



اثرات باکتری کشته شده لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) توسط کلروفورم بر ترمیم زخم پوستی موش صحرایی

سیما مشایخ^{*}، میترا حیدری نصرآبادی^۲، ویدا حجتی^۱، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی دامغان، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، گروه زیست‌شناسی، پرند، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: m.mashayekh_832@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۷

چکیده

التیام زخم عبارتست از حصول مجدد تمامیت فیزیکی ساختارهای داخلی و خارجی در برگزیده تعامل‌های پیچیده بین سلول‌ها و فاکتورهای مختلف می‌باشد. کوتاه کردن زمان بهبود زخم به دلیل کم کردن احتمال عفونت و عوارض زخم و کاهش هزینه‌ها سال‌هاست که توجه محققین را به خود جلب کرده است. روش‌های مختلفی جهت رسیدن به این هدف بکار گرفته شده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثرات باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) کشته شده توسط کلروفورم بر روی ترمیم زخم پوستی می‌باشد. در این تحقیق از موش سفید صحرایی رت به وزن ۲۸۰-۲۲۰ گرم استفاده شد، حیوانات در قفس‌های استاندارد و در دما 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند و آب و غذا بدون محدودیت در اختیارشان قرار می‌گرفت. سپس موش‌ها به گروه‌های پنج تایی، تجربی، کنترل و کنترل منفی تقسیم شدند. زخمی مربع شکل به ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ در پشت موش‌ها ایجاد شد. گروه‌های کنترل و تجربی به ترتیب تحت تیمار موضعی با اوسرین و اوسرین حاوی لاکتوباسیلوس کازئی کشته شده توسط کلروفورم قرار گرفتند، اما گروه کنترل منفی درمانی دریافت نکردند. زخم پوستی موش‌ها، به ترتیب پس از کشته شدن در روزهای ۳ و ۷ نمونه برداری و تحت مطالعات بافت‌شناسی و آماری قرار گرفتند. یافته‌های حاصل نشان داد که درصد بهبود زخم ($11 \pm 1/3$) و التهاب در گروه تجربی در روز هفتم نسبت به گروه‌های کنترل ($9/4 \pm 2/7$ درصد) و کنترل منفی ($8/8 \pm 2/7$ درصد) دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($P < 0/001$). تعداد نوتروفیل‌ها در گروه تجربی در فازهای بعدی ترمیم در مقایسه با گروه‌های کنترل و کنترل منفی کاهش را نشان دادند. بر طبق نتایج باکتری لاکتوباسیلوس کازئی کشته شده توسط کلروفورم توانسته به طور معنی‌دار موجب کاهش التهاب و تسریع در روند بهبود زخم موش‌ها شود.

کلمات کلیدی: زخم پوستی، ترمیم، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس کازئی

مقدمه

آسیب‌دیده، مویرگ‌ها، پلاکت‌های خونی و سیتوکین‌ها فعال می‌شوند. سومین مرحله، مرحله تکثیر سلولی (پرولیفراتیو) است که ۱ تا ۳ هفته پس از آسیب رخ می‌دهد چهارمین مرحله تمایز (remodeling) است که ۳ هفته پس از آسیب شروع می‌شود. طی این مرحله بلوغ کامل بافتی یا اسکار ایجاد می‌شود [۳، ۴، ۹].

ترمیم زخم پروسه فیزیولوژیک پیچیده‌ای است که شامل یک سری مراحل متوالی می‌باشد. اولین مرحله هموستاز (جلوگیری از خونریزی) است که زمان آسیب به مدت یک ساعت رخ می‌دهد. دومین مرحله ایجاد التهاب است که مدت کوتاهی بعد از هموستاز به مدت ۲۴ تا ۷۴ ساعت پس از آسیب آغاز می‌گردد. طی این مرحله سلول‌های بافت



با توجه به اثرات احتمالی این باکتری‌ها، در این مطالعه اثر درمان آن بر ترمیم زخم‌های پوستی در مدل حیوانی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی می باشد که به مدت ۱۰ ماه در دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند انجام شد. ۳۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۲۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری و به منظور تطابق با محیط جدید به مدت ۱۰ روز در حیوان خانه دانشگاه با چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در درمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس این حیوانات به صورت تصادفی در گروه‌های کنترل منفی، کنترل و تجربی قرار داده شدند. باکتری *Lactobacillus casei* توسط دکتر تاج آبادی و همکاران از محصولات لبنی تخمیری لبقوان جدا شده و در کلیکسیون میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز در محیط *Mrsbroth (de man, Rogada and sharp)* حاوی ۲۵ درصد گلیسرول در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور تهیه پماد از باکتری کشته شده، ابتدا باکتری مورد نظر در محیط آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ درصد CO_2 به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. پس از کشت باکتری، پلیت‌های یکبار مصرف حاوی باکتری را در ظرف استریل شده درب‌دار به همراه پنبه‌ای آغشته به کلروفرم به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس از گذشت ۲۰ دقیقه بار باکتری‌ها توسط قاشقک استریل از سطح محیط کشت جمع‌آوری گردیدند. هر روز آزمون به ازای هر موش گروه تجربی به ۰/۸ میلی‌لیتر اوسرین (Eucerin) به عنوان ماده پایه و 10^{11} - 10^{10} CFU/ml به محیط کشت ۴۸ ساعته باکتری اضافه و کاملاً مخلوط تا

درمان زخم‌ها یکی از اساسی‌ترین مسائلی است که انسان از آغاز خلقت با آن روبرو بوده است و تاکنون پژوهش‌های مختلفی در مورد ترمیم زخم انجام شده، در نتیجه مواد مختلفی به صورت مرهم زخم‌ها تهیه و معرفی شده‌اند که اغلب این مواد به صورت ترکیبات گیاهی و شیمیایی می‌باشد. نتایج گزارش شده توسط مجامع مختلف مورد بررسی‌های کلینیکی و آزمایشگاهی قرار گرفته‌اند اما تا کنون هیچکدام بعنوان یک دارو کاملاً موثر توصیه نشده‌اند [۱۲]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آنها منجر به ایجاد تاثیرات مفید در مصرف کننده می‌شود [۲] به طوری که علاقه انسان به استفاده از پروبیوتیک‌ها برای حصول سلامتی به سال ۱۹۰۸ برمی‌گردد. زمانی که الی مچنیکف روسی اظهار کرد که بشر باید از شیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس برای طولانی شده عمر استفاده کند [۱۱].

غالباً پروبیوتیک‌ها دارای نتایج مطلوبی از جمله: رفع مواد مسموم بوسیله اندام‌های یا توژنی [۹]، هضم هورمون‌ها و کمک به بهتر شدن سطح هورمون‌ها، پاک کردن و تصفیه صفرای برای کمک به سلامت کبد و مثانه، هضم لاکتوز برای کاهش گاز، نفخ و اسهال، موثر بودن در مسیرهای واژینال، مجرای گوش، سینوس‌ها و پوست هم چنین کمک به شکستن مواد زائد و بافت‌های مرده بدن، تولید ترکیبات مهارکننده، باکتری‌ها و بلوک جایگاه‌های اتصال باکتری‌ها، تقویت سیستم ایمنی [۷ و ۱۱]، فعالیت ضد توموری، تعدیل pH روده و ... می‌توان ذکر کرد.

همچنین نتیجه مطالعات که توسط کاملیا رودریکز و همکارانش در سال ۲۰۰۴ میلادی بر روی کفیر در زمینه اثرات باکتری‌های پروبیوتیکی بر ترمیم زخم پوستی صورت پذیرفت فعالیت‌های ضد التهابی و ترمیمی این گروه از باکتری‌ها را نشان داد [۱۱].



نمونه‌ها مقاطع بافتی تهیه شده و با هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند.

انجام مطالعات آسیب‌شناسی در دو زمینه صورت پذیرفت. در زمینه اول پارامترهای مانند اپی‌تلیزاسیون، تشکیل بافت گرانوله و میزان ترمیم ناحیه درم مورد ارزیابی قرار گرفت و در زمینه دوم درصد برخی سلول‌های درگیر در روندهای التهابی (ماکروفاژ و نوتروفیل) تعیین شد.

تمامی داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند معیار استنتاج آماری $P < 0.001$ در نظر گرفته شد.

نتایج

درصد بهبود زخم در روز سوم در گروه کنترل منفی $5/9 \pm 2/6$ ، در گروه کنترل $1/5 \pm 2/7$ ، در گروه تجربی $6/7 \pm 2/6$ درصد بودند که اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$) (نمودار ۱). درصد بهبودی زخم در روز هفتم در گروه کنترل منفی $8/8 \pm 2/7$ در گروه کنترل $9/4 \pm 2/7$ ، در گروه تجربی $3/1 \pm 11$ درصد بود که اختلاف معنی‌دار را نشان داد ($P < 0.001$) (نمودار ۲).

درصد بهبود زخم در گروه تجربی در روز سوم نسبت به دو گروه کنترل و کنترل منفی افزایش معنی‌داری را نشان داد. درصد بهبود زخم در گروه تجربی در روز هفتم نیز همانند روز سوم نسبت به دو گروه کنترل و کنترل منفی افزایش معنی‌داری را نشان داد؛ این افزایش به همراه کاهش سطح التهاب نوید تاثیر مثبت لاکتوباسیلوس کازئی در ترمیم زخم و شروع زودتر این روند می‌باشد.

طبق آزمایش‌های مربوط به اندازه‌گیری سطح زخم و محاسبه درصد بهبودی زخم‌ها (میانگین \pm انحراف معیار) تا روز هفتم نشان داد که اختلاف معنی‌داری در روز سوم و هفتم بین گروه‌های تجربی با گروه‌های کنترل منفی و کنترل دیده می‌شود، بطوری که این اختلاف در جهت افزایش درصد بهبودی بوده است. تعداد ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و

به صورت یکنواخت دربیاید. از این پماد به ضخامت ۱ میلی متر روی زخم موش گروه‌های تجربی مالیده شد. جهت انجام بیهوشی، مخلوطی از دو دارویی کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) تزریق می‌گردید. بعد از بیهوشی، موهای پشت حیوان کاملاً با تیغ تراشیده و سپس با الکل ۶۰ درجه ضد عفونی شد. سپس با استفاده از یک ماژیک نوک باریک زخمی مربع شکل به ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ سانتی‌متر ایجاد و بطور کامل سطح پوست در ناحیه زخم توسط قیچی جراحی جدا گردید. روز عمل، روز صفر در نظر گرفته شد. پس از ایجاد زخم، در روزهای ۳ و ۷ موش‌های صحرائی به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم گردیدند که در هر گروه ۵ سرحیوان وجود داشت. گروه‌ها عبارت بودند از:

۱- گروه کنترل منفی که در این گروه پس از ایجاد زخم باز هیچ گونه درمانی اعمال نشد.

۲- گروه کنترل که سطح زخم موش‌های این گروه روزانه ۱ بار با یک میلی‌لیتر ماده پایه، یعنی اوسرین به ضخامت ۱ میلی‌متر که بطور کامل سطح زخم را می‌پوشاند مورد تیمار قرار گرفتند.

۳- گروه تجربی که سطح زخم این گروه نیز روزانه یک بار با پمادها حاوی باکتری مرده که به ضخامت یک میلی‌متر به طور کامل سطح زخم را می‌پوشاند تیمار شدند.

پس از گذشت مدت زمان لازم، بهبود زخم با اندازه‌گیری وسعت زخم، درصد بهبود زخم مورد ارزیابی قرار گرفت و وسعت زخم در روزهای ۳ و ۷ بعد از عمل با واحد میلی-متر مربع اندازه‌گیری گردید که این اندازه‌گیری در ساعات معینی از روز توسط فرد خاصی صورت پذیرفت. در روزهای تعیین شده، پس از کشتن موش‌ها، یک نمونه بافتی از محل زخم مورد نظر با تیغ جراحی برداشته و سپس ابتدا با سرم فیزیولوژیک شسته و بعد در فرمالین ۱۰ درصد جهت ثبت غوطه‌ور گردید. بعد از انجام تثبیت کامل، از



روز هفتم به ترتیب $1/1 \pm 10/45$ بود که این تغییر در مقایسه با دو گروه کنترل منفی و کنترل اختلاف معناداری را نشان داد ($P < 0/001$). همچنین میانگین تعداد نوتروفیل‌ها در گروه تجربی در روز سوم و در روز هفتم به ترتیب $5/45 \pm 0/9$ و $2/9 \pm 0/9$ بود این کاهش نیز نسبت به دو گروه منفی و کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$).

فیبروبلاست‌ها در ۲۰ میدان دید شمارش شدند و سپس میانگین اعداد بدست آمده محاسبه و مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. جداول ۱، ۲ و ۳ میانگین شاخص‌های بافت‌شناسی التیام زخم در گروه‌های مورد آزمایش در روزهای ۳ و ۷ را نشان می‌دهد. طبق داده‌های حاصله میانگین تعداد ماکروفاژها در گروه تجربی در روز سوم $9/55 \pm 1/5$ و در

جدول ۱- میانگین و انحراف استاندارد ماکروفاژ گروه‌ها در روزهای ۳ و ۷

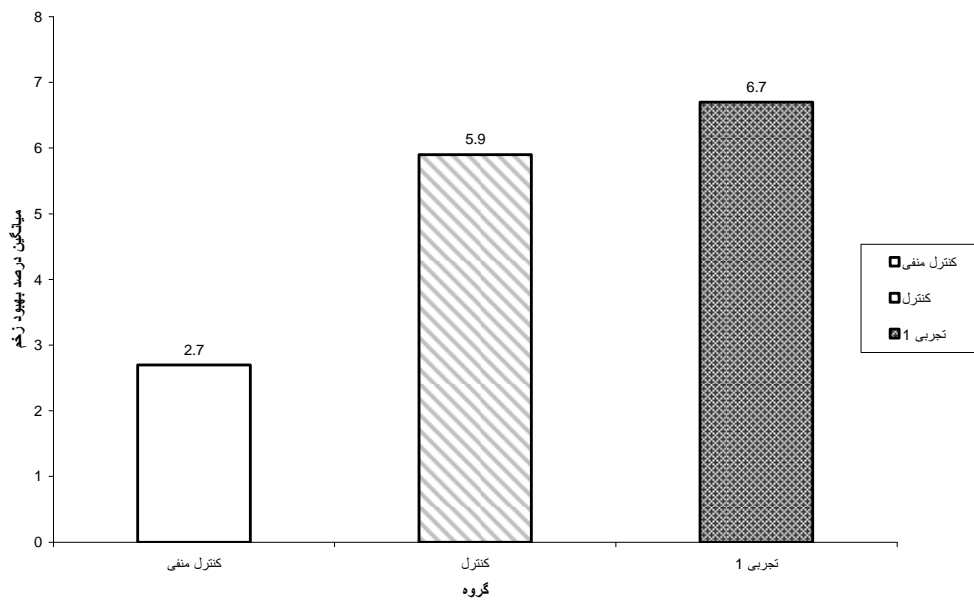
تجربی	کنترل منفی	کنترل	گروه روز
$9/55 \pm 1/5$	$6/65 \pm 1/7$	$5/75 \pm 1/5$	روز سوم
$10/45 \pm 1/1$	$18/3 \pm 1/1$	$17/95 \pm 1$	روز هفتم

جدول ۲- میانگین و انحراف استاندارد نوتروفیل گروه‌ها در روزهای ۳ و ۷

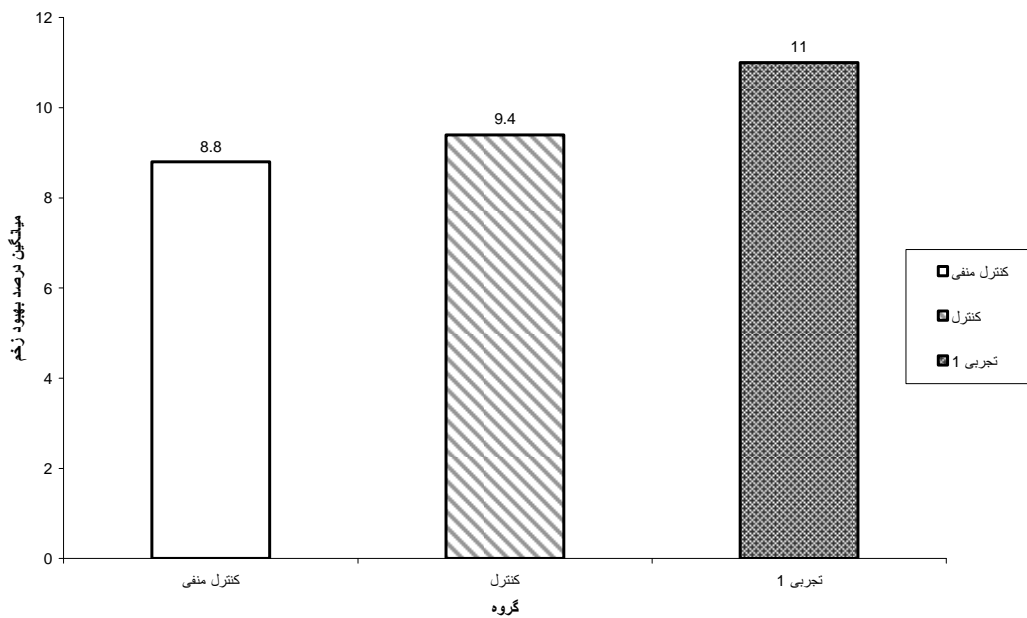
تجربی	کنترل منفی	کنترل	گروه روز
$5/45 \pm 0/9$	$6/15 \pm 1/1$	$5/8 \pm 0/9$	روز سوم
$2/9 \pm 0/9$	$4/55 \pm 0/8$	$4/75 \pm 1$	روز هفتم

جدول ۳- میانگین و انحراف استاندارد فیبروبلاست گروه‌ها در روزهای ۳ و ۷

تجربی	کنترل منفی	کنترل	گروه روز
$5/8 \pm 1/1$	$1/65 \pm 0/7$	$2/85 \pm 0/7$	روز سوم
$4/75 \pm 0/91$	$2/6 \pm 0/82$	$3/25 \pm 0/72$	روز هفتم



نمودار ۱- میانگین درصد بهبود زخم گروه‌های آزمایشی در روز سوم



نمودار ۲- میانگین درصد بهبود زخم گروه‌های آزمایشی در روز هفتم



بحث

یافته‌های بافت‌شناسی این مطالعه بیانگر تاثیر مثبت لاکتوباسیلوس کازئی در گرانولاسیون و اپتلیوم‌سازی سریع تر بر افزایش کلاژن زخم پوستی در موش صحرائی می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده این باکتری موجب تحریک سیستم ایمنی، هجوم فعال کردن ماکروفاژها در روزهای اولیه و سپس کاهش التهاب احتمالاً از طریق القای عوامل پس از التهاب (از قبیل سیتوکین‌ها) و عوامل رشد که در فرآیند ترمیم موثرند شده باشد [۶].

در روز سوم دوره تیمار که معرف فاز تکثیر سلولی است. از نظر آسیب‌شناسی بافتی تفاوت زیادی بین گروه‌های کنترل منفی و کنترل وجود نداشت. اما روند ترمیم در گروه تجربی از وضعیت بهتری برخوردار بودند.

به نظر می‌رسد که باکتری فوق باعث تحریک ساختن کلاژن و در نتیجه تولید جوشگاه شده است. همچنین باعث افزایش توانایی در تحریک فیبروبلاست‌ها و افزایش تعداد ماکروفاژها در روز سوم شده است [۵].

در روز هفتم در تمام گروه‌ها مهاجرت سلول‌ها بازال از لبه‌های زخم ادامه داشت که در گروه تجربی، باعث گرانوله پرسلولو پرعروق تماماً زخم را اشغال کرده بود، همچنین در گروه‌های تجربی فاز التهاب به اتمام رسیده و فاز تکثیر سلولی آغاز شده بود اما در گروه‌های کنترل و کنترل منفی در همان مدت زمان در فاز التهابی قرار داشت، بنابراین کاهش در خیز یا التهاب، یا عبارتی تعدیل در مرحله التهاب، تسریع زخم را موجب می‌شود [۱۲].

نتایج آسیب‌شناسی نشان داد که باکتری بر ظرفیت عملی فیبروبلاست‌ها، افزایش سنتز فیبرها کلاژنی و افزایش این مقاومت زخم بر علت افزایش محتوای کلاژن اثر می‌گذارد و از آن جایی که فیبروبلاست‌ها مسئول ایجاد فیبرهای کلاژنی می‌باشند، پس می‌توان نتیجه گرفت که باکتری لاکتوباسیلوس کازئی موجب تکثیر فیبروبلاست در روزهای

۳ و ۷ شده است و بر ظرفیت عملی فیبروبلاست‌ها اثر گذاشته و قابلیت سنتز فیبرهای کلاژن را افزایش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد از جمله ساز و کارهایی که برای عملکرد باکتری‌های پروبیوتیکی می‌توان ذکر کرد سرعت بخشیدن به ترمیم زخم می‌باشد. به طوری که افزایش سرعت بهبود زخم، اثرات زیادی چه از نظر اقتصادی و چه از نظر بهداشتی دارد. هرچه بتوان سرعت بهبود زخم را افزایش داد درصد عفونت زخم کاهش خواهد یافت و به این شیوه در کل جریان بهبود زخم تسریع ایجاد می‌شود. بنابراین این امید است که مطالعات بیشتر و کامل‌تری درباره اثرات باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در روند ترمیم زخم‌های باز پوستی صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

تمام شواهد و قرائن فوق حکایت از نقش باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و یا ترکیبات حاوی باکتری فوق بر سرعت التیام زخم دارند به طوری که در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تجربی با گروه‌های کنترل منفی و کنترل دیده شده است و همچنین از سوی دیگر در تمامی محورهای تجربی هیچ‌گونه عفونت باکتری دیده نشد، هرچند برای نتیجه‌گیری کامل‌تر و بهتر نیاز به ارزیابی‌های کامل‌تر و دقیق‌تر است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و دانشگاه علوم پزشکی تهران تقدیر و تشکر می‌شود.



منابع

- on cutaneous wound healing in Rat. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 1(1): 21-27.
- 7- Salauri E.I., Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi, S. Salminen (2001), Probiotics: effects on immunity 1-3. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (suppl): 4445-505.
- 8- Matin P. (1997), Wound Healing- Aiming for perfect skin regenerations. *Science*, 4 April: 276.
- 9- Pollmann M., M. Nordhoff, A. Pospischil, K. Tedin, L.H. Wieler (2005), Effects of a probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on the Rate of Natural Chlamydia infection on swine. *Infectional Immunology*, 73(7): 4346-4353.
- 10- Rautave S., M.I. Kalliomaki, E. Isolauri, (2002), probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 109(1): 119-121.
- 11- Schrezenmeir J., M. Vrese (2001), Probiotics, prebiotics, and symbiotics—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl), 36: 1-4.
- 12- Zahedi F., M. Heydari Nasrabadi, M. Tajabadi, M. Ebrahimi, M. Shabni, H. Aboutalebi (2011), The effect of *Lactobacillus brevis* on cutaneous wound healing in rats on days 7 and 27. *Arak Medical University Journal*, 14(57): 30-37
- ۱- علیزاده، ع. م.، محقق، م. ع.، خانیکی، م.، سعید پور، خ.، خلیلوند، د.، غیائی، ص.، دوستدار، ع.، کریمی، م. ۱۳۸۶. بررسی اثرات هیدروکسید آلومینیوم بر ترمیم زخم پوستی در موش صحرائی. مجله علوم پزشکی ایران. دوره ۱۴، شماره ۵۶.
- ۲- وجدانی، ر.، زالی، م. ۱۳۸۲. پروبیوتیک‌ها و مکانیسم اثر آنها در پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان. پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)، دوره ۲۷، شماره ۴، صفحات ۳۳۰-۳۱۹.
- ۳- یغمایی، پ.، مشرف جوادی، ف.، نیلفروش، م. ع.، مردانی، ح.، کاکانژادیان، پ. ۱۳۸۹. بررسی اثر ترمیمی عصاره آبی و الکلی چای سبز بر روند التیام زخم‌های باز پوست موش‌های نژاد NNRI. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره ۲۰، شماره ۲، صفحات ۷۵-۶۸.
- 4- Adam J., M.D. Singer, A.F. Richard, M.D. Clark (1999), Coetaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, September 2: 738-746.
- 5- Frank S., H. Kampf, C. Wetzler, J. Pfeilschifter (2002), Nitric oxide drives skin repair: Novel Functions of and established mediator. *Kidney international*, 67: 882-886.
- 6- Heydari Nasrabadi M., M. Tajabadi, M. Ebrahimi, S. Dehghan Bonadali, M. Torabi Kajousangi, F. Zahedi (2011), Study the probiotic Effects of *Lactobacillus plantarum*

