Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2020 ;Vol.44; No 3

Preparation and Characterization of Wound Dressing based on Chitosane Including Urtica Dioica

Sara Shojaei Zad[1], Rahmatollah Tavakoli[1]*, Mohammad Abbas Sheikholeslami[2]

1. Department of Medical Engineering, Maziar Royan University, Mazandaran, Iran
2. Department of Pharmacology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2019/05/1 Accept: 2019/09/30)

Abstract

Background:_One of the goals in medical sciences in modern communities is shorter time for wound healing with less side effects. The nettle extract in the presence of chitosan›s natural polymer can have antimicrobial and repairing properties. It also improves the recovery speed with fewer complications and less time._
Materials and Methods: _For different tests, we produced a chitosanfilm with different percentages of ,%10 %20, and %40 of nettle extract and a control sample without plant extracts. These tests include scanning electron microscopy (SEM), percentage of water absorption, antibacterial properties, percentage of inflation, and degradability rate. Prism software was used for data analysis._
Results: _The sample with high percentage of plant extract had a higher porosity surface compared with other samples and could be considered as a suitable wound dressing. Using two gram positive bacteria (Staphylococcus aureus) and gram negative (Pseudomonas aeruginosa) from the body of patients in Taleghani Hospital of Tehran, the antimicrobial activity of the film containing nettle extract and chitosan was evaluated. The results of Staphylococcus aureus bacteria were better than those of Pseudomonas aeruginosa._
Conclusion: _It seems that the wound dressing provided in this project may be suitable for wound dressing._

Keywords: _Urtica Dioica; Wound dressing; Chitosane_

---

* Corresponding authors:Rahmatollah Tavakoli
E-mail:r.tavakoli@maziar.ac.ir

پژوهش در پزشکی

مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دور ٤٤، شماره ٣، ١٣٩٩، صفحات ٤٥٤ تا ٤٥٩

بررسی خواص فیلم کیتوزان حاوی عصاره گیاه گزنه

سارا شجاعی زاد[۱]، رحمت‌الله توکلی[۱*]، محمد عباس شیخ الاسلامی[۲]

۱- گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه مازیار رویان، مازندران، ایران
۲- گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۰۸

چکیده:

سابقه و هدف: یکی از اهداف درمانی علم پزشکی در جوامع کنونی، ترمیم زخم در زمان کوتاه‌تر و با عوارض جانبی کمتر است. هدف از این پژوهش، تشکیل فیلم از عصاره گیاه گزنه در بستری از پلیمر طبیعی کیتوسان است که خاصیت ضد میکروبی و ترمیم کنندگی داشته و با عوارض کمتر و در زمان کوتاه‌تر و سریع تر زخم را بهبود می‌بخشد.

مواد و روش‌ها: برای مطالعه تجربی و آزمایش‌های مختلف، فیلم کیتوزان حاوی درصدهای مختلف ۱۰درصد، ۲۰درصد ، ۴۰درصد عصاره گزنه و یک نمونه شاهد بدون عصاره گیاه تولید کردیم. این آزمایش‌ها شامل میکروسکوپ الکترونی روبشی (*SEM*)، درصد جذب آب، خاصیت ضد باکتریایی، درصد تورم، میزان تجزیه‌پذیری است.

یافته‌ها: نمونه با درصد بالای عصاره گیاه نسبت به سایر نمونه‌ها تخلخل بالاتري دارد و مي‌تواند به عنوان پانسمان مناسب زخم در نظر گرفته شود. با استفاده از دو باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا) از بدن بیماران در بیمارستان طالقانی تهران فعالیت ضد میکروبی فیلم حاوی عصاره گزنه و کیتوزان ارزیابی شد. نتایج نشان داد که اثر فیلم بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بهتر از سودوموناس آئروژینوزا است. نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری پریسم محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که پانسمان زخم تهیه شده در این پروژه می‌تواند شرایط یک پانسمان مناسب زخم را داشته باشد.

واژگان کلیدی: زخم پوش، کیتوسان، گزنه

مقدمه:

پوست بزرگ‌ترین و سنگین‌ترین عضو موجود در بدن انسان است که عملکردهای زیادی شامل: تنظیم حرارت، هدایت حس‌های فیزیکی، سد مکانیکی، سنتز ویتامین D و حفاظت در برابر اشعه ماورای بنفش و عوامل فرسایشی و مهاجم را داراست. انسان از آغاز خلقت همیشه در معرض حوادث منجر به زخم بوده است. امروزه زخم و ترمیم آن جایگاه مهمی را به خود اختصاص داده است. زخم، به هر گونه از دست رفتن یکپارچگی یا گسستگی انسجام لایه های پوست (اپیدرم، درم و هیپودرم) یا انسجام بافت‌های زیر پوستی اطلاق می‌شود که به سبب عوامل مختلف پیوستگی خود را از دست داده است. زخم ممکن است در اثر عوامل فیزیکی (برش جراحی، ضربه، فشار و اصابت گلوله) یا عوامل شیمیایی (سوختگی با اسید) ایجاد شود و بافت نرم، ماهیچه یا استخوان را نیز درگیر کند(۱) . التیام زخم را می‌توان یک پاسخ دینامیکی به آسیب دانست که پیچیده و منظم است و مستلزم تعامل بین انواع مختلف سلول‌ها، فاکتورهای رشد، پروتئین‌های ساختمانی و پروتئینازهاست(۲) .

در سال‌های اخیر تمایل زیادی به بررسی آثار فیزیولوژی و فارماکولوژی عصاره‌های گیاهی و استفاده از داروهای گیاهی در جهان و به خصوص در ایران ایجاد شده است. عواملی همچون: گوناگونی ترکیب‌های موثر موجود در گیاهان، عوارض جانبی کمتر و به ویژه پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان جهانی بهداشت، دلایل رویکرد جهانی به استفاده از گیاهان است(۳،۱) .

اساسا زخم به عنوان یک ضایعه و شکست در سطح پوست، ناشی از صدمه‌ها تعریف می‌شود، که نیاز به درمان پزشکی دارد. یکی از اهداف اصلی درمانی در پزشکی ترمیم زخم درکوتاه‌ترین زمان و با عوارض جانبی کمتر است.[۴،۱] . زخم پوش‌ها برای حفاظت فیزیکی از زخم، تبادلات اکسیژن و رطوبت و ممانعت از ورود میکرو ارگانیسم‌ها به زخم در دسترس هستند. مطالعه‌ها مختلف نشان می‌دهد که برخی

نویسنده مسئول: رحمت‌الله توکلی

پست الکترونیک : *r.tavakoli@maziar.ac.ir*

گیاهان به عنوان مواد موثر در ترمیم زخم قابل استفاده هستند. از جمله این گیاهان، همیشه بهار کوهی، گزنه، بارهنگ، پیاز و عشقه را می‌توان نام برد(۵ ،۶).

گیاه گزنه با نام علمی Urtica dioica گیاهی علفی و پایا با ساقه‌ای منشعب است. برای این گیاه در متون کهن خاصیت آنتی باکتریال، ضد التهاب، ضد حساسیت، زیست سازگار و ضد کرم بیان شده است. در مطالعه انجام شده در سال ۷۱۰۲ توسط بابایی و همکاران اثر عصاره هیدروالکلی گزنه بر زخم پوستی تایید شده است(۷). از سوی دیگر کیتوسان یک پلیمر طبیعی است که آثاری شامل؛ اثر ضد التهابی، ضد میکروبی و زیست تخریب‌پذیر بودن دارد. کیتوسان می‌تواند با بهبود عملکرد سلول‌های التهابی، ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها بهبود زخم را تسریع کند(۸) . کیتوسان همچنین یک محیط مناسب برای بهبود زخم و تکثیر سلولی را با ایجاد یک ماتریس خارج سلولی فراهم می‌آورد(۹،۱۰). کیتوسان کمک به رشد بافت می‌کند، گسترش سلول‌های فیبروبلاست را آغاز و سنتز کلاژن را تحریک می‌کند. همچنین آثار ضد میکروبی علیه انواع باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها دارد(۱۱،۲۱).

با توجه به پیشینه پلیمر طبیعی کیتوسان برای ترمیم زخم و خواص عصاره گیاه گزنه در ترمیم زخم، در این پروژه به تاثیر زخم پوش کیتوزان، همراه با عصاره تام گزنه به صورت in vitro پرداختیم.

مواد و روش‌ها:

وسایل و مواد:

نوع مطالعه تجربی، کیتوسان با وزن ملکولی متوسط خریداری شده از نمایندگی (سیگما ت الدریچ)، استیک اسید گلاسیال ساخت شرکت (Merck آلمان)، اتیلن گلیکول (صنایع دکتر مجللی)، اتانول خالص ۷۰درصد شرکت (کیمیا الکل)، ژلاتین آزمایشگاهی ساخت شرکت (kcreM آلمان)، محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) شرکت (نو اندیشان علم مواد اسپادانا)، آب مقطر، گیاه گزنه، محیط کشت آگار، باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا، بشر، استوانه مدرج ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر، پی پت ۱۰ میلی‌لیتر، سمپلر ۱۰۰۰ میکرو لیتری (SARTORIUS)، همزن شیشه‌ای، پلیت ۱۰ سانتی‌متری، بالن شیشه‌ای، آسیاب آزمایشگاهی (PREETHI)، هیتر استیرر مدل SOOFER CO، ترازو، آون (فن آزما گستر)، کاغذ خشک‌کن، انکوباتور آزمایشگاهی (MEMMERT)، میکروسکوپ الکترونی روبشی Hitachi SU3500.

جمع آوری و خشک کردن گیاه گزنه و عصاره‌گیری گیاه گزنه:

در فصل بهار مقدار یک کیلوگرم گیاه گزنه از اطراف شهرستان تبریز جمع‌آوری شد. برگ‌های آن جدا و سپس در دمای اتاق و در محیط تاریک به مدت یک و نیم هفته خشک شد. برای عصاره‌گیری از روش خیساندن[1] استفاده کردیم. برگ‌های گزنه را پس از خشک شدن با آسیاب آزمایشگاهی به صورت پودر درآورده و مقدار ۲۵۰ گرم از پودر گیاه گزنه را همراه با مگنت درون ارلن ریخته و به آن ۵۰۰ سی سی اتانول ۷۰ درجه اضافه کردیم و دور تا دور ارلن را با ورق آلومینیومی پوشانده و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه هیتر استیرر با سرعت ۱۰۰ rpm در دمای اتاق قرار دادیم. سپس عصاره را از کاغذ صافی رد کرده و در ظرف شیشه‌ای ریختیم و تا خشک شدن کامل در محلی تاریک قرار دادیم.

ساخت بیوفیلم کامپوزیتی:

برای انجام تست‌های مختلف، فیلم کیتوسانی با درصدهای مختلف ۱۰درصد ، ۲۰درصد و ۴۰درصد از عصاره گیاهی و یک نمونه بدون عصاره تهیه کردیم. برای تهیه بیوفیلم کیتوسانی، مقدار دو گرم از کیتوسان را درون ارلن ریخته و ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک را به آن اضافه کرده و روی هیتر استیرر قرار دادیم تا کیتوسان به خوبی درون استیک اسید حل شود و سپس مقدار یک سی سی اتیلن گلیکول اضافه کردیم و درصدهای مختلف عصاره گزنه به آن اضافه شد. سپس محلول آماده شده را در پلیت ریختیم و تا خشک شدن کامل در محیط تاریک و به دور از آلودگی قرار دادیم. ضخامت زخم پوش حاصله پس از خشک شدن دو میلی‌متر بود که با یک میکرومتر دیجیتالی اندازه‌گیری شد و اندازه‌گیری‌ها در پنج نقطه از هر نمونه تکرار شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM[2]:

برای بررسی مورفولوژی ساختاری و ساختار سطحی نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Sem) استفاده شد. نمونه‌ها با درصدهای مختلف ما را در اندازه‌های تقریبا برابر برش زده و از سطح افقی آن‌ها عکسبرداری کردیم. از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی ساخت شرکت Hitachi، با دارا بودن انواع حسگرها و نیز تجهیزات آماده‌سازی نمونه از جمله سیستم پوشش‌دهی پلاسمایی که از هر نمونه در چهار بزرگنمایی عکسبرداری شد. کاربرد اصلی این دستگاه نیز تهیه تصویر با بزرگنمایی بالا از نمونه‌های مختلف (اعم از نمونه‌های متالوژیکی مقاطع نازک و صیقلی، نمونه‌های مربوط به مطالعه‌های نانو، نمونه‌های سرامیکی و ...) است [۱۳].

بررسی جذب آب[3]:

مرطوب نگه داشتن محیط زخم، این اجازه را می‌دهد تا جذب ترشح‌های زخم و حفاظت از زخم در برابر میکروارگانیسم‌ها اتفاق بیفتد. در این مرحله، فیلم‌ها را در ابعاد ۱mc × ۱ برش زده و با ترازوی دقت ۰/۰۰۰۱ وزن کردیم و سپس در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر، درون چهار بشر قرار داده و در زمان‌های ۱ ، ۲ ، ۳ ،۴ ، ۵ و ۶ ساعت، هر یک از نمونه‌ها را به صورت جداگانه بعد از گرفتن رطوبت سطحی توسط کاغذ خشک‌کن، وزن کردیم و دوباره داخل آب قرار دادیم. طبق فرمول زیر درصد جذب نمونه‌ها را محاسبه کردیم(۱۴). لازم به ذکر است که در این آزمایش و سایر آزمایش‌ها در این پروژه نمونه ها به صورت سه بار تکرار انجام شدند و میانگین آن در نظر گرفته شد.

(۱)

$$100 \times \frac{\text{وزن تورم} - \text{وزن ابتدایی}}{\text{وزن ابتدایی}} = \text{درصد جذب آب}$$

تست آنتی باکتریال[4]:

برای انجام این تست، از باکتری‌های گرم مثبت (استافیلاکوکوس اورئوس) و گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا) تهیه شده از بیماران بستری در بیمارستان طالقانی تهران استفاده شد. باکتری‌های مذکور در محیط کشت مولر به صورت چمنی کشت داده شد. سپس فیلم‌ها را به روش دیسک دیفیوژن در محیط فوق قرار دادیم و به مدت ۲۴h در دمای ۳۷°c در انکوباتور قرار دادیم و روز بعد هاله تشکیل شده اطراف فیلم‌ها را اندازه‌گیری و مقایسه کردیم.

تست زیست تخریب‌پذیری:

برای انجام تست زیست تخریب‌پذیری هر کدام از فیلم‌ها در اندازه ۱/۵mc × ۱/۵ برش داده و در آون به مدت یک ساعت قرار داده شد. ۴۰ میلی‌لیتر از محلول A و ۴۰ میلی‌لیتر از محلول B، SBF را درون یک بشر ریخته و هم زدیم. وزن اولیه (وزن خشک) نمونه‌های برش داده شده اندازه‌گیری شد. سپس هر قطعه فیلم را در بشر خود انتقال داده و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول SBF را به هر کدام اضافه کردیم. نمونه‌ها به مدت چند روز درون محلول SBF در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از پایان بازه زمانی ۲، ۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت غوطه‌وری در محلول SBF، هر نمونه خیس را روی کاغذ صافی قرار داده تا آب اضافی آن گرفته شود. سپس در آون قرار داده تا نمونه‌ها کامل خشک شوند و پس از آن دوباره وزن نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول زیر در صد تخریب‌پذیری را محاسبه کردیم(۱۵).

$$100 \times \frac{(m_o - m_i)}{m_o} = \text{درصد زیست تخریب‌پذیری}$$

m_o = وزن فیلم‌ها قبل از غوطه‌ور شدن در SBF

m_i = وزن خشک شده نمونه در بازه‌های زمانی

---

[1] Maceration

[2] Scaning electron microscopy

[3] Water Absorbation

[4] Anti Microbial Test

تست تورم:

برای انجام تست تورم چهار گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۶۰درجه سانتی‌گراد با دور mpr ۵۰۰ توسط هیتر استریر حل شد. ۱۶ گرم از محلول ژلاتین در پتریدیش ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط خشک شد. هرکدام از نمونه‌های فیلمی به قطر شش میلی‌متر برش داده شدند و سپس هر نمونه در مرکز پتریدیش به صورت جاگانه در محیط ژلاتینی قرار داده شد. انبساط فیلم با اندازه‌گیری قطر فیلم در هر ساعت در مدت هشت ساعت اول و بعد از ۲۴ ساعت ثبت شد. نرخ تورم فیلم مطابق فرمول زیر محاسبه شد:
(۳)

$$\text{درصد تورم فیلم} = \frac{(D_i - D_o)}{D_o} \times 100$$

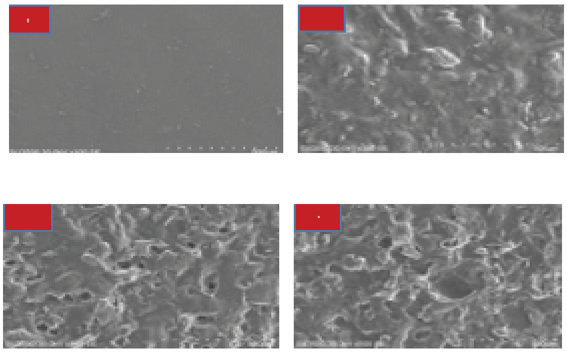
D_o = قطر فیلم قبل از تورم
D_i = قطر فیلم بعد از تورم

ارزیابی آماری:

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و ارزیابی اطلاعات به دست آمده با استفاده از نمودارهای ستونی و آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA انجام شد و مقادیر p کوچک‌تر از ۵درصد به عنوان اختلاف قابل ملاحظه در نظر گرفته شد ($P< 0/05$). برای رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism ۸ استفاده شد.

یافته‌ها:

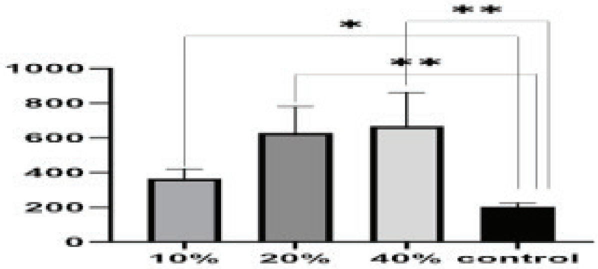
هدف از انجام آزمایش MES بررسی مورفولوژی ساختاری نمونه‌ها و مطالعه ریز ساختار سطحی آن‌هاست. از نمونه‌ها در بزرگنمایی‌های مختلف عکسبرداری شد که تصاویر به خوبی ارتباط و به هم پیوستگی سطح مقطع را نشان می‌دهد که خود، نقش مهمی در تغذیه و رشد سلولی ایفا می کند(شکل ۱).



شکل ۱- تصویر MES در ابعاد ۵۰۰ میکرومتر از (الف) نمونه کنترل، (ب) نمونه ۱۰درصد ، (ج) نمونه ۲۰درصد و (د) نمونه ۴۰درصد

همان‌طور که در شکل (۱) دیده میشود، نمونه کنترل، سطحی مسطح را نشان می‌دهد که در بزرگنمایی بیشتر گرفته شده از عکس، میتوان حفره‌های بسیار کوچکی را مشاهده کرد. در نمونه حاوی ۱۰درصد از عصاره گزنه میزان این حفره‌ها بزرگ‌تر می‌شود. با افزایش میزان غلظت عصاره گیاهی، میزان تخلخل ایجاد شده روی سطح بزرگ‌تر می‌شود. با افزایش میزان غلظت عصاره در بیوفیلم‌ها تخلخل ایجاد شده بزرگ‌تر میشود. این تفاوت بین نمونه کنترل و نمونه ۴۰ درصد از عصاره گزنه بسیار مشهود است. افزایش تخلخل‌ها و یکپارچگی آن‌ها سبب لانه‌گزینی مناسب و سریع‌تر سلول‌ها و ترمیم زخم در زمان کوتاه‌تری می‌شود. این حفره‌ها بزرگ و بیشتر برای جایگزینی سلول‌ها در فرآیند ترمیم زخم مناسب هستند. همچنین تعداد حفره‌ها نه آنقدر کم و نه آنقدر زیاد است که بخواهد روی خواص دیگر بیو فیلم تاثیر منفی بگذارد.

آزمایش نرخ جذب آب نشان می‌دهد که فیلم‌های تشکیل شده از عصاره گیاه گزنه و پلیمر کیتوسان، نسبت به نمونه کنترل، افزایش وزن پیدا کرده‌اند.



نمودار ۱- میزان جذب آب بر حسب زمان و میلی‌متر و دارای اختلاف معنادار $p< ۰/۰۵$ است.

همان‌طور که در نمودار (۱) مشاهده میشود، بعد از اندازهگیری درصد جذب آب نمونه‌ها در ساعت اول، نمونه‌های حاوی عصاره گزنه تفاوت چشم‌گیری در مقابل نمونه کنترل دارند که با بالا رفتن میزان عصاره گیاه، مقدار درصد جذب آب آن نیز افزایش یافته است. همچنین در ساعت سوم، جذب آب نمونه‌ها نسبت به ساعت اول بالاتر رفته و فیلم‌ها توانستهاند مقدار آب بیشتری را جذب کنند. نمودار نشان می‌دهد که با افزایش میزان غلظت عصاره، به خصوص نمونه‌های حاوی ۲۰ و۴۰ درصد از عصاره گیاهی، مقدار جذب آب افزایش یافته است. از طرفی با مقایسه نمودار میتوان گفت که نمونه‌ها در ساعت ششم به حداکثر میزان جذب آب رسیدهاند و در آب حل شدند. این روند میتواند برای یک زخم پوش مناسب باشد، زیرا یک زخم پوش ایده‌آل باید توانایی جذب ترشحات ایجاد شده در محل زخم را داشته باشد. همان‌طور که در نمودار دیده میشود نمونه حاوی ۴۰ درصد از عصاره گزنه توانسته میزان جذب آب بالایی از خود نشان دهد که نشان از موثر بودن عصاره گیاه گزنه در روند جذب آب است.

پس از انجام تست ضد میکروبی، نمونه‌ها را بعد از ۲۴ ساعت از درون انکوباتور بیرون آورده و توسط کاغذ مندرج، قسمت هاله تشکیل شده را اندازه‌گیری کردیم. نتایج به دست آمده از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا بهتر بوده و به طور نسبی با بالا رفتن میزان غلظت عصاره گزنه در فیلم‌ها، میزان هاله تشکیل شده نیز افزایش پیدا می‌کند. با توجه به انتظاری که از باکتری مقاوم سودوموناس آئروژینوزا داشتیم، هاله تشکیل شده توسط این باکتری به میزان بالایی نبوده است، ولی در تمامی موارد، فیلم‌های حاوی گزنه دارای آثار ضد میکروب قوی‌تری نسبت به نمونه کنترل (بدون گزنه) بوده است. لازم به ذکر است که در این آزمایش، نمونه‌ها به صورت سه بار تکرار انتخاب شدند.

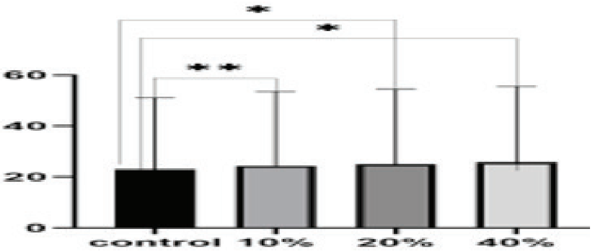
جدول ۱- میزان عملکرد ضد باکتریایی فیلم‌ها بر غلظت‌ها . به تفکیک باکتری برحسب mm

	Control	10%	20%	40%
Pseudomonas	1.3±1	2.7±1	3.0±1	3.2±1
Aureus	1.0±1	2.3±1	3.2±1	4.5±1

همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود؛ نمونه کنترل، نسبت به فیلمهای حاوی عصاره گزنه اثر کمتری بر باکتری‌ها داشت. ولی فیلمهای دارای عصاره گیاهی، مهار قابل توجهی نشان دادند، با بالا رفتن میزان عصاره گزنه در بیو فیلم‌ها، میزان هاله تشکیل شده نیز افزایش یافته است. اثر ضد باکتریایی فیلم‌ها با درصدهای مختلف در بین دو باکتری گرم مثبت و منفی نیز قابل مقایسه است و همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان هاله تشکیل شده در پتری دیش حاوی باکتری گرم مثبت، بزرگ‌تر است زیرا باکتری استافیلا کوکوس اورئوس مقاومت

کمتری نسبت به سودوموناس آئروژینوزا دارد.

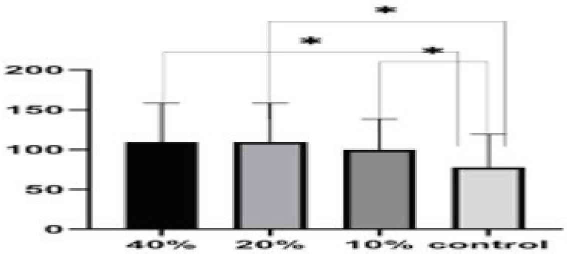
تست زیست تخریب‌پذیری برای بررسی مدت زمان تخریب فیلم کیتوسانی و فیلم‌های حاوی گزنه انجام شد. مشاهده شد که روند تخریب نمونه کیتوسان همراه با گزنه نسبت به نمونه کنترل سریع‌تر بوده است و در ۶۹ ساعت به مقدار قابل توجهی افزایش یافت.



نمودار ۲- میزان در صد تخریب‌پذیری نمونه‌ها بر حسب زمان و میلی‌متر و دارای اختلاف معنادار p< ۰/۰۵ است.

نمودار (۲) نشان می‌دهد که با افزایش میزان غلظت عصاره، نرخ تخریب‌پذیری بالا رفته است. نمونه‌های ۲۰ و ۴۰ درصد دارای سطحی با تخلخل بیشتر نسبت به نمونه‌های دیگر هستند، بنابراین بیشترین نرخ تخریب در نمونه‌های ۲۰ و ۴۰ درصد مشاهده می‌شود. نمونه‌ها در ساعت ۱۶۸ به حداکثر میزان تخریب رسیده‌اند.

آزمایش درصد تورم نشان داد که فیلم تشکیل شده از عصاره گیاه گزنه و پلیمر کیتوسان، نسبت به نمونه کنترل، قطر نمونه‌ها افزایش پیدا کرده است. فیلم‌ها ۲۴ ساعت پس از قرارگیری در ژلاتین به حداکثر تورم خود رسیده و متلاشی شدند.



نمودار ۳- میزان درصد تورم بر حسب زمان‌های پیگیری و میلی‌متر و دارای اختلاف معنادار p< ۰/۰۵ است.

همان‌طور که در نمودار(۳) مشاهده می‌شود بعد از اندازهگیری درصد تورم نمونه‌ها در ساعت اول، نمونه‌های حاوی عصاره گزنه تفاوت چشم‌گیری در مقابل نمونه کنترل داشتند. همچنین با بالا رفتن میزان عصاره گیاه، مقدار درصد تورم آن نیز افزایش یافته است. همچنین در ساعت هشتم، تورم نمونه‌ها نسبت به ساعت اول بالاتر رفته و فیلم‌ها توانستهاند مقدار ژلاتین بیشتری را جذب کنند که با توجه به نمودار میتوان متوجه شد که با افزایش میزان غلظت عصاره، به خصوص نمونه‌های حاوی ۲۰ و۴۰ درصد از عصاره گیاهی، مقدار تورم نیز بالا رفته است. از طرفی با مقایسه نمودار می‌توان گفت که نمونه‌ها در ساعت ۲۴ به حداکثر میزان تورم رسیده‌اند که این مقدار خیلی بالاست و میتواند برای یک زخم پوش مناسب باشد، زیرا یک زخم پوش ایده‌آل باید توانایی جذب ترشح‌های ایجاد شده در محل زخم را داشته باشد.

بحث:

بیو فیلم پلیمری کیتوسان به عنوان بستر به همراه گیاه گزنه در درصدهای مختلف تهیه شد. درصد جذب آب و نرخ تورم فیلم‌های تهیه شده با درصدهای بالاتر عصاره گیاه گزنه در این پروژه توانایی جذب ترشح‌های ایجاد شده در محل زخم را دارد و این جذب بیشتر می‌تواند در زخم پوش‌های بیولوژیکی استفاده شود. زخم پوش تهیه شده در این پروژه قابلیت جذب ترشح‌های زخم و مرطوب نگه داشتن محیط زخم را داراست و زخم پوشی غیر چسبنده است.

Winter نشان داد، اگر محیط زخم مرطوب نگه داشته شود، سرعت بهبود زخم دو تا سه برابر شده و از دانه دانه شدن زخم جلوگیری می‌شود(۱۶). زخم پوش‌های سنتی خشک مانند پشم، کتان، باندهای طبیعی یا مصنوعی و گاز که به عنوان زخم‌پوش اولیه برای زخم استفاده می‌شوند، به سبب خشک بودن، محیط خشک برای زخم ایجاد می‌کنند. در نتیجه، به زخم می‌چسبند و هنگام برداشتن از روی زخم، به آن آسیب می‌زنند(۱۷). پانسمان‌های نوین با قابلیت مدیریت ترشح‌ها و مرطوب نگه‌داشتن محیط زخم تولید می‌شوند. برای نمونه، زخم‌پوش‌های هیدروکلوییدی با مدیریت ترشح‌های زخم، ایجاد مانع در برابر ریزاندامک‌ها و کمک به کنترل درد بیمار به بهبود زخم کمک می‌کنند. این محصول‌ها با افزایش تولید رگ‌زایی، تعداد سلول‌های فیبروبلاست پوستی، تولید بافت دانه دانه و مقدار کلاژن سبب افزایش سرعت بهبود زخم‌ها می‌شوند(۱۸) . Leomers به عنوان نخستین پانسمان غیرچسبنده دولایه، معرفی شد. لایه اول آن را توری کتانی آغشته به پارافین و لایه دوم را گل حنا تشکیل می‌داد که دارای قابلیت تخلیه ترشح‌ها بود. در پانسمان‌ها یک لایه برای یکپارچگی مکانیکی و لایه دیگر ا برای جذب ترشح‌های زخم در نظر گرفته می‌شود (۱۹). آقای Ahmed M.I.N:yas و همکاران از کیتوسان و ذرات نقره برای بهبود زخم استفاده کرده‌اند که فیلم‌ها خاصیت جذب آب، بهبود زخم و مقاومت کششی و خاصیت ضد باکتری مناسبی از خود نشان داده است(۲۰).

اثر منفی انواع خاصی از میکروارگانیسم‌ها در ترمیم زخم در مطالعه‌های مختلف نشان داده شده است. میکروارگانیسم‌ها به عنوان دلیل تاخیر در بهبود زخم ذکر شده‌اند. یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا که سبب ایجاد این عفونت‌های پوستی می‌شود، سودوموناس آئروژینوزا است(۲۱). مطالعه‌ها نشان می‌دهد دو باکتری (سودوموناس آئروژینوزا) و (استافیلاکوکوس اورئوس) در اغلب عفونت‌های ناشی از زخم وجود دارند. از سوی دیگر، این باکتری‌ها نسبت به درمان آنتی‌بیوتیکی مقاوم هستند و یک مشکل جدی در درمان زخم‌ها این موضوع است(۲۲). سودوموناس آئروژینوزا باکتری باسیل گرم منفی است که بیش از ۸۰ درصد از موارد سبب عفونت می‌شود. استافیلاکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت کوکسی شکل است که میزان مقاومت در بین سویه‌های مختلف آن حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد است. تست آنتی باکتریال گرفته شده از فیلم‌ها با درصدهای مختلف نشان داد که این بیوفیلم نسبت به دو باکتری سودوموناس آئروژینوزا و استافیلاکوکوس اورئوس تشکیل هاله داده و هاله تشکیل شده در باکتری گرم مثبت اورئوس بیشتر بوده و فیلم تهیه شده از عصاره گیاهی با در صدهای ۲۰ و ۴۰ توانایی بیشتری در مهار باکتری استافیلاکوکوس اورئوس دارد که نشان‌دهنده خاصیت ضدمیکروبی مناسب بیوفیلم‌ها در درصدهای بالاتر در برابر باکتری گرم مثبت است.

کیتوزان به عنوان یک ماده زیست تخریب‌پذیر طبیعی و بی‌خطر در طراحی سیستم‌های تحویل دارو یا ژن استفاده می‌شود. ساختارهای مبتنی بر کیتوزان مزایای قابل توجه در بهبود انواع زخم دارند. از جمله؛ به عنوان پروفیلاکتیک نقش جلوگیری از توسعه عفونت را ایفا می‌کنند. کیتوزان یک پلیمر کاتیونی است و به طور ذاتی خواص ضد میکروبی دارد و برای جلوگیری از عفونت‌های میکروبی استفاده می‌شود. بسیاری از مطالعه‌ها، خواص ضد میکروبی کیتوزان و آنالوگ‌های مشابه آن را تایید کرده‌اند(۲۳). در این پروژه تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده پراکندگی همگن ذرات در بیوفیلم است. این پراکندگی در نمونه ۲۰ و ۴۰ درصد حاوی گیاه گزنه، بهتر دیده شد که سبب چسبندگی بهتر سلول‌ها هنگام ترمیم زخم می‌شود. نرخ تخریب‌پذیری نشان‌دهنده این است که نمونه‌ها با درصد بالای عصاره گیاه گزنه، دارای سطحی با تخلخل بیشتر نسبت به نمونه‌های دیگر هستند، بنابراین بیشترین نرخ تخریب در نمونه ۲۰ و ۴۰ درصد مشاهده می‌شود.

زخم‌پوش‌های موجود در بازار ایران بیشتر فاقد ماده دارویی هستند و در این نوع زخم‌پوش‌ها فقط به ایجاد یک محیط استریل بسنده شده است. با توجه به

بررسی‌های انجام شده در این تحقیق زخم پوش با پایه کیتوزان حاوی عصاره گزنه ؛ یک زخم‌پوش مناسب برای انواع زخم است. اثر ضد باکتریایی گزنه به همراه اثر پوشانندگی خوب و ایجاد محیط استریل توسط کیتوزان از مزایای زخم‌پوش ساخته شده در این پروژه است. پیشنهاد می‌شود این زخم‌پوش از نظر in vivo بررسی شود. با توجه به دوز بالای عصاره، این دوز بالا یک عامل محدودکننده در مصرف این نوع زخم پوش است که پیشنهاد می‌شود آثار جانبی آن بررسی شود. از سوی دیگر به دلیل آنکه زخم‌پوش با پایه کیتوزان قابلیت چسبیدن بر سطح پوست یا زخم را ندارد استفاده از آن در بیماران مشکل است و توسط برخی بیماران ممکن است مورد قبول واقع نشود. البته در صورت کسب نتایج خوب در بررسی‌های In vivo استفاده از این زخم پوش مورد اقبال بیماران قرار خواهد گرفت. به طور کلی استفاده از زخم‌پوش با پایه کیتوزان همراه با عصاره تام گیاه گزنه که خاصیت ضد باکتریایی قابل قبولی دارد، یک فرمولاسیون از پانسمان‌های مدرن را برای درمان زخم در دسترس قرار می دهد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به ویژگی‌های یک زخم‌پوش ایده‌آل، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که زخم‌پوش تهیه شده در این پروژه می‌تواند شرایط ایده‌آل یک زخم‌پوش را داشته باشد. در این پژوهش برای نخستین بار از گیاه گزنه و پلیمر کیتوسان استفاده شد.

منابع:

Afaghi E. and Mahmoudi H., The Role of Moist Dressings in Wound Healing, Edu. J. Baqiyatallah Uni. Nurs. Faculty, 15, 11-16, 2015. (Full Text in Persian).

Khaksari M, Rezvani ME, SOLEYMANI A, SAJADI M. The effect of topically applied water extract of Rhazya stricta on cutaneous wound healing in rats.

Sobiczewska E, Szmigielski S. The role of selected cell growth factors in the wound healing process. Przeglad lekarski. 1997;54(9):634-8.

Adzick NS. Wound healing, Text book of surgery, the biological basis of modern surgical practice. 5thedn. New York: WB Sanders Company. 1997.

Moniee SH. Giahdarou. Tehran Iran:Ketabsara press;1981;75.(Full Text in Persian).

Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal feed science and technology. 2003 Apr 21;106(1-4):3-19.

Babaei E, Asghari MH, Mehdikhani F, Moloudizargari M, Ghobadi E, Pouya SR. The healing effects of herbal preparations from Sambucus ebulus and Urtica dioica in full-thickness wound models. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2017 May 1;7(5):421-7.

Han J, Zhou Z, Yin R, Yang D, Nie J. Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. International journal of biological macromolecules. 2010 Mar 1;46(2):199-205.

Kumar PS, Praveen G, Raj M, Chennazhi KP, Jayakumar R. Flexible, micro-porous chitosan–gelatin hydrogel/nanofibrin composite bandages for treating burn wounds. RSC Advances. 2014;4(110):65081-7.

Shelma R, Paul W, Sharma CP. Chitin nanofibre reinforced thin chitosan films for wound healing application. Trends Biomater. Artif. Organs. 2008;22(2):111-5.

Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. Trends Biomater Artif Organs. 2004;18(1):18-23.

Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 2003 Nov 10;4(6):1457-65.

Thu HE, Zulfakar MH, Ng SF. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. International journal of pharmaceutics. 2012 Sep 15;434(1-2):375-83.

Correlo VM, Pinho ED, Pashkuleva I, Bhattacharya M, Neves NM, Reis RL. Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. Macromolecular Bioscience. 2007 Mar 8;7(3):354-63.

Pereira R, Mendes A, Bártolo P. Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications. Procedia CIRP. 2013 Jan 1;5:210-5.

Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. Nature. 1962 Jan;193(4812):293.

Fan Z, Liu B, Wang J, Zhang S, Lin Q, Gong P, Ma L, Yang S. A novel wound dressing based on Ag/graphene polymer hydrogel: effectively kill bacteria and accelerate wound healing. Advanced Functional Materials. 2014 Jul;24(25):3933-43.

Queen D. Technology update: Understanding hydrocolloids. Wounds International. 2009;1(1).

Dong Y, Hassan WU, Kennedy R, Greiser U, Pandit A, Garcia Y, Wang W. Performance of an in situ formed bioactive hydrogel dressing from a PEG-based hyperbranched multifunctional copolymer. Acta biomaterialia. 2014 May 1;10(5):2076-85.

Ahamed MI, Sastry TP. Wound dressing application of chitosan based bioactive compounds. International Journal of Pharmacy & Life Sciences. 2011 Aug 1;2(8).

Ahmadi M, Adibhesami M. The effect of silver nanoparticles on wounds contaminated with Pseudomonas aeruginosa in mice: an experimental study. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2017;16(2):661.

Dou JL, Jiang YW, Xie JQ, Zhang XG. New is old, and old is new: recent advances in antibiotic-based, antibiotic-free and ethnomedical treatments against methicillin-resistant Staphylococcus aureus wound infections. International journal of molecular sciences. 2016 May;17(5):617.

Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert review of anti-infective therapy. 2011 Jul 1;9(7):857-79.