده شد. به این ترتیب که ریسه‌های خشک گلسنگ (حدود ۱۰۰ – ۵۰ گرم) درون هاون خرد و با حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو شدند. سپس محلول به دست آمده تحت فرآیند گریز از مرکز با سرعت ۱/۰۰۰ x g و به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. ماده شناور دور ریخته شد و سپس ماده تحتانی در ۸/۰ میلی‌لیتر ساکارز ۰/۲۵ مولار معلق شد. چهار میلی‌لیتر از این محلول به آرامی روی ۵/۰ میلی‌لیتر از یدید پتاسیم ۸۰ درصد (v/w) درون لوله سانتریفیوژ که در ۲۰۰ x g دور به مدت ٤۵ ثانیه سانتریفیوژ شده بود قرار گرفت. در این حال قطعات هایفه و جلبک به صورت لایه گسترده‌ای درون محلول ساکارز روی KI و قطعات بزرگ ریسه رسوب و ته‌نشین شد. لایه دارای سلول‌های جلبک و هیف‌های قارچ توسط میکروپیپت جدا و روی ۵/۰ میلی‌لیتر محلول K/I قرار گرفت. سپس ۲/۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار اضافه و در دور ۸۰۰ x g به مدت ۹۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. سلول‌های جلبک به صورت لایه‌ای در حد واسط بافر فسفات و ساکارز قرار گرفتند. درحالی‌که قطعات کوچک هیف‌های قارچ درون محلول ساکارز باقی مانده و قطعات بزرگ هیف‌ها در ته لوله سانتریفیوژ رسوب کردند. سلول‌های جلبک درون فاز بینابینی توسط میکروپیپت جدا و روی ۵ میلی‌لیتر K/I قرار گرفت و سپس ۳ میلی‌لیتر فسفات به آن اضافه و در دور ۱۰۰۰ x g به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. مرحله آخر دو بار تکرار شد و محلول خالصی از سلول‌های جلبک به دست آمد. قطعات هیف‌های قارچی در مرحله دوم سانتریفیوژ جدا و محلول K/I

۸۰ درصد به محلول نهایی ٤/۰ میلی‌لیتر اضافه شد. ٤/۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار به مخلوط اضافه و در دور x g ۱۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این‌حال سلول‌های کوچک جلبک در فاز بینابینی، حد واسط بافر و محلول K/I قرار گرفت، در حالی که هیف‌های قارچی در ته لوله سانتریفیوژ رسوب کرد. آلودگی‌های جلبکی با استفاده از میکروپیپت جدا و به مخلوط آماده شده جلبک اضافه شد. این مراحل دو بار انجام گرفت و محلول خالصی از سلول‌های قارچی به دست آمد [۱۲].

کشت جلبک

از محیط کشت تربوکسیا (جدول شماره ۲) برای کشت جلبک استفاده شد [۲].

کشت جزء قارچی

از محیط کشت MYB به عنوان یک محیط استاندارد جهت مطالعه قارچ جداسازی شده در محیط مایع استفاده شد [۲].

کشت کامل ریسه

برای کشت بافت از ریسه‌های رویشی که اغلب در طول ۲ هفته جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. آلودگی‌های ریسه‌ها با استفاده از اتیل الکل ۷۰ درصد (برای چند ثانیه) و سپس شستشو با آب مقطر رفع شد. سپس مراحل ذیل انجام گرفت:

۱- ریسه‌های جمع‌آوری شده (حدود ۵ میلی‌گرم) به قطعات ۱ سانتی‌متر مربع بریده شدند.

۲- نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز با آب شسته شدند.

۳- هموژنیزه با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در شرایط استریل انجام شد.

٤- سوسپانسیون به دست آمده از منافذی با قطر ۵۰۰ فیلتر شد.

۵- قطعات کوچک حاصل از فیلتراسیون ثانویه (عبور از منافذی با قطر ۱۵۰ میکرومتر) در زیر میکروسکوپ دوچشمی برداشته شد.

٦- این قطعات در ۱۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی یا دمای ۱۸ سانتی‌گراد، به طور متناوب ۸ ساعت روشنایی و ١٦ ساعت تاریکی در طول ۷۲ ساعت و رطوبت ۸۰ - ۵۰ درصد در اتاق کشت در محیطی با pH= ۵/۰ - ۹/۵ شامل عصاره مالت - مخمر ۲ درصد (MY) و محیط کشت MBBM (MODIFIED BOLD'S BASAL MEDIUM) (جدول شماره ۳) و آگار ۲ درصد کشت شدند.

در نهایت هر ٦ - ٤ هفته یک‌بار واکشت انجام شد.

جدول شماره ۲- محیط کشت تربوکسیا

ترکیبات	مقدار	غلظت محلول استوک	غلظت نهایی
NaNO3 (Fisher BP360-500)	۱۰ mL/L	۱۰ g / mL dH2O	۲/٤۹ Mm
CaCl2·2H2O (Sigma C-3881)	۱۰ mL/L	۱ g/٤۰۰ ml dH2O	۰/۱۷ Mm
MgSO4·7H2O (Sigma 230391)	۱۰ mL/L	۳g/٤۰۰ ml dH2O	۰/۳ Mm
K2HPO4 (Sigma P 3786)	۱۰ mL/L	۳g/٤۰۰ ml dH2O	۰/٤۳ Mm
KH2PO4 (Sigma P 0662)	۱۰ mL/L	۷g/٤۰۰ ml dH2O	۱/۲۹ Mm
NaCl (Fisher S271-500)	۱۰ mL/L	۱g/٤۰۰ ml dH2O	۰/٤۳ Mm
Proteose Peptone (BD 211684)	۱ g/L		
CaCO3 (optional) (Fisher C 64)	۲۰ mg/ mL dH ۱		۰/۰۵ Mm
Proteose Peptone (BD 211684)	۱۰ g/L		
Glucose (BACTO-dextrose or Sigma D 9634)	۲۰ g/L		۰/۱۱ M

جدول شماره ۳- ترکیبات شیمیایی محیط کشت Bold's basal تعدیل یافته

ترکیبات گلسنگ	گرم در هر لیتر آب مقطر
$NaNo_3$	۱/۵
KH_2P0_4	۱
$Mgso_4.7H_2O$	۲
$Cocal_2 .2H_20$	۰/۱
Nacl	۳
K_2HPO_4	۰/۱
$Mgso_4$	٤/۰۲
H_3BO_3	۰/۰۸۲
$Feso_4.7H_2O$	۰/٤۰
$Znso_4.7H_2O$	۰/٤۳
$Mncl_2.4H_2O$	۰/۲۰
$(NH4)_6\ MoO_{24}.4H_2O$	۰/۵۷
$Cuso_4.5H_2O$	۰/۹۸
$Co(No_3)_3.6H_2O$	۱۵/۰
Na2-EDTA	۳/۱۰
آگار	۲
ساکارز	۱۰/۰

کروماتوگرافی لایه نازک

کروماتوگرافی TLC برای ریسه طبیعی و کشت بافت‌ها طبق روش [۱۳] در سه سیستم حلال شامل حلال A (بنزن: دی‌اگزان: استیک اسید، با نسبت ٤: ۲۵: ۹۰)، حلال B (هگزان: اتیل اتر: فرمیک اسید، با نسبت ۵:٤:۱) و حلال C (تولوئن: استیک اسید، با نسبت ۸۵:۱۵) انجام شد. از پلیت‌های شیشه‌ای (۲۰ × ۲۰ سانتی‌متر) با جاذب سیلیکاژل F۲٤۵ ٦۰ (مرک) و همچنین آترانورین و نورستیک تیک اسید به عنوان کنترل استفاده شد. برای مشاهده باندها از سولفوریک اسید ۱۰ درصد و گرما دادن برای چند دقیقه در ۱۱۰ سانتی‌متر و همچنین نور UV (λ۲۵٤ nm) استفاده شد. از اوسنئا آرتیکولاتا و پلتیجرا روفسنس (با ترکیبات مشخص) که از هرباریوم برلین تهیه شد به عنوان کروماتوگرافی همراه (Co-chromatography) استفاده شد.

عصاره‌گیری

ریسه طبیعی چند بار با آب مقطر شستشو و در سایه خشک و سپس در هاون چینی خرد شد. ریسه نمونه‌های کشت شده در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شد. عصاره متانولی با استفاده از سوکسله (Soxhle) تهیه شد. به این ترتیب که برای هر ۵۰ گرم نمونه یک لیتر متانول استفاده شد. عصاره‌گیری تا زمانی که درون ستون آن بی‌رنگ شد (یعنی فقط حلال باقی بماند) ادامه یافت. سپس محلول به دست آمده در دمای ٤۰ – ۳۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد [۸].

تهیه پماد

جهت تهیه پماد ۵ درصد، عصاره متانولی به نسبت وزنی (۰/۵ گرم عصاره خشک) با ٤ گرم پماد اوسرین (Euserin) و جهت تهیه پماد ۱۰ درصد عصاره به نسبت وزنی (۱ گرم عصاره خشک) با ۹ گرم پماد اوسرین مخلوط شد [۱٤].

حیوانات

در این مطالعه از ۳۰ سر رت نر با نژاد ویستار استفاده شد.

رت‌ها در دمای ۲۰ – ۲٤ درجه و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند.

نحوه ایجاد زخم

رت‌ها با استفاده از داروی بی‌هوشی دی کلرواتان بی‌هوش شدند. سپس موهای ناحیه پشتی رت با استفاده از تیغ جراحی تراشیده شد. زخمی به طول ۵ سانتی‌متر ایجاد شد. عمق زخم شامل ضخامت پوست رت و روز جراحی روز صفر در نظر گرفته شد (شکل شماره ۱) [۱۵].

رت‌ها پس از ایجاد زخم به طور تصادفی به ده گروه ذیل تقسیم شدند:

۱- گروه A: کنترل

۲- گروه B: تحت درمان با پماد ترمیم‌کننده آلفا (حاوی لاوسون و اسیدهای چرب غیراشباع)

۳- گروه C: تحت درمان با پماد ۵ درصد تهیه شده از عصاره متانولی ریسه طبیعی اوسنئا آرتیکولاتا

٤- گروه D: تحت درمان با پماد ۱۰ درصد تهیه شده از عصاره متانولی ریسه طبیعی اوسنئا آرتیکولاتا

۵- گروه E: تحت درمان با پماد ۵ درصد تهیه شده از عصاره متانولی ریسه کشت شده اوسنئا آرتیکولاتا

٦- گروه F: تحت درمان با پماد ۱۰ درصد تهیه شده از عصاره متانولی ریسه کشت شده اوسنئا آرتیکولاتا

۷- گروه G: تحت درمان با پماد ۵ درصد تهیه شده از عصاره متانولی کشت جلبک اوسنئا آرتیکولاتا

۸- گروه H: تحت درمان با پماد ۵ درصد تهیه شده از عصاره متانولی کشت قارچ اوسنئا آرتیکولاتا

۹- گروه I: تحت درمان با پماد ۱۰ درصد تهیه شده از عصاره متانولی کشت جلبک اوسنئا آرتیکولاتا

۱۰- گروه K: تحت درمان با پماد ۱۰ درصد تهیه شده از عصاره متانولی کشت قارچ اوسنئا آرتیکولاتا

روزانه از زخم‌ها قبل از تجویز هر دارو با دوربین دیجیتال عکس تهیه گردید. جهت بررسی مورفومتریک از نرم‌افزار آنالیز تصاویر فرآیند التیام زخم Motic Images 20001.2 استفاده شد. درصد بهبودی زخم طبق فرمول زیر محاسبه شد [۹].

$$\text{درصد بهبودی زخم} = \frac{\text{سطح زخم در روز A} - \text{سطح زخم در روز اول}}{\text{سطح زخم در روز اول}}$$

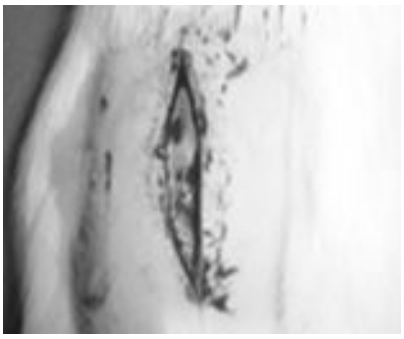
روزهای ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۰:A

نتایج

کشت

در کشت ریسه کامل بعد از ٤ هفته بافت غیرتمایز یافته‌ای تشکیل شده از ریسه و جلبک ظاهر شد. در کشت جلبک، سلول‌های جلبک جداسازی شده کاملاً بدون رشته‌های قارچی بودند. در کشت قارچ نیز، سلول‌های قارچ جداسازی شده با روش یاد شده فاقد هر نوع جلبکی بودند.

در کشت ریسه کامل اوسنئا آرتیکولاتا، محیط کشت MYE سبب رشد هر دو جزء همزیست شد. همچنین رشد همزیست‌ها در تمام نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت BBM میسر بود.



شکل شماره ۱- روز صفر جراحی

کروماتوگرفی لایه نازک

با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک وجود ترکیبات اسنیک اسید، استیک‌تیک اسید و فومارپروتوستراریک اسید در ریسه طبیعی اثبات شد. کشت بافت ریسه کامل دارای اسنیک اسید و دو ترکیب دیگر بود که امکان شناسایی آنها با استفاده از TLC نبود. در حالی‌که در کشت جلبک و قارچ اسنیک اسید وجود نداشت و کروماتوگرام جلبک دارای یک ترکیب ناشناس و کروماتوگرام قارچ دارای دو ترکیب ناشناس دیگر بود.

اثر ترمیمی ریسه طبیعی، کشت شده و اجزاء همزیست

وسعت سطح زخم در گروه کنترل در سه روز اول روند افزایشی داشت. در روزهای بعدی به‌تدریج از وسعت سطح زخم کاسته شد اما این روند آهسته بود، به طوری که زخم در روز یازدهم به طور کامل درمان نشد (شکل شماره ۲ – A).

وسعت سطح زخم در گروه B روند کاهشی داشت که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۱$). زخم در این گروه در روز یازدهم به طور کامل ناپدید شد (شکل شماره ۲ – B). روند بهبود در گروه‌های C و D نسبت به گروه کنترل بسیار سریع‌تر اتفاق افتاد، اما نسبت به گروه B افزایش معنی‌داری مشاهده نشد به طوری که زخم در هر سه گروه در روز یازدهم به طور کامل بهبود یافت (شکل شماره ۲ -C). روند ترمیم زخم در گروه E نسبت به گروه‌های A، B، C و D سریع‌تر رخ داد ($p<۰/۰۱$) به طوری‌که در روز نهم درصد بهبودی زخم ۹۶ درصد بود (شکل شماره ۲ – D) (جدول شماره ٤). ترمیم زخم در گروه F نسبت به سایر گروه‌ها سریع‌تر بود. به طوری‌که در روز نهم زخم به طور کامل بهبود یافت. عصاره متانولی اجزاء همزیست (جلبک و قارچ به طور جداگانه) فاقد اثر ترمیمی بود ($p<۰/۰۱$).

شکل شماره ۲– روند بهبود زخم در روزهای هفتم، نهم و یازدهم (به ترتیب از چپ به راست) در گروه کنترل (A)، تحت درمان با پماد آلفا (B)، تحت درمان با پماد ۵ درصد ریسه طبیعی اوسنئا آرتیکولاتا (C) و تحت درمان با پماد ۱۰ درصد ریسه طبیعی اوسنئا آرتیکولاتا (D)

جدول شماره ٤- درصد بهبودی در روزهای پنجم، هفتم، نهم و یازدهم در گروه کنترل (A)، تحت درمان با پماد آلفا (B)، تحت درمان با پماد ٥ درصد ریسه طبیعی (C)، تحت درمان با پماد ١٠ درصد ریسه طبیعی (D)، تحت درمان با پماد ٥ درصد ریسه کشت شده (E) و تحت درمان با پماد ١٠ درصد ریسه کشت شده (F)

روز / گروه	پنجم (درصد)	هفتم (درصد)	نهم (درصد)	یازدهم (درصد)
A	٣٩/٦٠	٥٢/١٢	٦٤	٨٢/٦
B	٦٢/٨٥	٨٦/١٣	٩٤/٥١	١٠٠
C	٦٥/٢٣	٨٥	٩١/٣١	١٠٠
D	٦٦/٨	٨٥/٨٦	٩١/٤٥	١٠٠
E	٧٩	٩٠	٩٦	١٠٠
F	٨٠/٤٣	٩٢/٥٩	١٠٠	١٠٠

بحث

در کشت بافت گونه مورد مطالعه در مقایسه با ریسه طبیعی ترکیبات متفاوتی سنتز شده است که با استفاده از TLC غیرقابل شناسایی بوده و جهت‌شناسی آنها به HPLC نیاز می‌باشد. دلیل وجود این ترکیبات متفاوت را به این صورت می‌توان توضیح داد: به طورکلی انواع و غلظت مواد غذایی محیط رشد یا استرس‌های ناشی از تابش uv، تغییر دما یا شرایط اسمزی محیط کشت ممکن است سبب شود که متابولیت‌های جدید و متفاوتی که در ریسه طبیعی تولید نمی‌شوند در کشت قارچ‌ها یا ریسه کشت شده سنتز شوند [١٦]. به عنوان مثال با کشت هاگ‌های قارچ *Pyrenula japonica* و *P. pseudobufonia* دو گزانتون جدید؛ ١، ٨- دی‌هیدروکسی- ٥- متوکسی-٣- متیل گزانتون و ٨،٥ ١- تری‌هیدروکسی - ٣- متیل گزانتون و همچنین با کشت هاگ‌های قارچ *Cladonia cristatella* دو مشتق جدید نفتازارین کریستازارین (٣- اتیل- ٢- هیدورکسی- ٧- متوکسی نفتازارین) و ٦- متیل کریستازارین استخراج شده است [١٧]. همچنین، منابع مختلف کربن محیط کشت نیز می‌تواند سبب تغییر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از مسیر پلی‌کتید به مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب شود. به عنوان مثال با رشد *Physconia distorta* در محیط کشت غنی از مواد غذایی، الئیک اسید، لینولئیک اسید، استئاریک اسید و مشتقات تری‌گلیسرید به صورت قطرات چربی (تا ترکیبات فنلی) روی سطح میسلیوم تولید می‌شوند [١٨].

اسنیک اسید (یکی از ترکیبات موجود در ریسه گلسنگ مورد مطالعه) که اولین بار در سال ١٨٤٤ شناسایی شد، یکی از ترکیبات دارویی مهم در گلسنگ‌ها محسوب می‌شود [١٩]. اگرچه اثرات آنتی‌بیوتیکی این اسید در درمان زخم‌های موضعی و سوختگی‌ها اثبات شده است، ولی این اسید و همچنین سایر ترکیبات ریسه باید شناسایی، خالص‌سازی و اثر آنها روی ترمیم زخم به طور جداگانه‌ای بررسی شود تا معلوم شود که خواص ترمیمی زخم به کدام ترکیب یا ترکیبات مربوط می‌شود. داده‌های حاصل از کروماتوگرافی TLC وجود اسنیک اسید را فقط در ریسه طبیعی و کشت شده اثبات می‌کند و کشت اجزای همزیست (جلبک و قارچ) فاقد این اسید است. بنابراین این اسید در زمانی که هر دو جزء با هم وجود ندارند سنتز نمی‌شود.

با توجه به یافته‌های این پژوهش ریسه طبیعی و کشت شده اوسنئا آرتیکولاتا روند ترمیم زخم پوستی را تسریع کرده و مدت زمان لازم برای ترمیم را کاهش می‌دهد. بنابراین می‌تواند جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی باشد.

تشکر و قدردانی

از زحمات دکتر Harrie Sipman (مسئول هرباریوم گلسنگ برلین، آلمان) که علاوه بر تأیید نمونه گلسنگی اوسنئا آرتیکولاتا، زمینه یازده ماه مطالعه در هرباریوم گلسنگ برلین را برای مؤلف اول فراهم نمود و همچنین پروفسور Gerhard Rambold (دانشگاه بایروت، آلمان) به دلیل همکاری در تعیین ترکیبات گلسنگ مورد نظر از روی صفحات TLC تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

1. Bonnier G. Germination des lichens sur les protonemas des mousses. *Revue general de Botanique* 1889; 1: 165 - 9.

2. Ahmadjian V. Studies on lichenized fungi. *Bryologist*. 1961; 64: 168 - 79.

3. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Optimization of culture conditions for lichen *Usnea ghattensis* G. Awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production. Food Technol. *Biotechnol*. 2006; 47 (1): 7 - 12.

4. Thomas EA. Über die Biologie von Flechtenbildnern. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz 1939, pp: 1 - 208.

5. Culberson CF, Armaleo D. Induction of a complete secondary- product pathway in a cultured lichen fungus. *Exp. Mycol.* 1992; 16: 52 - 63.

6. Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen forming as ascomycetous fungi: culturing, production of polyketides and shikimi acid derivatives and PKS gens. *Nat. Prod. Rep* 2008; 24: 188 - 200.

7. Stocker-Wörgötter E, Elix JA. Morphogenetic Strategies and Induction of Secondary Metabolite Biosynthesis in Cultured lichen-forming Ascomycota, as exemplified by *Cladia retipora* (Labill.) Nyl. and *Dactylina arctica* (Richards.) Nyl. *Symbiosis* 2006; 41 (1): 9 - 20.

8. Rankovic B, Kosanic M. Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro. *Kragujevac. J. Sci*. 2007; 32: 65 - 72.

9. William KJ. The effect of topically applied zinc on the wound healing in open wound. *J. Su. Res.* 1979; 27 (3): 62 - 97.

10. Isler H, Bauen A and Hubler M. Morphometric assessment of wound healing in rat treated with a pritein- free hemodylisis. *J. Burns*. 1991; 17: 99 -103.

11. Purvis OW, Coppins BJ, Hawksworth DL, James PW and Moore DM. The lichen flora of Great Britian and Ireland. 2nd ed. British Lichen Society Press, London. 1992, pp: 621 - 3.

12. Fontaniella B, Carmen Modina M and Vicente C. An improved method for the separation of lichen symbionts. *Phyton* 2000; 40 (2): 323 - 8.

13. Orange A, James PW and White FJ. Microchemical Methods for the Identification of Lichens. 5rd ed. British Lichen Society Press, London. 2001, pp: 42 - 82.

14. Gupta N and Jain UK. Ivestigation of wound healing activity of methanolic extract of stem bark of *Mimusops elengi* Linn. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med*. 2011; 8 (2): 98 - 103.

15. Manoj GS and Murugan K. Wound healing activity of methanolic and aqueous extracts of *Plagiochila beddomei* steph thallus in rat model. *Indian J. Exp. Biol*. 2012; 50 (8): 551 - 8.

16. Boustie J and Grube M. Lichens: a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant. Genet. Resour.* 2005; 3: 273 - 87.

17. Takenaka Y, Ikuta Y, Tani K, Nagakura N and Hamada N. Xanthones from the cultured lichen mycobionts of *Pyrenula japonica* and *Pyrenula pseudobufonia*. *Phytochem*. 1999; 52 (3): 401 - 5.

18. Nobvo H. Effect of osmotic culture conditions on isolated lichen mycobionts. *Brylogist*. 1996; 96 (4): 569 - 72.

19. Cansaran D and Kabya D. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of anatolia and antimicrobial activity. *Z. Naturforsch. C*. 2006; 61: 773 - 6.