مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره نهم،آذر ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۳۰

تولید داربست سلولز باکتریایی حاوی عصاره گیاه و بررسی اثرات التیام بخشی آن بر زخم‌های جلدی موش صحرایی

مبینا ابراهیمیان[۱]، بهروز یحیایی*[۲]، صاحبعلی منافی[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: سلولز پلیمری طبیعی با قابلیت ترمیم زخم می‌باشد که می‌توان خاصیت ترمیم زخم آن را با ترکیب نمودن با برخی از عصاره‌های گیاهی بهبود بخشید. هدف از این مطالعه بررسی تولید سلولز باکتریال حاوی عصاره گیاه زنجبیل و ارزیابی اثرات التیام بخشی آن بر زخم‌های جلدی موش صحرایی می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا *Gluconacetobacter xylinus* در محیط کشت هیسترین- اسکرام در شرایط ایستا کشت داده شد و هم چنین جوشانده گیاه *Zingiber officinale* تهیه شد. سپس تست *Microculture Tetrazolium* Test (*MTT*) برای بررسی میزان سمیت سلولی جوشانده گیاه *Zingiber officinale* انجام شد و در نهایت مراحل روند التیام بخشی بر روی زخم‌های جلدی موش صحرایی در روزهای مختلف درمان مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که لایه سلولز تولیدی محکم، بدون شکستگی و با pH= ۷/۰۰۵ بوده است که دارای قدرت ترمیم زخم ۸۰٪ می‌باشد. عصاره گیاه *Zingiber officinale* در تست MTT دارای سمیت برای سلول‌ها بود که این سمیت برای سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی یکسان بوده است. جهت ترمیم زخم از غلظت غیرسمی عصاره گیاه استفاده شد و هم چنین نتایج ترمیم زخم نشان داد که سلولز و عصاره *Zingiber officinale* می‌توانند به عنوان دارویی مناسب برای ترمیم زخم‌ها استفاده شوند.

نتیجه‌گیری: گونه *Gluconacetobacter xylinus* در التیام و بهبود زخم موثر بوده و هم چنین گیاه زنجبیل در درمان زخم‌های باز اثر معجزه‌آسایی دارد.

واژه‌های کلیدی: سلولز، التیام زخم، *Gluconacetobacter xylinus*، *Zingiber officinale*

ارجاع: ابراهیمیان مبینا، یحیایی بهروز ، منافی صاحبعلی. **تولید داربست سلولز باکتریایی حاوی عصاره گیاه و بررسی اثرات التیام بخشی آن بر زخم های جلدی موش صحرایی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۹): ۳۱-۸۲۰.

۱- دانشجو گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران
۲- استادیارگروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران
۳- دانشیارگروه مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۰۰۷۷، پست الکترونیکی: behroozyahyaei@yahoo.com، کد پستی :۳۶۱۹۹۴۳۱۸۹

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

مقدمه

سلولز یکی از فراوان ترین و ارزان ترین پلیمر کربوهیدراتی در جهان است که به طور سنتی از گیاهان یا مواد زائد آن ها استخراج می‌شود اما این پلیمر به طور طبیعی دارای لیگنین و همی سلولز می‌باشد که باید توسط فرآیندهای شیمیایی (قلیا و اسید) خالص شود. یک فرم جدید سلولز که کاربردهای نوینی دارد، سلولز باکتریایی می‌باشد که توسط برخی از باکتری ها تولید می‌گردد و اولین بار توسط Brown در سال ۱۸۸۶ گزارش شد که رشد غشای نازک بدون انشعاب با ساختار شیمیایی مشابه سلولز گیاهی را شناسایی کرد (۱).

سلولز باکتریایی پلی ساکاریدی میکروبی است که از نظر شیمیایی با سلولز گیاهی شباهت دارد. این پلیمر از واحدهای β-۱ به ۴، D-گلوکز تشکیل شده است که مشابه آن را در گیاهان نیز می‌توان یافت. با این حال به دلیل خالص نبودن سلولز گیاهی و همراهی با لیگنین و همی‌سلولز، استفاده از سلولز باکتریایی که پلیمری خالص می‌باشد، ارجحیت دارد (۲).

کاربرد سلولز خالص، چه نوع تیمار شده گیاهی و چه نوع باکتریایی آن در پزشکی، صنایع‌غذایی، صنایع‌کاغذ، محیط‌زیست و غیره می‌باشد. از کاربردهای اساسی سلولز در پزشکی می‌توان به استفاده از آن به عنوان پوشاننده زخم، پوست مصنوعی و جایگزین رگ‌های خونی اشاره نمود (۳). امروزه استفاده از سلولز تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها نسبت به نوع گیاهی در پزشکی به عنوان پوشاننده زخم ارجحیت دارد. دلیل این امر علاوه بر خالص بودن سلولز میکروبی در مقایسه با نوع گیاهی، استفاده از باکتری‌های غیر بیماری زا در تولید سلولز می‌باشد.

از سلولز تولیدی توسط باکتری‌ها پس از پاک سازی آن، در پانسمان زخم‌ها استفاده می‌شود. که به این ترتیب شبکه‌ای بر روی زخم قرار می‌گیرد که از نفوذ باکتری‌ها و آلودگی‌های محیط به زخم‌ها جلوگیری نموده و علاوه بر این با آب‌رسانی مناسب زخم‌ها، می‌تواند به سرعت باعث بهبودی زخم شود. سلولز باکتریایی با همان فرمول سلولز گیاهی، دارای ساختار سه بعدی متخلل منحصر به فرد و شبکه پیچیده‌ای از نانو الیاف است. سلولز باکتریایی تهیه شده از پلیکل های *Gluconacetobacter xylinus* یک بیوپلیمر بی‌نظیر از لحاظ ساختار مولکولی، قدرت مکانیکی و ثبات شیمیایی می‌باشد و در پانسمان زخم به منظور تسریع التیام و جلوگیری از عفونی شدن آن انجام می‌شود (۴،۵).

پانسمان‌های مرسوم اکثراً پنبه‌ای (فرم اکسید شده سلولز گیاهی) و دارای نقاط ضعفی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به خشک کردن زخم، چسبیدن به آن و نیز ایجاد حساسیت در برخی افراد اشاره کرد. این موارد باعث افزایش زمان ترمیم زخم، تعویض دردناک پانسمان و بسیاری از مشکلات دیگر برای بیمار خواهند شد. به همین دلیل سال هاست که محققین در صدد تولید پانسمانی با ویژگی‌های متمایز از انواع سنتی می‌باشند. در دهه های اخیر انواعی از پلیمرهای میکروبی و غیر میکروبی در تولید فرآورده‌های مختلف پزشکی کاربرد زیادی یافته‌اند. بسیاری از زخم‌ها نظیر زخم‌های سوختگی نیازمند پانسمان‌های طولانی‌مدت حاوی پماد می‌باشند. پانسمان‌های پنبه‌ای به دلیل عدم توانایی در حفظ آب، بعد از مدت زمان کوتاهی، آب درون پماد و زخم را جذب کرده و باعث کاهش رطوبت موضع می‌گردند که همین مسئله جذب دارو را کاهش داده و نیز باعث چسبیدن پانسمان به زخم خواهد شد. بنابراین چنین پانسمانی باید هر روز تعویض گردد. این در حالی است که سلولز باکتریایی با حفظ رطوبت درون خود نه تنها تعویض پانسمان را تسهیل کرده بلکه اثر مفیدی بر روی تکثیر سلولی خواهد گذاشت. تمامی نتایج به دست آمده در کنار ویژگی‌های منحصر به فرد سلولز باکتریایی آینده روشنی را برای تولید فرآورده‌های بیولوژیک ارزان قیمت با کاربردهای متنوع پیش‌بینی می‌کنند (۶).

Gluconacetobacter xylinus یک باکتری گرم منفی، هوازی، میله‌ای شکل است. *Gluconacetobacter* برای رشد و زنده‌ماندن به گلوکز و سایر مواد مغذی احتیاج دارد. این باکتری قادر به فتوسنتز نمی‌باشد و می‌تواند گلوکز، شکر، گلیسرول و سایر منابع آلی را به سلولز خالص تبدیل کند. برای اولین بار باکتری *Gluconacetobacter xylinus* در سال ۱۸۸۶

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

توسط Brown معرفی شد (۷). سلولز بیوپلیمر اصلی زمین است و از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. سلولز، سازنده اصلی پنبه (بیش از ۹۴٪) و چوب (بیش از ۵۰٪) می‌باشد. با توجه به محدودیت منبع اصلی سلولز که همان چوب می‌باشد، پژوهش گران را بر آن داشت تا به دنبال تامین سلولز از منابع دیگری باشند. یکی از روش‌های بسیار جالب، تولید سلولز به روش باکتریایی است. جهت این امر از باکتری‌های مختلفی بهره می‌برند که در میان آن ها *Acetobacter* و *Gluconacetobacter* بسیار مشهور بوده و مورد استفاده قرار گرفته است (۸،۹). گیاه زنجبیل دارای ساقه‌های ریشه مانند زیرزمینی است که از گیاه زردرنگ دارای رگه‌های بنفش با نام علمی *Zingiber officinal* به دست می‌آید که به خانواده Zingiberaceae، راسته Zingiberales، زیرراسته Lilianae، زیرکلاس Magnoliidae و کلاس Equisetopsida تعلق دارد (۱۰). هدف از مطالعه حاضر بررسی روند تولید اسکافلد سلولزی باکتریال که حاوی عصاره گیاه زنجبیل می‌باشد، بوده و در ادامه به بررسی اثرات التیام بخشی آن بر روی زخم‌های جلدی و باز موش‌های صحرایی پرداخته خواهد شد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی و بر اساس رعایت موازین اخلاقی انجام گرفت.

تهیه محیط کشت هیسترین-اسکرام

برای تهیه ml ۲۰۰ از محیط کشت، gr ۶/۸ محیط کشت را وزن و در ارلن ml ۵۰۰ ریخته و سپس به آن به میزان ml ۲۰۰ آب مقطر اضافه گردید. سپس به آن کمی حرارت داده تا محلول کاملا شفاف و حل شود و در نهایت در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵دقیقه جهت استریل شدن در اتوکلاو گذاشته شد.

فعال سازی سویه *Gluconacetobacter xylinus*

سویه *Gluconacetobacter xylinus* از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران با شماره PTCC 1734 خریداری شد و باید برای استفاده فعال‌سازی شود. بر روی محیط کشت هسترین_اسکرام در pH = ۶ جهت به دست آوردن باکتری، به مدت ۱۰ روز در انکوباتور کشت داده شد (۱۱،۱۲). به دلیل این که سلولز تولیدی در محیط کشت ممکن است با اندکی ناخالصی همراه باشد، سلولز تولیدی به وسیله سدیم هیدروکسید شستشو داده شد (۱۳).

تهیه جوشانده از عصاره گیاه زنجبیل

گیاه زنجبیل از بازار خریداری شد. برای تهیه جوشانده زنجبیل، ابتدا ۲۰ گرم از ساقه شسته شده و در دمای اتاق گذاشته شد تا کاملا خشک شود. ساقه خرد شده گیاه زنجبیل به وسیله هاون چینی خرد شد و به صورت قطعاتی با قطر تقریبی mm ۵-۳ در آمد. حدود ۲۰ گرم از ساقه خرد شده به وسیله ترازو توزین شد و در یک ارلن ml ۲۵۰ ریخته شد و ml ۱۰۰ آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه گردید. این مخلوط برای مدت min ۱۰ جوشانده شد. جوشانده زنجبیل با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد و در فالکون ریخته و برای استفاده های بعدی در یخچال در دمای °C ۴ قرار گرفت (۱۴).

بررسی میزان سمیت سلولی به وسیله آزمون Microculture Tetrazolium Test(MTT)

پیش از بردن لایه سلولز و عصاره گیاهی بر روی زخم، میزان دوز سمی این مواد با آزمون MTT سنجیده شد. بدین گونه که در هر چاهک از پلیت کشت سلول ۹۸ خانه‌ای که به وسیله اسیدآمینه ال- لایزینL-lysin کوت شده بود برای سلول های EPG و NIH_3T_3 به میزان ۱۰۰۰۰ سلول اضافه سازی شد و µl ۲۰۰ از محیط کشت DMEM وارد شد و جهت رسیدن به تراکم تک لایه سلول ها، پلیت در دمای °C ۳۷ در معرض ۵٪ CO_2 گرم خانه‌گذاری گردید. پس از رسیدن به ۸۰ ٪ درصد رشد سلول‌ها، محیط کشت خارج شده و ابتدا سطح سلول ها به وسیله بافر Phosphate Buffered Saline PBS شستشو داده شد مجدداً در تمام چاهک‌ها محیط کشت به میزان µl ۱۰۰ وارد و به چاهک شماره۲، µl ۱۰۰ از محلول مورد آزمون وارد شد. پس از مخلوط نمودن محلول مورد آزمون در محیط کشت، µl ۱۰۰ از آن برداشته و به چاهک سوم افزوده شد. در مرحله بعد µl ۱۰۰ از چاهک سوم پس از به هم خوردن محیط برداشته شد و به چاهک ۴ اضافه شد. این عمل

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

تا چاهک ۱۰ انجام شد و به این ترتیب میزان محلول مورد آزمون در هر چاهک به ترتیب به صورت نصف بود. چاهک شماره ۱۱ تنها حاوی سلول بوده و به عنوان شاهد باقی ماند. پلیت مجددا در $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴ h گرم خانه‌گذاری گردید و پس از ۲۴ h سمیت سلولی با استفاده از رنگ تترازولیوم تعیین گردید. در این حالت رنگ تترازولیوم به میزان ۱۰ µl با غلظت ۵ mg/ml به تمام چاهک ها از جمله شاهد اضافه و در $37^{\circ}C$ به مدت 2h گرم خانه‌گذاری گردید. بعد از ۲ h گرم خانه‌گذاری، تترازولیوم از چاهک‌ها خارج شد و به میزان ۱۰۰ µl Dimethyl Sulfoxide DMSO به چاهک ها افزوده شد و به مدت ۲۰ min پلیت در شیکر، کاملاً شیک شد. نهایتاً میزان بقای سلولی در دستگاه ELISA reader موجود در نانودراپ در طول موج ۵۴۰ nm ثبت گردید (۱۵). سپس ابتدا بر اساس میزان جذب هر چاهک و مقایسه آن با شاهد، میزان IC_{50} Inhibitory concentration % 50 به دست آمد.

بررسی اثرات آنتی‌باکتریال

پلیت محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شد. ابتدا سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا که شامل: *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* بود، طبق استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و با سوآب استریل، از باکتری‌ها بر روی محیط کشت به صورت چمنی، کشت داده شد. سپس ۳ چاهک با شعاع ۶ mm در آگار تعبیه شد و از نمونه سلولز، عصاره زنجبیل (۵۰mµ) و ترکیب سلولز- عصاره زنجبیل در داخل چاهک‌ها قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت قطر هاله شفاف عدم رشد توسط خط کش میلی متری، اندازه‌گیری و در جدول ثبت گردید.

مراحل بررسی روند التیام بخشی مواد به دست آمده بر روی زخم های جلدی موش صحرایی

برای انجام این مطالعه تعداد ۲۴ موش صحرایی بالغ ماده نژاد ویستار با وزن ۱۴۰-۲۲۰ و با سن ۱۲-۱۰ هفته خریداری شد. حیوانات شماره‌گذاری شده و به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. یک گروه به عنوان گروه سلولز، یک گروه به عنوان عصاره گیاه زنجبیل، یک گروه به عنوان ترکیب سلولز و عصاره گیاه زنجبیل و گروه آخر به عنوان کنترل مثبت می باشد. حیوانات در دمای $^{\circ}C$ ۲۰-۲۵، میزان رطوبت ۶۰-۴۰٪ و با سیکل ۱۲ ساعت خواب و بیداری نگه‌داری شدند. هر موش صحرایی به ازای هر ۱۰۰ gr وزن بدن، ۳۵ gr جیره غذایی دریافت می‌کند، و هم چنین میزان آب مصرفی آن ها در روز ۵۰ ml می‌باشد.

ایجاد زخم پوستی

قبل از شروع آزمایش، برای محاسبه و به دست‌آوردن میزان مجاز ماده تزریقی داروی بیهوشی، حیوانات توسط یک ترازو وزن شده، سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین (هیدروکلرید) ۱۰ ٪ به میزان ۷۵ mg/kg و زایلازین ۲۰ به میزان ۱ mg/kg بیهوش شدند. موهای ناحیه پشت حیوان تراشیده شده و نواحی مورد نظر ابتدا توسط محلول بتادین سپس الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شد. سپس یک برش دایره ای شکل بر روی پوست ناحیه پشت به ابعاد ۱/۵ × ۱/۵ سانتی متر ایجاد گردید.

بررسی روند تیمار زخم پوستی

روزانه بر روی زخم های ایجاد شده در گروه سلولز ml ۰/۲ آب مقطر، گروه زنجبیل و ترکیب سلولز-زنجبیل به میزان ml ۰/۲ عصاره زنجبیل و در گروه کنترل مثبت نیز به میزان g ۰/۰۵ عسل (زیرا عسل در درمان های سنتی و مطالعات جدید به عنوان داروی التیام بخش بکار رفته است و در درمان موثر است به همین دلیل در کنترل مثبت از عسل استفاده شده است تا عملکرد عسل و زنجبیل با یکدیگر سنجیده و مقایسه شود) مالیده شد.

مطالعه و ارزیابی بافت شناسی زخم

برای بیهوش کردن موش های صحرایی از کلروفرم استفاده شد و در روزهای ۳،۷،۱۴ یک نمونه بافتی به شکل دایره، تمام ضخامت از محل ترمیم زخم به همراه پوست سالم اطراف آن با استفاده از تیغ اسکالپل شماره ۱۰ جدا گردید. پس از تهیه نمونه بافتی، نمونه‌ها برای تثبیت کامل بافتی به داخل فرمالین ۱۰ ٪ به مدت ۲۴h منتقل شد و سپس موش های صحرایی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

مزبور حذف شدند. انجام مطالعات آسیب‌شناسی بافتی در زمینه‌های بررسی تشکیل بافت پوششی، ضخامت رشته‌های کلاژن، میزان فیبروپلازی و سلول های التهابی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بررسی اثرات آنتی باکتریال با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون ANOVA آنالیز گردید.

ملاحظات اخلاقی

تحقیق حاضر توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود تاییدشده است(کداخلاق IR.IAU.SHAHROOD.REC.1396.23).

نتایج

نتایج تولید سلولز

سویه *Gluconacetobacter xylinus* روی محیط کشت هیسترین-اسکرام برده شد و به مدت ۱۰ روز در انکوباتور قرار گرفت.

نتایج خالص‌سازی سلولز و شستشو توسط سدیم هیدروکسید

در خالص سازی، لایه سلولز تولیدی؛ محکم، بدون شکستگی و با pH= ۷/۰۰۵ به دست آمد.

نتایج کشت سلولی

بر اساس نتایج حاصل از کشت سلولی، IC50 برای عصاره زنجبیل در مورد هر دو رده مورد استفاده، یکسان بوده و در چاهک شماره ۲ بوده است. این امر نشان می‌دهد که اولاً عصاره زنجبیل غلیظ است و باید رقیق شود، ثانیا این عصاره، خاصیت سلول‌کشی مساوی برای هر دو رده سرطانی و غیرسرطانی دارد. در جداول (۱) و (۲) و نیز در شکل های (۱) و (۲) جذب نوری و چاهک مربوط به IC50 مشخص شده است. نهایتاً cc ۱ از عصاره زنجبیل با cc ۱۴ سرم فیزیولوژی، رقیق‌سازی شد و جهت مطالعات ترمیم زخم مورد استفاده قرار گرفت.

شکل ۱: نتایج تست MTT برای سلول های رده فیبروبلاست سرطانی

جدول ۱: میزان جذب نوری به دست آمده برای تست MTT برای سلول‌های رده فیبروبلاست سرطانی

چاهک جذب نوری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
ردیف ۱	۰/۰۱۳	IC_{50}۰/۱۳۹	۰/۲۰۶	۰/۳۱۵	۰/۳۲۰	۰/۳۲۶	۰/۵۲۲	۰/۳۷۴	۰/۳۲۶	۰/۳۲۲
ردیف ۲	۰/۰۰۹	۰/۱۶۶	۰/۳۰۵	۰/۲۲۹	۰/۳۰۱	۰/۳۴۵	۰/۵۳۳	۰/۵۱۸	۰/۳۸۰	۰/۳۷۷

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

شکل ۲: نتایج تست MTT برای سلول‌های رده فیبروبلاست غیرسرطانی

جدول ۲: میزان جذب نوری به دست آمده برای تست MTT برای سلول‌های رده فیبروبلاست غیرسرطانی

چاهک جذب نوری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
ردیف ۱	۰/۲۵۰	IC_{50} ۰/۷۰۱	۱/۰۶۱	۰/۹۲۷	۰/۸۶۴	۰/۹۸۵	۱/۱۲۹	۱/۰۲۹	۱/۰۴۳	۰/۹۵۵
ردیف ۲	۰/۳۶۳	۰/۶۵۱	۰/۷۳۵	۰/۷۸۰	۰/۹۰۸	۰/۹۹۸	۰/۹۰۲	۰/۹۹۰	۱/۱۳۴	۱/۰۰۹

نتایج بررسی اثرات آنتی باکتریال

همان گونه که در بخش روش‌ها عنوان شد، از باکتری‌های بیماری‌زای *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* جهت بررسی خواص آنتی‌باکتریال استفاده شد و نمونه‌های سلولز، عصاره زنجبیل و ترکیب سلولز- عصاره زنجبیل بر روی آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاکی از عدم وجود اثرات آنتی‌باکتریال هر ۳ ماده مذکور بر روی باکتری‌های مورد مطالعه بود. لذا بر این اساس که نتیجه آنتی‌باکتریال بطورکل منفی شد، از نرم‌افزار آماری استفاده نگردید.

نتایج بررسی روند التیام بخشی پلیمر تولیدی بر روی زخم های جلدی موش صحرایی

پوست آسیب‌دیده در چهار گروه شش‌تایی، تاثیر سلولز، عصاره زنجبیل، ترکیب سلولز/ عصاره زنجبیل و گروه کنترل مثبت (عسل) تحت مطالعات ماکروسکوپی قرار گرفتند. در این پژوهش همه موش‌های صحرایی تحت تاثیر مواد ذکر شده قرار داده شدند. موش‌های صحرایی در روزهای ۳،۷،۱۴ درمان بررسی شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بین اندازه زخم‌ها و نمونه‌های به کار رفته رابطه معناداری با استفاده از آزمون Anova و آزمون تکمیلی Tukeyوجود دارد($p<0.05$). در گروهی که زخم‌هایشان در معرض سلولز قرار گرفت، اندازه زخم نسبت به نمونه‌های دیگر کوچکتر شد($p<0.05$). هم چنین نتایج نشان داد که بین اندازه زخم‌ها و گذشت زمان رابطه مستقیمی وجود دارد به طوریکه با گذشت زمان اندازه زخم‌ها نیز کوچکتر شد($p<0.05$).

بر اساس فرمول، درصد مساحت و یا بهبود زخم در روز x = (مساحت زخم در روز اول ـ مساحت زخم در روز x) ÷ مساحت زخم در روز اول × ۱۰۰، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در روز سوم ۲۶ ٪ از موش های صحرایی به سلولز، در روز هفتم ۶۶ ٪ موش های صحرایی به عصاره زنجبیل و در روز چهاردهم ۸۰ ٪ موش‌های صحرایی به سلولز پاسخ مثبت دادند و قطر زخم‌ها کاهش یافت. در مجموع اثربخشی سلولز نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود($p<0.05$)(جدول ۳).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

جدول ۳: درصد بسته شدن زخم‌های جلدی موش صحرایی در روزهای نمونه‌گیری با استفاده از آزمون ANOVA

روزها گروه ها	۳	۷	۱۴
سلولز	٪ ۲۶	٪ ۳۳	٪ ۸۰
عصاره زنجبیل	٪ ۱۳	٪ ۶۶	٪ ۷۳
ترکیب سلولز-عصاره زنجبیل	٪ ۲۰	٪ ۴۶	٪ ۶۶
کنترل مثبت (عسل)	٪ ۰	٪ ۳۳	٪ ۶۶

بحث

این مطالعه به منظور تولید سلولز باکتریایی جهت بررسی اثر التیام‌بخشی در مدل زخم پوستی موش صحرایی انجام گرفت. در این مطالعه ابتدا *Gluconacetobacter xylinus* بر روی محیط کشت هیسترین- اسکرام انتقال داده شد. بعد از مدت 10-8 روز لایه سلولز تولید شد. سپس لایه سلولز تولیدی در محلول NaOH ۰/۲۵ mol/L قرار داده شد و به وسیله آب مقطر استریل تا رسیدن به pH = ۷ شستشو داده شد. هم چنین جوشانده از عصاره گیاه زنجبیل تهیه شد که پیش از بردن لایه سلولز و از عصاره گیاه زنجبیل بر روی زخم، برای سنجیدن میزان دوز سمی این مواد، آزمون MTT انجام شد.Muangmman و همکارانش، پانسمان میکروبی را در زخم سوختگی بررسی نمودند. لایه سلولز میکروبی را فقط یک بار بدون تعویض پانسمان روی زخم سوختگی صورت به کار بردند. پروسه سالم سازی تا اپیلیزیشن کامل روی صورت را برای دو هفته مشاهده کردند. آنها پی بردند در طی دوره درمان بیماران هیچ واکنش آلرژی و التهابی به این پانسمان نشان ندادند و هیچ مدرکی از حضور باکتری‌های بیماری زا را نیز نیافتند که این نتایج با مطالعه اخیر هم خوانی دارد و در این مطالعه نیز، هیچ واکنش آلرژی و التهابی مشاهده نشد (۱۶). Kwak و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که باکتری‌های گونه *Acetobacter* تولید کننده سلولز، در درمان زخم‌های موش صحرایی موثر می‌باشد. آنها به بررسی اثر ترمیم و آنژیوژنز Angiogenes غشا سلولزی باکتری، علیه عفونت‌های زخم پوستی موش صحرایی در مدت ۱۵ روز پرداختند. آنها دریافتند که باکتری واجد غشا سلولز ممکن است روند بهبود زخم در پوست سوختگی از موش صحرایی را از طریق تنظیم رگ‌زایی و تشکیل بافت همبند تسریع بخشد که این نتایج با مطالعه اخیر هم خوانی دارد (۱۷). Fu و همکارانش از سلولز باکتریایی به وسیله یک روش تخمیری چندلایه برای تعمیر بافت پوست استفاده کردند. روی پشت ۳۵ موش صحرایی یک زخم پوستی با ضخامت کامل ایجاد کردند. زخم‌ها به ترتیب با دو گروه گازی و دو گروه سلولز باکتریایی و سه گروه پیوند پوست درمان شدند. نتایج حاصل از هیستولوژی، احیای قابل توجه بافت تازه و شکل‌گیری رگ را در منطقه زخم در گروه سلولز باکتریایی روز هفتم در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان داد و هم چنین نتایج پاتولوژی، سالم‌سازی سریعتر و بهتر و پاسخ التهابی کمتر در گروه سلولز باکتریایی نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد که این نتایج با مطالعه حاضر هم خوانی دارد و در این مطالعه نیز، گروه سلولز باکتریایی در روز آخر نسبت به مابقی گروه‌های دیگر بهتر جواب داده است که باعث سالم‌سازی و بسته‌شدن سریع تر زخم شده است (۱۸).

Oscar و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به بررسی باکتری‌های مولد سلولز در ترمیم زخم پای ۲۴ بیمار پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری‌های *Acetobacter Xylinium* مولد تولید سلولز، در درمان

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

عفونت‌های زخم بیماران در مدت زمان درمان طولانی موثر

می‌باشد که این نتایج با مطالعه ما هم خوانی دارد (۱۹). Bottan و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که تماس سطح بسترهای سلولز باکتریایی با سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت Keratinocyte اثرات مثبتی در فعالیت‌های سلولی در بهبود پوست زخمی شده و بازسازی بافت آسیب‌دیده دارد. استقرار سطح بسترهای سلولز باکتریایی در حیوانات مدل آزمایشگاهی به عنوان پانسمان زخم پوستی و یا قرار دادن بر روی بدن موش صحرایی، ثابت نمود که از پایداری خوبی برخوردار بوده و میزان پاسخ التهابی نسبت به ترکیبات دیگر در یک دوره ۲۱ روز کم است، در نهایت در این مطالعه ثابت شده است که سطح سلولز در بازسازی و التیام سطح زخمی پوست اثرات مفید داشته است که این نتایج با مطالعه حاضر هم خوانی دارد و در این مطالعه نیز، گروه سلولز در بازسازی و التیام رخمی پوست اثرات مفیدتری داشته است (۲۰). پورعلی و همکاران به مطالعه روند ترمیم زخم توسط سلولز باکتریایی در pH های مختلف پرداختند و نشان دادند که در صورت تغییر pH لایه سلولزی از اسیدی به سمت قلیایی، میزان ترمیم زخم کاهش یافته به طوری که بهترین pH جهت ترمیم زخم حالت اسیدی بوده است (۲۱). هم چنین آن‌ها با استفاده از نانوذرات نقره بیولوژیکی توان ضد باکتریایی سلولز تولیدی را در ترمیم زخم افزایش داده‌اند (۲۲). گیاه زنجبیل ترکیبات فعالی مثل جینجرول، شوگائول و کورکومین را دارد که به خوبی می‌توانند تولید پروستاگلاندین‌ها، نیتریک‌اکسید و حتی اینترلوکین‌های درگیر در التهاب را مهار کنند. بر همین اساس، این گیاه روند درمان بسیاری از جراحات پوستی از جمله زخم‌ها، بریدگی‌ها، پارگی، خراش‌ها و سوختگی‌های معمولی و سوختگی با اشعه‌های مضر، سوزش‌ها، گزیدگی‌های سمی را تسکین و التیام می‌بخشد. در درمان سوختگی اثر معجزه‌آسایی دارد و درد ناشی از سوختگی را کاهش می‌دهد (۲۳).

با توجه به مقالات موجود از جمله Lynd و همکارانش در سال ۲۰۰۲، عنوان کرده‌اند که سلولز فاقد خاصیت آنتی‌باکتریال است که با نتایج حال حاضر کاملاً مطابقت دارد (۲۴). با توجه به این که برخی از مقالات مانند Norajit و همکارانش در سال ۲۰۰۷، عنوان کرده‌اند که زنجبیل دارای خاصیت آنتی‌باکتریال است، تحقیق حاضر این خاصیت را برای عصاره زنجبیل نشان نداد (۲۵). احتمالاً به دلیل دوز غیرسمی مورد استفاده از عصاره زنجبیل است که این دوز به دلیل رقیق شدن، فاقد هر گونه اثر سمی بر روی سلول‌های یوکاریوت (نتایج کشت سلول) و سلول‌های پروکاریوت (نتایج آنتی‌باکتریال) می‌باشد. همان طور که نشان داده شد عصاره زنجبیل بر روی سلول‌های کشت سلول سرطانی و غیر سرطانی به صورت یکسان عملکرد داشت که این حاکی از عدم خواص ضدسرطانی این عصاره است چنان چه از غلظت‌های بالاتر (دوز سمی) از عصاره برای خواص آنتی‌باکتریال استفاده شود، احتمال سمیت برای باکتری‌ها را خواهد داشت ولی به دلیل این که در تحقیق حاضر، از دوزهای بالاتر جهت خواص ترمیم زخم استفاده نشده است، بررسی این دوزها جهت خواص آنتی‌باکتریال بی مورد است.

بر اساس مطالعات گذشته نشان داده شده که عصاره‌های گیاهی با داشتن خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی و هم چنین فرآورده‌های بیولوژیک باکتریایی به دلیل افزایش فیبروپلازی و بازسازی سریع اپیتلیوم توانسته‌اند سبب تسریع روند التیام گردند (۲۶،۲۷). نتایج این مطالعه در مورد التیام زخم پوستی موش صحرایی نشان داد که بین اندازه زخم‌ها و گذشت زمان رابطه مستقیمی وجود دارد به طوری که با گذشت زمان اندازه زخم‌ها نیز کوچکتر می‌شود. هم چنین نتایج نشان داد که بین اندازه زخم‌ها و نمونه‌های به کار رفته رابطه معناداری وجود دارد. در گروهی که زخم‌هایشان در معرض سلولز و عصاره زنجبیل قرار گرفت، اندازه زخم‌هایشان نسبت به نمونه‌های دیگر کوچک تر شد و هم چنین مشاهده شدکه گروه تیمار شده با گروه سلولز و زنجبیل و تقریبا گروه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

سلولز-زنجبیل و کنترل مثبت به یک اندازه در روز چهاردهم بر روی بهبود زخم ها موثر بوده اند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در روز سوم ۲۶٪ از موش‌های صحرایی به سلولز، در روز هفتم ۶۶٪ موش‌های صحرایی به عصاره زنجبیل و در روز چهاردهم ۸۰٪ موش‌های صحرایی به سلولز پاسخ مثبت دادند و قطر زخم‌ها کاهش یافت. در مجموع اثربخشی سلولز و عصاره زنجبیل نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که به کارگیری گونه *Gluconacetobacter xylinus* که توانایی تولید سلولز را دارد، در التیام و بهبود زخم بسیار موثر است و هم چنین گیاه زنجبیل به دلیل ترکیبات فعالی (مثل جینجرول، شوگائول و کورکومین) که دارد در درمان زخم‌های باز اثر معجزه‌آسایی دارد و درد ناشی از آن را کاهش می دهد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل پایان نامه خانم مبینا ابراهیمیان با عنوان "تولید بیولوژیکی پلیمر سلولز به وسیله Gluconacetobacter xylinus، تهیه اسکافلد از سلولز و ایجاد ترکیب با عصاره گیاهی زنجبیل و بررسی اثرات آنتی‌باکتریال و التیام‌بخشی آن بر زخم‌های جلدی موش صحرایی"، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود می باشد که حمایت مالی آن توسط حوزه معاونت پژوهشی انجام پذیرفته است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1- Dubey V, Saxena C, Singh L, Ramana KV, Chauhan RS. ***Pervaporation of binary water–ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane.*** Separation Purification Techno 2002; 27(2): 163-71.

2- de Oliveira SA, da Silva BC, Riegel-Vidotti IC, Urbano A, de Sousa Faria-Tischer PC, Tischer CA. ***Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb.*** International J Biol Macromolecules 2017; 97: 642-53.

3- Elayaraja S, Zagorsek K, Li F, Xiang *J*. ***In situ synthesis of silver nanoparticles into TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose and their antivibriocidal activity against shrimp pathogens.*** Carbohydrate Polymers 2017; 166: 329-37.

4- Cheng Z, Yang R, Liu X, Liu X, Chen H. ***Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source.*** Bioresource Technology 2017; 234: 8-14.

5- Cakar F, Katı A, Özer I, Demirbağ DD, Şahin F, Aytekin AÖ. ***Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production***. Biochemical Engineering J 2014; 92: 35-40.

6- de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva Barud H, Tercjak A, Gutierrez J, Lustri WR, de Oliveira OB, Ribeiro SJ. ***A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose.*** Carbohydr polym 2016; 153: 406-20.

7- Pandey LK, Saxena C, Dubey V. ***Studies on pervaporative characteristics of bacterial***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

cellulose membrane. Separation and Purification Technology 2005; 42(3): 213-18.

8- Khajavi R, Esfahani EJ, Sattari M. ***Crystalline structure of microbial cellulose compared with native and regenerated cellulose.*** International J Polymeric Materials 2011; (60): 1178-192.

9- Retegi A, Gabilondo N, Pena C, Zuluaga R, Castro C, Ganan P, de La Caba K, Mondragon I. ***Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships***. Cellulose 2010; 17(3): 661-69.

10- An K, Zhao D, Wang Z, Wu J, Xu Y, Xiao G. ***Comparison of different drying methods on Chinese ginger (Zingiber officinale Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure.*** Food Chem 2016; (197): 1292-300.

11- Santos SM, Carbajo JM, Quintana E, Ibarra D, Gomez N, Ladero M, et al. ***Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration***. Carbohydrate polymers 2015; 116(3): 173-81.

12- Fang L, Catchmark JM. ***Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from Gluconacetobacter strains***. Carbohydr polym 2015; 115: 663-69.

13- Dayal MS, Catchmark JM. ***Mechanical and structural property analysis of bacterial cellulose composites.*** Carbohydrate polymers 2016; 144(25): 447-53.

14- Jafarnejad S, Keshavarz SA, Mahbubi S, Saremi S, Arab A, Abbasi S, Djafarian K. ***Effect of ginger (Zingiber officinale) on blood glucose and lipid concentrations in diabetic and hyperlipidemic subjects: A meta-analysis of randomized controlled trials.*** J Functional Foods 2017; 29: 127-34. [Persian]

15- Pagliacci MC, Spinozzi F, Migliorati G, Fumi G, Smacchia M, Grignani F, et al. ***Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival.*** Eur J Cancer 1993; 29(11): 1573-77.

16- Muangman P, Opasanon S, Suwanchot S, Thangthed O. ***Efficiency of Microbial Cellulose Dressing in Partial-Thickness Burn Wounds.*** J Am Col Certif Wound Spec 2011; 3(1): 16-9.

17- Kwak MH, Kim JE, Go J, Koh EK, Song SH, Son HJ, et al. ***Bacterial cellulose membrane produced by Acetobacter sp. A10 for burn wound dressing applications.*** Carbohyd polym 2015; (122): 387-98.

18- Fu L, Zhang Y, Li Ch, Wu Zh, Zhuo Q, Huang X, et al. ***Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method.*** J Materials Chem 2012; 24: 12349-357.

19- Alvarez OM, Patel M, Booker J, Markowitz L. ***Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: results of a single center***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

***randomized study involving 24 patients*.** Wounds-a Compendium of Clinical Research Practice 2004; 16(7): 224-33.

20- Bottan S, Robotti F, Jayathissa P, Hegglin A, Bahamonde N, Heredia-Guerrero JA, et al. ***Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-based biolithography (GAB)***. ACS Nano 2014; 9(1): 206-19.

21- Pourali P, Razavianzadeh N, Khojasteh L, Yahyaei, B. ***Assessment of the cutaneous wound healing efficiency of acidic, neutral and alkaline bacterial cellulose membrane in rat***. v J Mater Sci Mater Med 2018; 29(7): 90.

22- Pourali P, Yahyaei, B, Ajoudanifar H, Taheri R, Alavi H, Hoseini A. ***Impregnation of the Bacterial Cellulose Membrane with Biologically Produced Silver Nanoparticles***. Curr Microbiol 2014; 69(6): 785-93.

23- Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S. ***Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale).*** Food Chemistry 2007; 102(3): 764-70.

24- Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. ***Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.*** Microbiol Mol Biology Rev 2002; 66(3): 506-77.

25- Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. ***Antibacterial Effect of Five Zingiberaceae Essential Oils.*** Molecules 2007; 12(8): 2047-60.

26- Hesaraki S, 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): 752-60.

27- Pourali P, Razavianzadeh N, 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 Regen 2016; 24(5): 860-69.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences **Received: 18 Aug 2018**
Vol 26| NO 9 | Dec 2018 **Accepted: 21 Nov 2018**

Production of bacterial cellulose scaffold contains herb extract and assessment of its healing effects in rat cutaneous wounds

Mobina Ebrahimian[1], Behrooz Yahyaei[†2], Sahebali Manafi[3]

Original Article

Introdution: Natural cellulose is a normal wound healing remedy that can improve the wound healing properties by combining with some herbal extracts. The aim of this study was to evaluate the production of bacterial cellulose containing Zingiber extract and to evaluate its healing effects in rat cutaneous wounds.

Methods: In this experimental study, *Gluconacetobacter xylinus* was first cultured in a hysterine-scrum culture medium under static conditions and aqueous extract of Zingiber officinale plant was prepared. Then, Microculture Tetrazolium Test (MTT) was performed to evaluate the cytotoxicity of the aqueous extract of Zingiber officinale, and finally the healing process was investigated on rat cutaneous ulcers in different days of treatment.

Results: The results of this study have shown that the cellulose layer was manufactured, tight, non-fracture and with pH = 7/005, which had the proper repair wound of 80%. The extract of the *Zingiber officinale* plant in the MTT test had toxicity to the cells, which has the same toxicity for cancerous and non-cancerous cells. For wound healing, the non-toxic concentration of the extract was used, and the results of the wound healing showed that cellulose and *Zingiber officinale* extract can be used as a suitable drug for wound healing.

Conclusion: *Gluconacetobacter xylinus* is effective in healing and wound, also the *Zingiber officinale* plant has a miraculous effect on open wounds.

Keywords: Cellulose, Wound healing, *Gluconacetobacter xylinus*, Zingiber officinale.

Citation: Ebrahimian M, Yahyaei B, Manafi S. **Production of bacterial cellulose scaffold contains herb extract and assessment of its healing effects in rat cutaneous wounds.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(9): 820-31.

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
[2]Department of Basic Science, Faculty of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
[3]Department of Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
***Corresponding author: Tel:** 02332390077, **email:** behroozyahyaei@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i9.466]