

اثر ترمیم‌کنندگی عصاره آبی-الکلی کرم خاکی بر زخم پوستی در ماهی طلایی (*Carassius auratus gibelio*)

مهران عربی^۱، علیرضا شمس‌آبادی^۲

۱- دانشیار فیزیولوژی گروه علوم جانوری دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد شهرکرد. نویسنده مسئول: mehranarabi@hotmail.com

۲- کارشناسی ارشد فیزیولوژی گروه علوم جانوری دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد شهرکرد.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: فرآیند ترمیم زخم شامل مجموعه‌ای از روندهای برنامه‌ریزی شده مولکولی و سلولی است. هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی توان ترمیم‌کنندگی عصاره آبی-الکلی کرم‌های خاکی (EBE) در بهبودی زخم تجربی در پوست ماهیان طلایی (*Carassius auratus gibelio*) بوده است.

مواد و روش‌ها: ماهیان طلایی (با سه تکرار مستقل و ۱۴ قطعه در هر گروه) برای یک دوره ۱۴ روزه، به ۵ گروه تقسیم‌بندی شدند: (۱) شاهد منفی (بدون زخم) (۲) شاهد کاذب (شم): زخم با تیمار حلال EBE: مخلوط روغن کرچک و وازلین سفید (۳) شاهد مثبت: زخم با تیمار پماد فنی‌توین سدیم ۱ درصد، (۴) زخم با تیمار پماد حاوی ۱ میلی‌گرم از EBE (۵) زخم با تیمار پماد حاوی ۱۰ میلی‌گرم از EBE. در ادامه، ارزیابی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، سنجش میزان کلاژن (محتوی هیدروکسی‌پرولین) در پوست، همراه با تعیین فعالیت لیزوزیمی در سرم خون ماهیان به انجام رسید.

نتایج: بررسی نتایج نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم از EBE، موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در قطر اپیدرم سنتز و آرایش رشته‌های کلاژن، کاهش التهاب در درم، و نیز در میزان هیدروکسی‌پرولین پوست و فعالیت لیزوزیمی سرم خون نسبت به سایر گروه‌ها شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که کاربرد EBE با دوز ۱ میلی‌گرم در گرم می‌تواند به عنوان یک ترکیب دارویی موثر در ترمیم زخم پوستی در جانوران به ویژه آبزیان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ماهی، آسیب پوستی، عصاره کرم خاکی، ترمیم زخم.

مقدمه

فرآیند ترمیم زخم (Wound healing) برای حفظ استحکام و یکپارچگی پوست به منظور مقابله با از دست‌دادن آب بدن، خونریزی و دفع هجوم میکروب‌های بیماری‌زا مهم و حیاتی بوده و دربرگیرنده روندهای پیوسته و تنظیم‌شده سلولی و مولکولی، همراه با مهاجرت‌های گسترده سلولی در بافت آسیب دیده است. وسعت زخم، محل ایجاد آن و تاثیر عوامل محیطی، همگی می‌توانند موجب تغییر در روند ترمیم زخم و مدت زمان انجام آن گردند. ترمیم زخم شامل چهار مرحله اصلی انعقاد خون، التهاب، تکثیر و بازآرایی بافتی است. مرحله خونریزی و انعقاد خون کوتاه بوده و در مرحله التهاب در نتیجه تاثیر تنظیم‌کننده‌های شیمیایی موضعی، رگ‌های خونی گشاد و نفوذپذیر شده که در نتیجه آن مهاجرت سلول‌های چندهسته‌ای سیستم ایمنی از خون به موضع زخم جهت مقابله با میکروب‌ها به انجام می‌رسد. در ادامه، افزایش سنتز و تاثیر فاکتورهای رشد و سایتوکین‌ها در موضع زخم موجب تکثیر و بازآرایی‌های سلولی و بافتی (سنتز کلاژن، تشکیل بافت گرانوله، بازسازی اپیتلیوم و انقباض زخم) و به دنبال آن بهبودی سریع‌تر زخم شده که گاه هفته‌ها تا ماه‌ها به طول می‌انجامد (۲۰۱). از نظر ماندگاری زخم‌ها بر دو نوع حاد و مزمن هستند. زخم مزمن همراه با رویدادهای پاتوفیزیولوژیکی متعدد بوده و لذا مدت زمان بیش‌تری را برای درمان و ترمیم کامل نیاز دارد (۳).

مطالعات نشان داده که به دلیل وجود موارد عفونی فراوان در محیط‌های آبی، ترمیم زخم در آبزیان می‌بایست با سرعت کافی به انجام برسد (۴). پوست در ماهیان به عنوان یک اندام چندکاره در فرآیندهایی نظیر دریافت حس، تنفس، تنظیم

اسمزی و دفع وارد عمل گردیده و سلول‌های اپیتلیالی آن در ترمیم زخم مشارکت فعال دارند (۵، ۶). از آن جایی که اپیدرم پوست در ماهی در جلوگیری از بروز شوک اسمزی و نفوذ میکروب‌ها نقش مهمی دارد لذا ترمیم سریع و کامل زخم‌های پوستی به منظور ادامه فعالیت جانور و کاهش مرگ و میر، ضروری و حیاتی است. مواد ضدعفونی‌کننده مثل آگلوتینین، لیزوزیم، پروتیین واکنش‌دهنده C، آنزیم پراکسیداز و پپتیدهای ضد میکروبی متنوع در مایعات بین سلولی اپیدرم و موکوس ترشح شده بر روی اپیدرم ماهیان وجود دارند که نقش مهمی را در مقابله با عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند. زخم پوستی در ماهیان شایع بوده و عوامل زیادی نظیر عفونت‌های میکروبی و انگلی، جراحات ناشی از برخورد با وسایل صیادی، حمله پرندگان شکاری، حمل و نقل، مسمومیت شیمیایی، کمبود اسیدهای چرب و ویتامین‌ها در ایجاد آن دخالت دارند. در این میان اپیدرم با ایجاد پوشش در محل زخم، در برقراری همئوستازی و ادامه‌یابی فرآیندهای زیستی بدن ماهی نقش تعیین‌کننده‌ای دارد (۴، ۷). وجود عفونت‌های باکتریایی موجب طولانی شدن مدت زمان ترمیم زخم شده که در بیش‌تر موارد با درمان‌های آنتی‌بیوتیکی قابل رفع است (۸). ترمیم زخم در ناحیه درم و عضلات زیر آن به مراتب طولانی‌تر از ناحیه اپیدرم است (۹). نتایج مطالعات نشان داده شد که ساختار درم در ماهیانی که ویتامین C بیشتری دریافت نموده‌اند، به دلیل مشارکت این ویتامین در سنتز رشته‌های کلاژن، بهبودی بیشتری داشته است (۱۰). در ماهیانی که جراحات‌های پوستی‌شان پس از آلودگی با عوامل میکروبی به زخم‌های عمیق تبدیل شده، میزان مرگ و میر به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۱۱). در سال ۲۰۰۳ مشخص گردید که

در بسیاری از کشورها از درمان‌های سنتی شامل عصاره‌های جانوری و گیاهی جهت تسریع روند ترمیم زخم استفاده می‌شود. وسعت زخم، محل ایجاد آن و تاثیر عوامل محیطی موجب تغییر در روند ترمیم زخم شده که با تاثیر عصاره‌های مذکور قابل تعدیل است. بر اساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی (WHO)، بیش از نیمی از مردم دنیا به اثرگذاری درمان‌های سنتی اعتقاد داشته و از آنان استفاده می‌کنند (۲۰، ۱۹). از قرن‌ها پیش در کشورهای شرق آسیا به ویژه چین از دیلانگ (Dilong) یا عصاره کرم‌های خاکی (EBE) به عنوان یک عامل ضد تب، ضد تشنج، ادرارزا، ضد آلرژی و کاهش‌دهنده فشار خون استفاده می‌شده است (۲۱). کرم‌های خاکی با ایجاد تغییر در خواص فیزیکوشیمیایی خاک، تغییر در جمعیت‌های میکروبی، برقراری جریان‌های آبی و هوارسانی کافی موجب افزایش حاصلخیزی خاک می‌شوند. کرم‌های خاکی شامل بیش از ۷۰۰۰ گونه بوده و مصارف غذایی و پزشکی دارند (۲۲، ۲۳). مولکول‌های زیستی متعددی با فعالیت فیبرینولیتیکی، میتوژنیک، ضد انعقادی، آنتی‌اکسیدانی، ضد تب، ضد میکروبی و ضد سرطان در عصاره کرم‌های خاکی وجود دارند که قدرت درمانگری این عصاره را در طب سنتی تضمین نموده‌اند (۲۴). از خواص آنتی‌اکسیدانی و نیز تنظیم‌کنندگی عصاره کرم‌های خاکی در درمان زخم معده و محافظت از کبد در موش رت استفاده شده است (۲۵، ۲۶). بررسی‌ها نشان داده که خواص ضد-میکروبی مایع سلومی کرم خاکی مربوط به وجود ترکیبات فعال نظیر فتیدین‌ها و لیزوزیم در آن بوده که بر علیه طیف گسترده‌ای از میکروب‌های بیماری‌زا در سطح بدن کرم‌های خاکی وارد عمل می‌شوند (۲۳).

افزودن مقادیر کافی از ویتامین C به جیره غذایی ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان موجب تسریع ترمیم زخم‌های برشی در آنان می‌شود. این ویتامین در شکل‌گیری بافت جدید و بازآرایی‌های سلولی در محل زخم نقش مهمی را برعهده دارد (۱۲). نوع بخیه‌زنی نیز در درمان زخم پوستی و سرعت ترمیم آن موثر است به طوری که استفاده از بخیه ساب‌کوتیکولار در مقایسه با انواع دیگر بخیه‌ها در زخم برشی پوست ماهی طلائی نتایج بهتری را به دنبال داشته و موجب تسریع ترمیم زخم شده است (۱۳).

فنی‌توین (Phenytoin) نوعی داروی ضدصرع بوده که به صورت موضعی نیز به عنوان پماد با نام تجاری Dilantin برای تسریع در ترمیم زخم پوستی، زخم پای دیابتی، زخم بستر، زخم عمیق و جای عمل استفاده می‌شود. مصرف موضعی فنی‌توین باعث افزایش ماده خارج سلولی و پروتئین بافت پیوندی، کاهش فعالیت کلاژناز، افزایش سنتز کلاژن، کاهش ادم، افزایش فعالیت فیروپلاستی و شکل‌گیری بافت گرانوله شده که تمامی این اثرات منجر به تسریع ترمیم زخم می‌شوند (۱۴، ۱۵). هم‌چنین فنی‌توین میزان آنژیوژنز (رگ‌زایی) را به کمک فاکتورهای رشد FGF و VEGF در محل ترمیم زخم افزایش می‌دهد (۱۶). کاربرد پماد فنی‌توین موجب بهبودی زخم پای دیابتی و کاهش زمان بستری این بیماران می‌شود (۱۷). در سال ۱۳۹۳ تیم تحقیقاتی ما نشان داد که می‌توان از پماد فنی‌توین در ترمیم زخم برشی در پوست ماهی طلائی استفاده موثر نمود (۱۸). در مطالعه حاضر نیز پماد فنی‌توین سدیم ۱ درصد گروه شاهد مثبت (با تاثیر مثبت بر روند ترمیم زخم) جهت تحریک روند ترمیم زخم و مقایسه آن با سایر گروه‌های تیماری مورد استفاده قرار گرفته است.

غذای کافی و دوره‌های ۱۲ ساعته نور-تاریکی به دور از هر گونه استرس نگهداری شدند. در طول آزمایشات هر ۵ روز یک بار آب آکواریوم‌ها تعویض می‌گردید.

برای ایجاد زخم تجربی، محلول بنزوکائین هیدروکلراید در اتانول (۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر) به عنوان داروی بیهوشی استفاده گردید. ۱ گرم از محلول نهایی در ۱ لیتر آب شهری وارد شد. در ادامه ماهیان جداگانه در محلول بیهوشی قرار داده شدند. بیهوشی ماهیان با مشاهده عدم حرکت در اوپرکولوم (سرپوش آبششی) مشخص گردید. در ادامه ماهیان را از آب خارج نموده و در امتداد خط میانی شکم، در بخشی از پوست جلوی باله شکمی (با پوست نرم و فلس‌های ریز) به کمک پانچ بیوپسی یک زخم برشی تمام ضخامت (Full-thickness) ایجاد گردید. برای ریکاوری، جریان آب به درون دهان و آبشش ماهیان وارد گردید که در نتیجه آن حرکات آرام و منظم اوپرکولوم ماهی برقرار شد (۱۳).

در این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی ماهیان طلایی (با سه تکرار مستقل) در ۵ گروه تقسیم‌بندی شدند: (۱) شاهد منفی (بدون زخم) (۲) شاهد کاذب یا شم (Sh): زخم تیمار شده با حلال EBE شامل مخلوط روغن کرچک و وازلین سفید (۱:۱) (۳) شاهد مثبت (Ph): زخم تیمار شده با پماد فنی‌توین سدیم ۱ درصد، (۴) زخم تیمار شده با پماد حاوی ۱ میلی‌گرم از EBE در گرم حلال (۵) زخم تیمار شده با پماد حاوی ۱۰ میلی‌گرم از EBE در گرم حلال. تمامی گروه‌ها شامل ۱۴ قطعه ماهی بودند. دوره زمانی برای انجام تیمارها و بررسی مراحل ترمیم زخم ۱۴ روز بود.

مولکول‌های زیستی موجود در EBE در روند ترمیم زخم مداخله نموده و موجب تسریع در بهبود زخم می‌شوند (۲۷). از سوی دیگر مشخص شده که با تاثیر ماکرومولکول‌های موجود در کمپلکس گلیکوپروتئینی G-90 از این عصاره میزان سنتز فاکتورهای رشد EGF و FGF را در موضع زخم افزایش داده که در نتیجه آن ترمیم زخم با سرعت و کیفیت بهتری به انجام می‌رسد (۲۸). در همین راستا -Mataušić-Pišl و همکاران توان ترمیم‌کنندگی زخم‌ها را برای EBE در مدل جانوری رت به اثبات رسانده‌اند (۲۹). در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی کمپلکس G-90 موجب محافظت از سلول‌های اپیتلیال و فیبروبلاست در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از اثر پراکسید هیدروژن در محیط کشت می‌شود (۳۰).

از آن جایی که تاکنون در منابع علمی استفاده از EBE در ترمیم زخم‌های پوستی آبریزان گزارش نشده، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی قدرت ترمیم‌کنندگی EBE بر زخم تجربی ایجاد شده در پوست ماهی طلایی (*Carassius auratus gibelio*) طراحی و به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

در مطالعه حاضر از ماهیان طلایی (*Carassius auratus gibelio*) با میانگین طول 16 ± 3 سانتی‌متر و محدوده وزنی 42 ± 2 گرم به عنوان مدل جانوری استفاده شده است. برای ایجاد سازه با محیط جدید، ماهیان به مدت یک هفته در داخل آکواریوم‌های شیشه‌ای ۵۰ لیتری با ابعاد $80 \times 40 \times 30$ سانتی‌متر محتوی آب شهری کلرزدایی شده با دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد همراه با پمپاژ دائمی اکسیژن و

در این مطالعه حلال EBE شامل ۱ گرم مخلوط روغن کرچک و وازلین سفید (۱:۱) بود. برای تهیه پماد بر پایه EBE، مقادیر ۱ و ۱۰ میلی گرم از EBE را در مقدار کمی از روغن کرچک حل نموده و سپس با وازلین سفید به خوبی مخلوط نمودیم. در هر نوبت ۰/۱ گرم از پماد به کمک اسکالپل استریل بر روی زخم‌ها گسترده می‌شد.

بررسی‌های ماکروسکوپی (تغییرات سطح بیرونی زخم‌ها)

برای ارزیابی تغییرات سطح زخم‌ها (انقباض زخم) از کولیس دیجیتالی استفاده شد. میزان تغییرات سطح بیرونی زخم‌ها با فواصل زمانی هر دو روز یک بار پس از ایجاد زخم (روز صفر) برای ۱۴ روز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در ادامه با استفاده از نتایج اندازه‌گیری‌ها و با استفاده از فرمول‌های زیر، درصد ترمیم زخم‌ها در روزها و تیمارهای مختلف محاسبه و مقایسه گردید:

$$100 \times \frac{\text{مساحت زخم در روز } x}{\text{مساحت زخم در روز صفر}} = \text{درصد مساحت زخم در یک روز مشخص}$$

$$\text{درصد مساحت زخم} - 100 = \text{درصد ترمیم زخم در یک روز مشخص}$$

هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) توسط سیستم تمام اتوماتیک به انجام رسید. در ادامه اسلایدهای بافتی به کمک میکروسکوپ نوری معمولی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

سنجش محتوی کلاژن پوست (میزان هیدروکسی پرولین زخم)

هیدروکسی پرولین (HP) به عنوان شاخص محتوی کلاژن تام در چرخه سنتز و تغییر (Turn over) کلاژن در پوست

استخراج عصاره آبی-الکلی کرم‌های خاکی (EBE)

کرم‌های خاکی قرمز کالیفرنایی (*Eisenia fetida*) در محلول کلرید سدیم ۱۰ درصد برای یک ساعت، کشته و ضدعفونی شدند. در ادامه کرم‌ها با قیچی خرد و به کمک روش اولتراسوند هوموژن گردیدند. به مخلوط حاصله ۴۰ میلی‌لیتر از متانول و کلروفرم (۱:۱) اضافه شد و برای یک شب در یخچال نگهداری گردید. پس از اضافه‌سازی آب مقطر و ایجاد محلول شیری‌رنگ، سانتریفیوژ با ۴۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه به انجام رسید. در لوله‌های سانتریفیوژ سه لایه ایجاد شد که لایه جامد و تیره‌رنگ وسط (EBE) به کمک دستگاه خشک‌کننده انجمادی (Freez-drying) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد برای ۷ ساعت خشک و از آن پودر تهیه گردید (۳۱).

تهیه پماد

بررسی‌های میکروسکوپی

جهت بررسی تغییرات و بازآرایی‌های بافتی، نمونه‌های زخم در پایان ۱۴ روز از پوست ماهیان گروه‌های مختلف برداشت گردید. نمونه‌ها توسط محلول فرمالین ۱۰ درصد (با یک بار تعویض پس از ۲۴ ساعت) فیکس گردیدند. در ادامه از نمونه‌ها قالب پارافینی تهیه شد. به کمک میکروتوم از قالب‌ها برش‌های ۵ میکرونی تهیه گردید. در تهیه اسلایدهای بافتی تمامی مراحل از جمله رنگ‌آمیزی به روش

رشد باکتری)، پلیت‌ها به برای یک دقیقه با محلول متیل و یوله ۱/۲۵ درصد رنگ آمیزی شدند. در انتها قطر مناطق روشن بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری و مقایسه گردیدند (۳۳).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مطالعه داده‌های حاصل به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نمایش داده شدند. جهت مقایسه میانگین داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) و پس‌آزمون Tukey's HSD در نرم-افزار SPSS استفاده گردید. از نظر آماری سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مشاهدات ماکروسکوپی (بررسی سطح بیرونی

زخم‌ها)

در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در طی دوره ۱۴ روزه ترمیم زخم، در ابتدا یک لایه شفاف روی زخم را پوشش می‌داد که به تدریج با پیشبرد مراحل ترمیم زخم، شیری رنگ می‌شد. کامل شدن لایه شیری‌رنگ به منزله ترمیم بهتر و التهاب کم‌تر بود. فقط در گروه‌های تیمار شده با دو غلظت از EBE، تشکیل لایه شیری همراه با حداقل التهاب بود. نگهداری بیش از یک ماه ماهیان منجر به تشکیل پولک و برگشت پوست به حالت اولیه نگردید (شکل ۱).

در جدول ۱ و شکل ۲ به ترتیب میزان تغییرات سطح زخم‌ها (انقباض زخم) و درصد ترمیم زخم‌ها در زمان‌ها و تیمارهای مختلف آورده شده‌اند. در طول دوره تیمار ۱۴ روزه عملکرد پماد حاوی ۱ میلی‌گرم از EBE در کاهش سطح زخم یا افزایش میزان انقباض زخم در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر

است. برای شروع به کمک یک پانچ بیوپسی بخشی از زخم به قطر ۵ میلی‌متر را جدا نموده و در ازت مایع فریز نمودیم. در ادامه نمونه‌ها را برای تمام شب در ۲ میلی‌لیتر از 2N HCl و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد وارد نمودیم تا هیدرولیز گردند. روند هیدرولیز توسط 2.5N NaOH خنثی و با آب مقطر دوبار تقطیر به میزان ۴۰ برابر رقیق گردید. به ۲ میلی‌لیتر از این محلول، ۱ میلی‌لیتر از 0.05 M chloramine-T اضافه و برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. به محلول قبلی به میزان ۱ میلی‌لیتر از محلول 3.15 M perchloric acid افزوده شد و پس از آن برای ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه کار، ۱ میلی‌لیتر از محلول 20% p- dimethylaminobenzaldehyde در n-پروپانول به محلول مرحله قبل اضافه شد و سپس ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در انتها، محلول نهایی را سرد گردید و میزان تغییرات جذب نورری HP در طول موج ۵۵۷ نانومتر ثبت شد (۳۲).

سنجش فعالیت لیزوزیمی سرم خون

سرم نمونه‌های خون گرفته شده از سیاه‌رنگ دمی به کمک سانتریفیوژ جدا گردید. برای این سنجش از روش لیزوپلیت استفاده گردید. ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* در آگاروز ۱ درصد با ضخامت ۴ میلی‌متر بر روی پلیت‌ها ریخته شد و بر روی آنان حفراتی با قطر ۲ میلی‌متر ایجاد گردید. در هر حفره ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم خون ماهیان طلایی ریخته شد (سه تکرار مستقل). در ادامه، برای شروع فعالیت باکتری‌ها، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ساعت قرار داده شدند. به منظور مشخص‌سازی دقیق قطر مناطق روشن (بدون

بوده به طوری که در روز ۸ و ۱۴ پس از ایجاد زخم نتیجه ترمیم با این پماد معنی داری ($P < 0.05$) بوده و درصد ترمیم زخم نیز نزدیک به ۱۰۰ درصد بود.

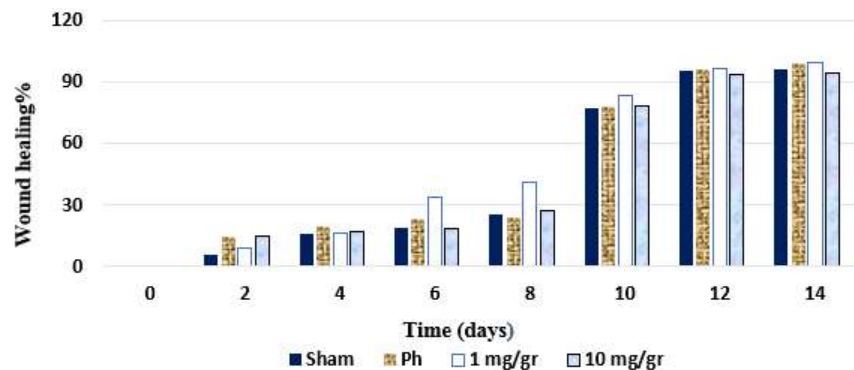


شکل ۱. تشکیل لایه‌های شفاف (سمت راست) و شیری رنگ (سمت چپ) در محل زخم.

جدول ۱- تغییرات سطح زخم‌ها (انقباض زخم) در روزها و تیمارهای مختلف.

دوره تیمار (روز)								شماره
۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	
۱/۱۳ ± ۰/۰۲ a	۱/۴۲ ± ۰/۰۱	۶/۷۴ ± ۱/۶۱	۲۲/۰۱ ± ۳/۱۲	۲۳/۷۵ ± ۳/۰۷	۲۴/۷۹ ± ۴/۰۱	۲۷/۶۱ ± ۴/۰۵	۲۹/۴۱ ± ۴/۱۱	شام
۱/۱۱ ± ۰/۰۳ a	۱/۱۱ ± ۰/۰۷	۶/۳۸ ± ۰/۹۵	۲۲/۳۸ ± ۴/۰۷	۲۲/۴۸ ± ۳/۱۳	۲۳/۵۸ ± ۴/۱۴	۲۵/۱۳ ± ۳/۶۷	۲۹/۴۵ ± ۴/۳۲	فنی توین
± ۰/۰۰۵ ۰/۰۹ b	۱/۰۵ ± ۰/۰۹	۴/۸۶ ± ۰/۹۸	۱۷/۳۴ ± ۲/۹۱	۱۹/۵۵ ± ۲/۷۱	۲۴/۶۵ ± ۴/۱۷	۲۶/۸۳ ± ۴/۰۱	۲۹/۵۲ ± ۴/۲۲	۱ میلی گرم EBE
۱/۶۵ ± ۰/۰۴ a	۱/۶۹ ± ۰/۰۶	۶/۰۲ ± ۱/۰۷	۲۱/۱۵ ± ۴/۱۲	۲۳/۶۹ ± ۴/۰۷	۲۴/۰۷ ± ۳/۸۹	۲۴/۶۷ ± ۳/۸۹	۲۹/۰۲ ± ۵/۱۲	۱۰ میلی گرم EBE

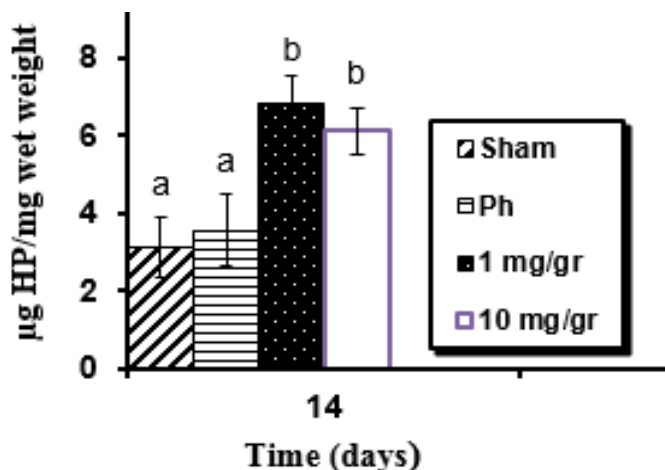
- واحد اندازه‌گیری میلی‌متر مربع است.
- در هر ستون داده‌های با حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) دارند.



شکل ۲. تغییرات درصد ترمیم زخم‌ها در روزها و تیمارهای مختلف.

سایر گروه‌ها بود ($P < 0.05$). در این میان بیشترین میزان حضور هیدروکسی‌پرولین، در نمونه‌های پوست تیمار شده با پماد ۱ میلی‌گرم از EBE معادل با ۹۵/۸۵ درصد بوده است ($P < 0.05$).

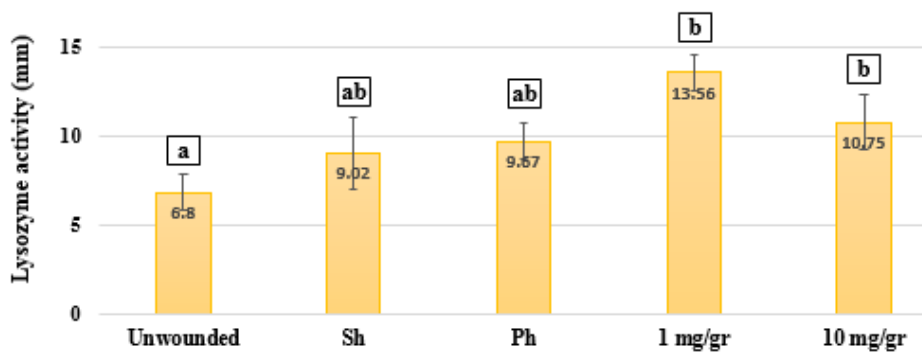
نتایج مربوط به تغییرات غلظت هیدروکسی‌پرولین (سنتز کلاژن) در پوست گروه‌های مختلف از ماهیان در پایان ۱۴ روز در شکل ۳ آورده شده‌اند. افزایش غلظت هیدروکسی‌پرولین در گروه‌های تیمار شده با دو غلظت از EBE بیشتر از



شکل ۳. تغییرات غلظت هیدروکسی‌پرولین در پوست ماهیان در پایان دوره ۱۴ روزه در تیمارهای مختلف. حروف غیرهمنام اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) دارند.

گروه تیمار شده با پماد ۱ میلی‌گرم از EBE بیشترین فعالیت لیزوزیمی را به میزان ۹۹/۴۲ درصد به خود اختصاص داده است ($P < 0.05$).

نتایج موجود در شکل ۴ میزان تغییرات فعالیت لیزوزیمی در سرم خون ماهیان در پایان دوره ۱۴ روزه را نشان می‌دهد که میزان آن (قطر مناطق رشد نیافته باکتری در لیزوپلیت) در گروه‌های تیمار شده با دو غلظت از EBE معنی‌دار بوده است

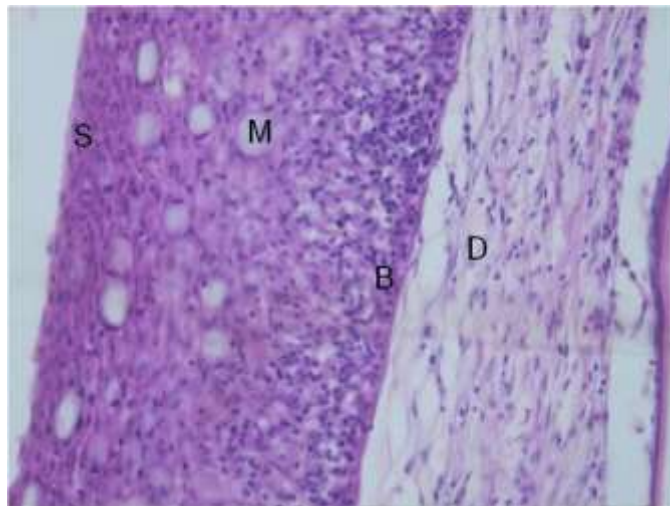


شکل ۴. تغییرات فعالیت لیزوزیمی سرم خون ماهیان در پایان دوره ۱۴ روزه در تیمارهای مختلف. حروف غیرهمنام اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) دارند.

مشاهدات میکروسکوپی

بافت گرانوله و رشته‌های کلاژن فراوان و منظم بدون التهاب (عدم حضور سلول‌های التهابی) است (شکل ۵).

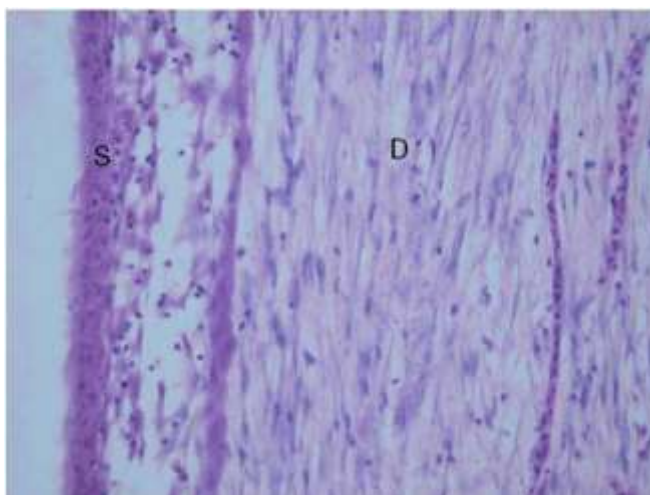
پوست طبیعی در گروه شاهد منفی دارای اپیدرم ضخیم همراه با سلول‌های درشت ترشح‌کننده موکوس و لایه درم با



شکل ۵. پوست در گروه شاهد منفی (بدون زخم). D-درم، B- تیغه پایه، M- سلول موکوسی، S- اپیدرم. لایه اپیدرم وسیع همراه با بافت گرانوله و کلاژن کافی در درم. التهاب و سلول‌های التهابی وجود ندارند (×۴۰).

انجام نشده است. در درم بافت گرانوله تا حدی شکل گرفته و رشته‌های کلاژن نیز تا حد کمی آرایش منظم دارند (شکل ۶).

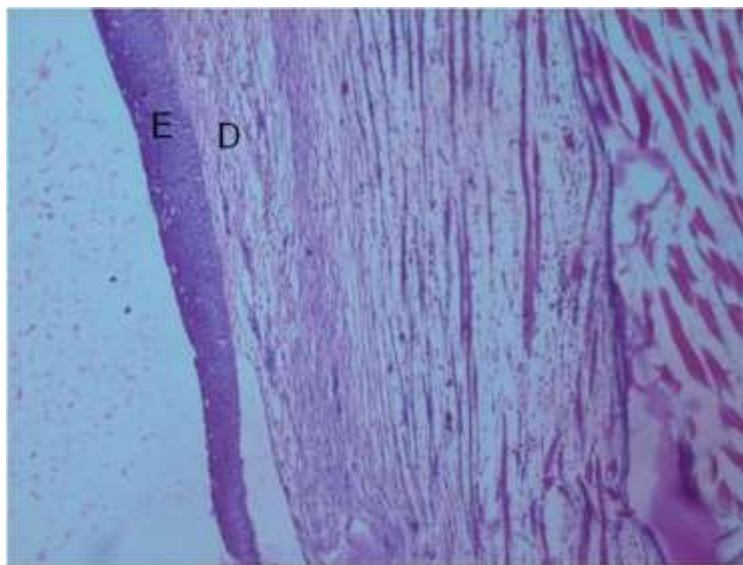
در انتهای تیمار ۱۴ روزه در پوست ماهیان گروه شاهد کاذب (شم) ترمیم زخم به طور کامل صورت نگرفته و درجات خفیفی از التهاب و هجوم سلول‌های التهابی مشاهده می‌شود. لایه اپیدرم نازک بوده و بازسازی در آن به خوبی



شکل ۶. پوست در گروه شاهد کاذب (شم) در پایان ۱۴ روز تیمار با حلال عصاره. D-درم، S- اپیدرم. لایه اپیدرم نازک است. التهاب خفیف، همراه با هجوم سلول‌های التهابی. بافت گرانوله سازمان یافته همراه با افزایش کلاژن در درم (×۴۰).

ضحیم‌تر از گروه شم بوده ولی کماکان ساختار آن ناقص است. در درم بافت گرانوله به میزان کافی شکل گرفته و آرایش رشته‌های کلاژن نسبت به گروه شم کمی منظم‌تر شده است.

در شکل ۷ مشخصات پوست ماهیان گروه شاهد مثبت (تیمار با فنی‌توین) در انتهای ۱۴ روزه آورده شده است. در این گروه ترمیم زخم ناقص همراه با درجات خفیفی از التهاب و هجوم سلول‌های التهابی در درم است. لایه اپیدرم کمی



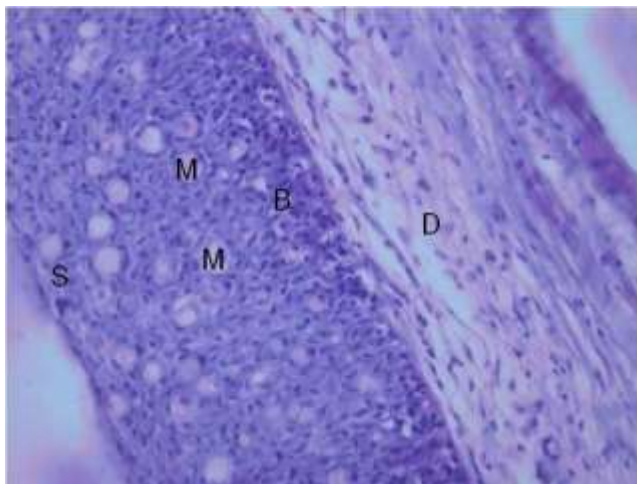
شکل ۷. پوست در گروه شاهد مثبت (تیمار با فنی‌توین) در پایان ۱۴ روز. D-درم، E-اپیدرم. لایه اپیدرم نازک است. التهاب خفیف همراه با بافت گرانوله کافی و نظم کلاژنی در درم (×۴۰).

خوبی صورت گرفته و بافت گرانوله رشد کافی و مناسب دارد.

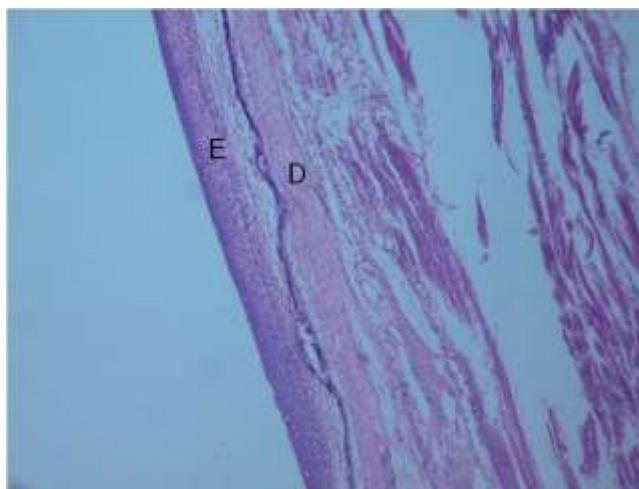
پایان ۱۴ روز در پوست زخم تیمار شده با ۱۰ میلی-گرم از EBE، اپیدرم ساختاری ناقص‌تر (ضخامت کم‌تر و بدون سلول‌های موکوسی) در مقایسه با پوست تیمار شده با ۱ میلی‌گرم از EBE داشته اما در مقایسه با سایر گروه‌ها به وضعیت پوست نرمال نزدیک‌تر است. در لایه درم نیز در مقایسه با تیمار ۱ میلی‌گرم از EBE، التهاب وجود داشته و توسعه بافت گرانوله و تجمع منظم رشته‌های کلاژن به خوبی صورت نگرفته است (شکل ۹).

شکل ۸ نشان‌دهنده ترمیم پوست در تیمار ۱ میلی‌گرم از EBE در پایان دوره ۱۴ روزه است. ظاهر برش تقریباً مشابه با گروه بدون زخم (شاهد منفی) است. اپیدرم با ساختاری کامل و ضحیم‌تر از گروه‌های شم و شاهد مثبت شکل گرفته است.

در اپیدرم سلول‌های موکوسی ظاهر شده‌اند. در لایه درم التهاب بسیار کم و خفیف وجود دارد و سلول‌های التهابی دیده نمی‌شوند. در مقایسه با گروه‌های شم و شاهد مثبت، آرایش و جهت‌یابی رشته‌های کلاژن به



شکل ۸. پوست در گروه تیمار ۱۴ روزه با ۱ میلی گرم از EBE. D-درم، B- تیغه پایه، M- سلول موکوسی، S-اپیدرم. لایه اپیدرم با ساختار کامل و بافت گرانوله و کلاژن کافی و منظم با التهاب بسیار خفیف در درم (×۴۰).



شکل ۹. پوست در گروه تیمار ۱۴ روزه با ۱۰ میلی گرم از EBE. D-درم، E-اپیدرم. رشد ناقص اپیدرم همراه با بافت گرانوله ناقص و توده کلاژن نامنظم و التهاب خفیف در درم (×۴۰).

ویژه گروه تیمار شده با فنی توین سدیم ۱ درصد (داروی موثر بر ترمیم زخم در پزشکی) شده است. در این ارتباط غلظت بالاتر از EBE (۱۰ میلی گرم در گرم حلال) واجد چنین اثری نبوده، لذا می توان عنوان نمود که تاثیر EBE در ترمیم زخم به صورت وابسته به غلظت نیست.

در هم سوئی با نتایج مطالعه حاضر نشان داده شده که مولکول های زیستی موجود در EBE موجب افزایش بیان ژن

بحث

با مرور نتایج مطالعات قبلی مشخص شده که تاکنون از EBE در ترمیم زخم های پوستی آبزبان استفاده نشده است. در مطالعه حاضر با بررسی نتایج ارزیابی های میکروسکوپی (تغییرات سطح زخم) و میکروسکوپی (بازسازی اپیدرم و درم) نمونه های زخم مشخص گردید که استفاده از پماد حاوی ۱ میلی گرم از EBE در گرم حلال موجب ترمیم بهتر زخم تجربی در پوست ماهیان طلائی نسبت به سایر گروه ها به

از دیگر فرآیندهای مهم در ترمیم زخم مهاجرت‌های سلولی است. مشخص شده که تیمار با EBE، موجب فعال-سازی مسیرهای سیگنال‌رسانی ERK1/2 & p38 و PAs و MMP2/9 & که نتیجه آن تشدید مهاجرت‌های سلولی در موضع زخم است (۴۳). هم‌چنین تیمار EBE با فعال‌سازی مسیر سیگنال‌رسانی PI₃K سبب تکثیر فیروبلاست‌ها شده که می‌تواند در بهبود روند ترمیم زخم نقش مهمی را ایفا نماید (۴۴).

کاهش بار میکروبی در موضع زخم از جمله خواص EBE بوده که منجر به ترمیم بهتر زخم‌ها می‌شود (۲۹). در پژوهش حاضر نیز احتمالاً همین روند توانسته با حذف میکروب‌های بیماری‌زا ترمیم مناسب زخم را باعث گردد. آزمایشات میکروب‌شناسی مشخص نموده که استفاده از EBE می‌تواند موجب مهار رشد باکتری‌های *Aeromonas* و *Streptococcus pyogens* و *hydrophila* و قارچ *Candida albicans* گردد (۴۵، ۴۶). علاوه بر این مطالعات دیگر نشان داده که کاربرد EBE موجب کاهش جمعیت باکترهای *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* شده است (۴۷).

در مطالعه حاضر میزان حضور هیدروکسی‌پرولین (HP) به طور معنی‌داری در پوست ماهیان تیمار شده با پماد حاوی ۱ میلی‌گرم از EBE در گرم در مقایسه با سایر تیمارها افزایش داشته است. HP به عنوان یک اسید آمینه ضروری در سنتز رشته‌های کلاژن در پوست وارد عمل می‌شود. استفاده از EBE در پوست موش با زخم ناشی از سوختگی عمیق درجه ۲ موجب افزایش میزان HP و کوتاه‌تر شدن زمان ترمیم شده

برخی فاکتورهای رشد در موضع زخم شده که در نتیجه آن سرعت و کیفیت ترمیم زخم افزایش می‌یابد (۲۷، ۲۸). هم-چنین خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضد اپوپتوزیس EBE به اثبات رسیده که همگی در بهبود شرایط ترمیم زخم دخالت مستقیم دارند (۳۴، ۳۵). در ساختار بیوشیمیایی EBE کمپلکس‌هایی با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئازی وجود دارند که می‌توانند در روند ترمیم زخم نقش مهمی را برعهده داشته باشند (۲۸، ۳۰). از سوی دیگر، در تایید قدرت ترمیم-کنندگی EBE، استفاده از این عصاره موجب پیشبرد مراحل ترمیم زخم در عصب سیاتیک رت و تاندون در خرگوش شده است (۳۶، ۳۷). در زخم‌های انسانی نیز مطالعات متا آنالیزی نشان داده که استفاده از EBE موجب تسریع در بازسازی ساختارهای اپیدرمی و کاهش مدت زمان ماندگاری بیماران در بیمارستان شده است (۳۸، ۳۹). در همین راستا، کاربرد EBE موجب افزایش سنتز فاکتورهای رشد EGF و FGF در زخم‌های پوستی در موش شده است (۲۸). با توجه به آن که EGF در تحریک تکثیر سلول‌های اپیتلیالی و FGF در تحریک رگ‌زایی و افزایش تعداد فیروبلاست‌ها در درم نقش دارند (۴۰)، لذا در مطالعه حاضر می‌توان قدرت ترمیم-کنندگی EBE را به عملکرد مستقیم این دو فاکتور رشد در موضع زخم مرتبط دانست. در همین ارتباط در سال ۲۰۰۷ مشخص گردید که EGF با جمع‌آوری و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش‌دهی میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)، موجب تسریع ترمیم زخم‌های دهانی در انسان می-شود (۴۱). با کاهش میزان LPO بر میزان رگ‌زایی در موضع زخم افزوده شده که در نتیجه آن سرعت ترمیم زخم افزایش می‌یابد (۴۲).

مقابله با عوامل آنتی ژنیک و بیماری‌زا، فعالیت آن افزایش پیدا می‌کند. لذا هر عاملی که فعالیت این آنزیم را افزایش دهد، موجب ایمن‌سازی هر چه بیشتر بدن خواهد شد (۵۳). در ماهیان خط اول مبارزه با عوامل آسیب‌رسان به بافت‌های بدن، افزایش فعالیت لیزوزیمی در خون بوده که از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا ماهیان سیستم ایمنی اختصاصی ضعیف‌تر و محدودتری نسبت به بسیاری از جانوران دیگر دارند (۵۴). مطالعات نشان داده که حتی جابجایی ماهیان از محل پرورش به مناطق دیگر نیز موجب افزایش فعالیت لیزوزیمی در خون و موکوس آنان می‌شود (۵۵). بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص گردید که کاربرد EBE نه تنها باعث بهبود سریع‌تر زخم پوستی در ماهیان شده، بلکه با افزایش فعالیت سیستم ایمنی ذاتی به صورت افزایش در فعالیت لیزوزیمی، موجب جلوگیری از هجوم عوامل بیماری‌زا به موضع زخم در روند ترمیم زخم می‌شود. از آنجایی که بافت‌های غنی از گلبول‌های سفید به ویژه طحال از منابع اصلی تولید و ترشح لیزوزیم در گردش خون هستند (۳۳)، لذا احتمال این که برخی از ماکرومولکول‌های EBE بتوانند ضمن ورود به خون، خود را به فاگوسیت‌های خونی نظیر ماکروفاژهای طحال رسانده و آنان را در جهت تولید و ترشح لیزوزیم تحریک نمایند، وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده ۱۴ روزه از پماد حاوی ۱ میلی‌گرم از عصاره آبی-الکلی کرم‌های خاکی (EBE) در ترمیم زخم پوستی ماهیان طلایی، می‌تواند موجب افزایش قابل توجه‌ای در بازسازی پوست، افزایش انقباض زخم و تقویت سیستم ایمنی ذاتی (فعالیت لیزوزیمی خون) در مقایسه با سایر تیمارها گردد. بنابراین EBE به عنوان

است (۴۸). میزان تغییرات چرخه سنتز کلاژن تام در پوست را می‌توان به طور غیرمستقیم با سنجش تغییرات میزان HP تعیین نمود. بین افزایش میزان HP و ترمیم زخم همبستگی مثبت قوی وجود دارد (۴۹). رشته‌های کلاژن توسط فیروبلاست‌ها در پوست ترشح شده و به دنبال ایجاد زخم قطعات ناشی از تخریب کلاژن موجب تحریک بازسازی اپیتلیوم، رگ‌زایی و جذب نوتروفیل‌ها به موضع زخم برای مبارزه با میکروب‌ها می‌شود. سنتز کافی و آرایش طبیعی رشته‌های کلاژن در موضع زخم مانع از شکل‌گیری اثر زخم یا اسکار در پایان روند ترمیم می‌شود (۵۰، ۵۱). همان‌گونه که در قبل نیز ذکر شد EBE سبب افزایش میزان FGF در موضع زخم می‌شود (۲۸). بررسی‌ها نشان داده که با افزایش میزان FGF در پوست، مسیر سیگنال‌رسانی c-Jun N-terminal kinase در فیروبلاست‌ها فعال شده که نتیجه آن افزایش مهاجرت این سلول‌ها به موضع زخم و ترشح کلاژن مورد نیاز برای ترمیم زخم است (۵۲). به این ترتیب در پژوهش حاضر می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً EBE با افزایش FGF در موضع زخم، ضمن تحریک فیروبلاست‌ها موجب افزایش سنتز و ترشح رشته‌های کلاژن شده که با سنجش تغییرات افزایشی میزان HP به اثبات رسیده است.

پیدایش زخم در پوست جانوران از انواع استرس‌های مزمن بوده که موجب فعال شدن واکنش‌های دفاعی بدن مثل افزایش فعالیت لیزوزیمی در مایعات بدن می‌شود (۵۳). در مطالعه حاضر استفاده از پماد حاوی ۱ میلی‌گرم از EBE در ترمیم زخم، به طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت لیزوزیمی در خون ماهیان در مقایسه با سایر تیمارها شده است. فعالیت لیزوزیمی از جمله شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در بدن جانوران بوده که در شرایط نامساعد محیطی و به منظور

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ گونه تعارضی در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: and overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004; 9(1-3): 283-9.
2. Lux CN. Wound healing in animals: a review of physiology and clinical evaluation. *Veterinary Dermatology*. 2022; 33(1); 91-e27.
3. Barchitta M, Maugeri A, Favara G, San Lio RM, Evola, G., Agodi A, et al. Nutrition and Wound Healing: An Overview Focusing on the Beneficial Effects of Curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20: 1119.
4. Fontenot DK, Neiffer DL. Wound management in teleost fish: biology of the healing process, evaluation, and treatment. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 2004; 7: 57-86.
5. Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire J. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Developmental Biology*. 2004; 48(2-3): 217-31.
6. Angeles Esteban M. An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*. 2012; 2012: 29.
7. Richardson R, Slanchev K, Kraus C, Knyphausen P, Eming S, Hammerschmidt M. Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound healing research. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013; 133(6): 1655-65.
8. Caldwell MD. Bacteria and antibiotics in wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 2020; 100: 757-76.
9. Halver JE. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bulletin of the*

یک عامل بیوزنیک می‌تواند به عنوان ترکیب دارویی در ترمیم زخم‌های پوستی در جانوران به ویژه آبزیان مورد استفاده موثر قرار گیرد.

Japanese Society for the Science of Fish. 1972; 38: 79-92.

10. Hasanabadizadeh Z, Moradlou AAMH, Rasoul G, Rostami HAK, Narges S. The effects of vitamins injection (A, C, A+C and AD₃E) on wound healing process and some hematological response in common carp, *Cyprinus carpio*. *The Journal of Agriculture and Natural Resources Sciences*. 2008; 15(6): 117-24.

11. Lunder T, Sorum H, Holstad G, Steigerwalt AG, Mowinckel P, Brenner DJ. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. Nov. and *Vibrio wodanis* sp. Nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with winter ulcer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000; 50: 427-50.

12. Wahli T, Verlhac V, Girling P, Gabaudan J, Aebischer C. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2003; 225: 371-86.

13. Nematollahi A, Bigham AS, Karimi I, Abbasi F. Reactions of goldfish (*Carassius auratus*) to three suture patterns following full thickness skin incisions. *Research in Veterinary Science*. 2010; 89(3): 451-4.

14. Shaw J, Hughes CM, Lagan KM, Bell PM. The clinical effect of topical phenytoin wound healing: a systematic review. *British Journal of Dermatology*. 2007; 157(5): 997-1004.

15. Vijayasingham SM, Dykes PJ, Marks R. Phenytoin has little effect on in-vitro models of wound healing. *British Journal of Dermatology*. 1991; 125: 136-139.

16. Pereira, C.A.; Alchorne Ade, O. Assessment of the effect of phenytoin on

cutaneous healing from excision of melanocytic nevi on the face and on the back. *BMC Dermatology*. 2010; 10: 7.

17. Prasad S, Prakash A, Patel S, Lunawat A, Mahore D. A comparative analysis of the efficacy of topical phenytoin with conventional wound dressing in healing of diabetic foot ulcers. *International Surgery Journal*. 2017; 4(4): 1389-1393.

18. Heydari S, Arabi, M, Nematollahi A, Karimi E, Bigham Sadiq A. Comparative effects of earthworm body extract and sodium phenytoin on suture wound healing in goldfish *Carassius auratus*. *Cells and tissues*. 2015 Mar 1;5(4):361-8.

19. Liu E, Gao H, Zhao Y, Pang Y, Yao Y, Yang Z, et al. The potential application of natural products in cutaneous wound healing: A review of preclinical evidence. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 13: 900439.

20. Vitale S, Colanero S, Placidi M, Di Emidio G, Tatone C, Amicarelli F. Phytochemistry and Biological Activity of Medicinal Plants in Wound Healing: An Overview of Current Research. *Molecules*. 2022; 27(11): 3566.

21. Cooper EL, Hrzenjak T, Grdiša M. Alternative source of fibrinolytic, anticoagulative, antimicrobial and anticancer molecules. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2004; 17: 237-44.

22. Ahmed N, Al-Mutairi KA. Earthworms Effect on Microbial Population and Soil Fertility as Well as Their Interaction with Agriculture Practices. *Sustainability*. 2022; 14: 7803.

23. Grdiša M, Gršić K, Grdiša MD. Earthworms-role in soil fertility to the use in medicine and as a food. *Invertebrate Survival Journal*. 2013; 10(1): 38-45.

24. Cooper, E.L., Balamurugan, M., Huang, C.Y., Tsao, C.R., Heredia, J, Tommaseo-Ponzetta M, et al. Earthworms dilong: Ancient, inexpensive,

noncontroversial models my help clarify approaches to integrated medicine emphasizing neuroimmune systems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 2012: 164152.

25. Prakash M, Balamurugan M, Parthasarathi K, Gunasekaran G, Cooper EL, Ranganathan LS. Anti-ulceral and anti-oxidative properties of earthworm paste of *Lampito mauritii*, Kinberg on *Rattus norvegicus*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2007; 11(1): 9-15.

26. Balamurugan M, Parthasarathi K, Cooper EL, Ranganathan LS. Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. *Journal of Zhejiang University- Science B*. 2008; 9: 141-7.

27. Mira G, Terezija H. Glycolipoprotein extract of *Eisenia foetida* (G-90): A source of biological active molecules. *European Journal of Soil Biology*. 2007; 43: 104-9.

28. Grdiša M, Popović M, Hrzenjak T. Stimulation of growth factor synthesis in skin wounds using tissue extract (G-90) from the earthworm *Eisenia foetida*. *Cell Biochemistry and function*. 2004; 22: 373-8.

29. Matausic-Pisl M, Cupic H, Kasuba V, Mikecin AM, Grdisa M. Tissue Extract from *Eisenia foetida* as a Wound-Healing Agent. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2010; 14(3): 177-84.

30. Grdisa M, Popovic M, Hrzenjak T. Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* exerts some antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2001; 128(4): 821-25.

31. Hrzenjak T, Hrzenjak M, Kasuba V, Efenberger-Marinculić P, Levanat S. A new source of biologically active compounds-earthworm tissue (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubelus*). *Comparative Biochemistry and*

Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology. 1992; 102(3): 441-447.

32. Woessner J. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1961; 93: 440-7.

33. Lie O, Evensen O, Sorensen A, Froysadal E. Study on lysozyme activity in some fish species. Diseases of Aquatic Organisms. 1989; 6: 1-5.

34. Balamurugan M, Parthasarathi K, Cooper EL, Ranganathan LS. Earthworm paste (*Lampito mauritii*, Kinberg) alters inflammatory, oxidative, haematological and serum biochemical indices of inflamed rat. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2007; 11: 77-90.

35. Han CK, Kuo WW, Shen CY, Chen TS, Pai P, Tsai CH, et al. Dilong prevents the high-KCl cardioplegic solution administration-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells mediated by MEK. American Journal of Chinese Medicine. 2014; 42: 1507-19.

36. Wei S, Yin X, Kou Y, Jiang B. Lumbricus Extract Promotes the Regeneration of Injured Peripheral Nerve in Rats. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 123(1): 51-4.

37. Bigham-Sadegh A, Arabi M, Karimi E, Karimi I, Oryan A. Tendon Injury Healing with G-90 in a Rabbit Model: Biomechanical and Histopathological Evaluation. Veterinarski Arhiv. 2016; 86(3): 407-20.

38. Bo SP, Pan YJ. Clinical Analysis of Earthworm Sugar Extract Combined with Local Oxygen Therapy to Promote Chronic Wound Healing in 35 Cases. China Practical Medical. 2012; 7(20): 169-70 (Chinese).

39. Wang D, Ruan Z, Zhang R, Wang X, Wang R, Tang Z. Effect of Earthworm on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in Pharmacology. 2021; 12: 691742.

40. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Molecular Biology of the Cells. NY, London: Garland Publishing; 1989.

41. Coşkun S, Güleç EG, Balabanlı B, Acartürk F. Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time-course study. Surgery Today. 2007; 37(7): 570-4.

42. Altavilla D, Galeano M, Bitto A, Minutoli L, Squadrito G, Seminara P, et al. Lipid peroxidation inhibition by raxofelast improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. Shock. 2005; 24(1): 85-91.

43. Chang YM, Shih YT, Chen YS, Liu CL, Fang WK, Tasi CH, et al. Schwann Cell Migration Induced by Earthworm Extract via Activation of PAs and MMP2/9 Mediated through ERK1/2 and p38. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011; 2011: 395458.

44. Song S, Wang Y, Ji K, Liang H, Ji A. Effect of earthworm active protein on fibroblast proliferation and its mechanism. Pharmaceutical Biology. 2016; 54(4): 732-739.

45. Mathur A, Verma SK, Bhat R, Singh SK, Prakash A, GBKS Prasad, et al. Antimicrobial Activity of Earthworm Extracts. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2010; 2(4): 364-70.

46. Bhorgin AJ, Uma K. Antimicrobial activity of Earthworm Powder (*Lampito mauritii*). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014; 3(1): 437-43.

47. Punu GP, Ansari A, Jaikishun S, Seecharran D. Effect of Earthworm (*Perionyx excavatus*) Powder on Selected Bacteria and Fungi. Journal of Advances in Biology & Biotechnology. 2016; 5(2): 1-15.

48. He M, Xie WQ, Cheng G, Li WP, Yu DJ, Jin HF, et al. The therapeutic effects of

earthworm extract on deep second-degree burn wound healing. *Annals of Palliative Medicine*. 2021; 10(3): 2869-79.

49. Qiu L, Jin XQ, Xiang DL, Fu YX, Tian XF. Study on the collagen constitution of hyperplastic scar in different ages and its influencing factors. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2003; 19(4): 236-40 (Chinese).

50. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453: 314-21.

51. Reilly DM, Lozano J. Skin collagen through the life stages: Importance for skin health and beauty. *Plastic Aesthetic Research*. 2021; 8: 2.

52. Song YH, Zhu YT, Ding J, Zhou FY, Xue JX, Hee J, et al. Distribution of

fibroblast growth factors and their roles in skin fibroblast cell migration. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 14(4): 3336-42.

53. Anderson DP. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish, application to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*. 1992; 2: 281-307.

54. Kozinenko II, Isaeva NM, Balakhnin I. Humoral factors of nonspecific defense of fish. *Journal of Ichthyology*. 1999; 39: 394-400.

55. Mock A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Fish Biology*. 1990; 37: 873-85.



The healing effect of earthworm's hydro-alcoholic body extract on skin wound in goldfish (*Carassius auratus gibelio*)

Mehran Arabi¹, Alireza Shams-Abadi²

1. Associate Prof. in Animal Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Iran. Corresponding author: mehranarabi@hotmail.com

2. MSc in Animal Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Iran.

Received: 2023.01. 20

Accepted: 2023.02.27

Abstract

Background & aim: Wound healing is a complex programmed sequence of cellular and molecular processes. The objective of the present study was to evaluate the ability of earthworm's hydro-alcoholic body extract (EBE) to heal the experimental skin wound in goldfish (*Carassius auratus gibelio*).

Materials and Methods: Fish (independent triplicate, 14/group), for 14 days, were divided into 5 groups 1) negative control (Unwounded); 2) pseudo-control (sham): wound treated with EBE carrier (mixture of castor oil and white vaseline); 3) Positive control: wound treated with sodium phenytoin 1%; 4) 1 mg/gr EBE-treated wound, 5) 10 mg/gr EBE-treated wound. In this study, macroscopic and microscopic evaluations and collagen turnover (Hydroxyproline content) in the skin, along with determination of lysozyme activity in blood sera were carried out.

Results: In fish in group 4 (1 mg/gr EBE-treated wound), an increase in the epithelium diameter, good presence and appropriate synthesis of collagen with and low edema in dermis; increased hydroxyproline content; and elevated blood lysozyme activity were observed comparing to other groups.

Conclusion: Our results revealed that application of 1 mg/gr EBE might be as an effective medicinal material in the process of animal wound healing particularly in aquatics.

Key words: Fish, Skin damage, Earthworm extract, Wound healing.