

Evaluating the Effect of Supernatant Collected from the Culture of *Bifidobacterium bifidum* on the Increase of Angiogenesis in Acute Wound Healing

Pegah Moussavi Amin¹, Akram Sadat Tabatabaee Bafroee¹, Babak Khalili Hadad^{2*} 

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

 [10.30699/ijmm.15.5.552](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.5.552)



ABSTRACT

Background and Aim: Wound healing is the result of interactions between cytokines, growth factors, blood, and extracellular matrix. Facing this challenging issue has become one of the essential concerns in health and medical fields, needing different remedies. One of the newest treatments in wound healing is the application of probiotic bacteria. Therefore, the aim of the current study is to evaluate the effect of *Bifidobacterium bifidum* probiotic bacteria on acute wound healing and exploring the potential of their supernatant on increasing angiogenesis in female mice in the form of biological dressing.

Materials and Methods: 44 female BALB/c mice were studied into six groups in two phases of 7 and 14 days. After the wounding process, wound sizes were measured by a digital caliper every 48 hours. Mice were dressed and treated. Histological samples were studied, and the results were analyzed statistically.

Results: *Bifidobacterium b.* probiotic bacteria not only show exciting potential as a therapeutic and effective agent but also our examination proved that application of this probiotic plus Aloe vera hydrogel (experimental group 1) can significantly reduce the wound healing duration and increases angiogenesis ($P < 0.05$).

Conclusion: According to the findings of this study, the designed biological dressing, including *Bifidobacterium b.* supernatant and Aloe vera hydrogel, can be used in acute wound healing after further studies.

Keywords: Probiotic, *Bifidobacterium bifidum*, Acute wound healing, Culture supernatant

Received: 2021/03/13;

Accepted: 2021/08/13;

Published Online: 2021/09/05

Corresponding Information:

Babak Khalili Hadad, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
Tel/fax: 0989123177387, Email: khalili@riau.ac.ir



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.



Use your device to scan and read the article online

Moussavi amin P, Tabatabaee Bafroee A S, Khalili Hadad B. Evaluating the Effect of Supernatant Collected from the Culture of *Bifidobacterium bifidum* on the Increase of Angiogenesis in Acute Wound Healing. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (5) :552-568

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

1. Introduction

The skin is the largest organ and the outer covering of the body of living organisms. Any damage such as wounding to this protective organ exposes the living organism to severe risks. Wounding activates the healing process, which includes different phases regulated by multiple growth factors and cytokines released from the wound site (1,2). Various treatment methods have been proposed to treat wounds, including treatment with natural compounds or chemical drugs. However, the investigation and identification of probiotic bacteria have directed the

attention of scientific forums toward probiotic therapy.

Probiotic is derived from the Latin preposition “pro”, meaning for, and the Greek word “biotic”, meaning life (3). This term refers to living organisms with health effects on the host body if consumed in sufficient quantities. Lilly and Stillwell first used the term probiotic in 1965, but Élie Metchnikoff, a Russian immunologist, studied the therapeutic effects of bacteria in his book, ‘The Prolongation of Life’ in 1907 (4). Since then, extensive research has been

conducted on the therapeutic effects and function of probiotics. In vitro and in vivo experiments in humans and animal models have shown that probiotics can regulate the immune system in infectious, allergic, and inflammatory conditions. The most important and common probiotics belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Valdez *et al.* pointed to the effective use of probiotic *lactobacilli* to treat gastrointestinal disorders, indicating their ability to secrete acids, bacteriocins, and other by-products that can neutralize infections resulting from pathogens (5). Satish *et al.* referred to the anti-pathogenic effects of probiotic bacteria previously described by other researchers and stated that their study was the first characterization of probiotic therapy, consistent with reduced scarring (6). A study by Lolou *et al.* at the University of Newcastle showed that the use of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* could reduce skin inflammation and affect the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis (7). Another study by Walaa Mohammedsaeed (2015) at the University of Manchester investigated the therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on skin wounds through in vivo cell culture and in vitro skin culture. *Lactobacillus rhamnosus* stimulated the re-epithelialization process in both models by activating cell proliferation and migration. According to the results of this study, the therapeutic effect of *Lactobacillus rhamnosus* on cell migration and keratinocyte proliferation may lead to upregulation of *cxcl2/cxcr2* expression. These findings suggest that the *cxcl2* gene contributes significantly to the wound healing process by stimulating keratinocyte migration, proliferation, and binding (8). Mirani *et al.* (2017) developed a multifunctional dressing for wound management in their study at Victoria University. This engineered hydrogel-based dressing called GelDerm kept the wound site moist and prevented the growth of pathogenic microorganisms (9).

Although the therapeutic effects of probiotics, particularly *Lactobacillus*, on gastric ulcers and skin wounds have been studied at the national and international levels, little research has been conducted on the effect of *Bifidobacterium* spp., which has both known similarities and differences with *Lactobacillus* spp., on the healing of skin wounds. Thus, the present study took this novel approach into account and investigated the therapeutic effect of the *Bifidobacterium b.* probiotic bacterium by the application of bacterial culture supernatant in acute wound healing in female (BALB/c) mice in the form of the novel dressing design. On the other hand, Aloe vera hydrogel was used in this dressing to keep the wound moist, alleviate pain by cooling, and control side effects such as fissures in the wound site, which cause fragility and further damage.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals and Reagents

All the chemical reagents for preparing hydrogel and MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) culture to prepare supernatant are purchased from (Merck kGaA, Darmstadt, Germany). Ketamine and Xylazine (Alfasan Diergeneesmiddelen B.V, Netherland) were used to anesthetize mice. Live culture of *Bifidobacterium b.* (PTCC: 1644) was obtained from the Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, in 2020.

2.2 Preparation of *Bifidobacterium b.* Supernatant

Live culture of *B. bifidum* was plated in MRS broth (pH value 5.5), co-cultured at 37°C for 72 h, under microaerophilic condition to reach microbial suspension (3×10^8 CFU.mL⁻¹) (10). Prepared suspension incubated at 4°C for 15 min, and centrifuged at 1700 × *g*. The supernatant was separated and filtered through a 0.2µm microfilter.

2.3 Preparation of Hydrogel

0.1 gr of Methyl Paraben and 100 mL of double-distilled water with Aloe Vera gel were placed in Bain-marie at 50-60°C for 20-30 min. The mixture was passed through the Whatman Filter Paper. 100 mL of water and 10 gr of Carbopol were added, and the mixture was completely homogeneous. Finally, 4 gr of Glycerol was added and stored in the refrigerator for 24 h.

2.4 Induction of Skin Wound on Mice and treatment with drug formulation

In this study, 44 Female BALB/c mice (6-8 week-old) weighting (approximately 18-23 gr) were obtained from the Pasteur Institute, Tehran, Iran. In order to adapt to the new environment, mice were housed for one week in the Animal laboratory of the Islamic Azad University, Central Tehran Branch, in separate and sterile cages. During the study, the temperature was 22±4°C, 12 h day and night cycle with full access to water and food were considered. All the principles of keeping laboratory animals were in accordance with the ethical guidelines of the university (IR.IAU.SRB.REC.1398.118). These animals were then randomly divided into experimental, sham, controls, and healthy groups. To induce injury, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of the Ketamine 10 mg/kg and Xylazine 20 mg/kg.

After shaving the dorsal surface, 8 mm acute wound was made using biopsy punches (Kai, Japan) (11). Then the whole skin injury site was excised, and the surgery day was considered as the 0 day. Through the phases, the ethical principles were respected and prevented from any physical harm. Mice were divided into five groups considered as experimental 1, experimental 2, sham, negative and positive controls. There were five

mice in experimental 1 and 2, positive and negative control groups, and there were three mice in the sham group. Also, three mice were grouped as the healthy group. Every 48 h treatments were administrated for each mouse; 50 ml of 72 h bacterial culture supernatant with 8 mL of hydrogel prepared as a drug base for experimental group1 and Eucerin for experimental 2 were placed on sterile gas and dressed. The negative control group was untreated. Positive control only dressed with Eucerin. In the sham group, hydrogel was used for dressing. After all, wound sizes were measured by caliper every 48 hours (12).

2.5 Histological Studies

Mice were euthanized on days 7 and 14; biopsy sites were excised, fixed in 10% formalin, and processed for routine histology. The section was stained with haematoxylin – eosin (measuring the wound diameter and counting the blood vessels) photographed with a bright-field microscope (Olympus, Tokyo, Japan) (13-15).

2.6 Statistical Analysis

The results were analyzed using SPSS software version 26 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) by one-way

(ANOVA) and (Tukey) test. Values were given as the mean standard error of the mean. The *P*- values are shown as P -value< 0.05.

3. Results

Histological Studies

3.1 Measuring Wound Diameter in the Study Groups

As can be seen in figure 1, wound diameters in all groups showed a significant decrease on days 7 and 14 of the study compared to day 0 (8000 μ m). On the 7th day of this study, wound diameter was found in the negative control group 4111.10 ± 82.72 and in the positive control and sham were found 3306.48 ± 34.79 and 3024.77 ± 60.70 μ m, respectively. The wound diameters in experimental groups 1 and 2, on day 7th were measured 870.67 ± 75.30 and 2132.99 ± 78.57 , respectively. The results of the 14th day were obtained from the negative, positive and sham equivalent to 2159.97 ± 146.09 , 1373.69 ± 85.53 , and 935.50 ± 72.17 . In the case of experimental groups, wound diameters were measured $*124.23 \pm 56.2$ and $*415.08 \pm 33.04$ ($P < 0.05$).

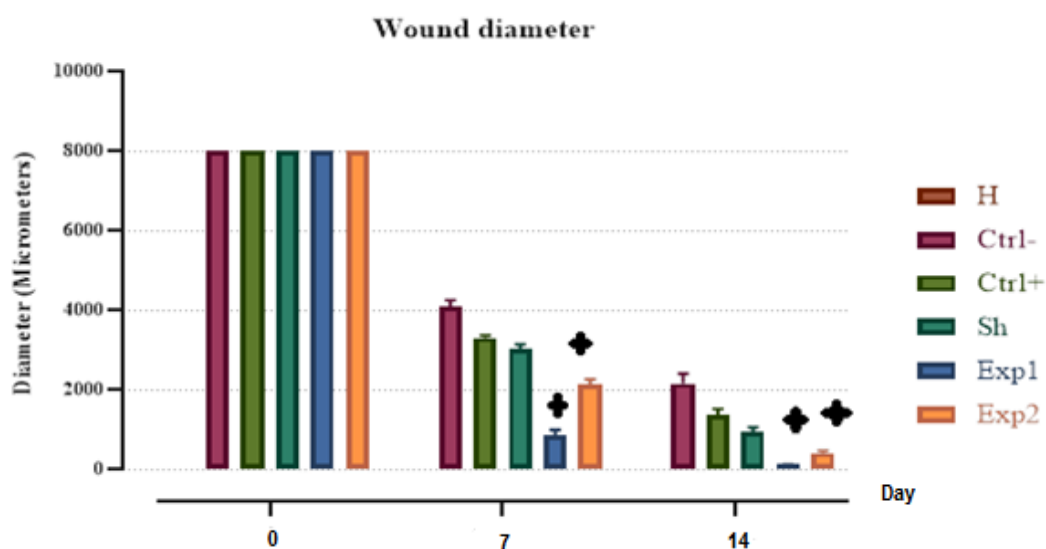


Figure 1. Wound diameter changes in different groups during the treatment period. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. The *P*- values were considered significant at $*P < 0.05$ levels.

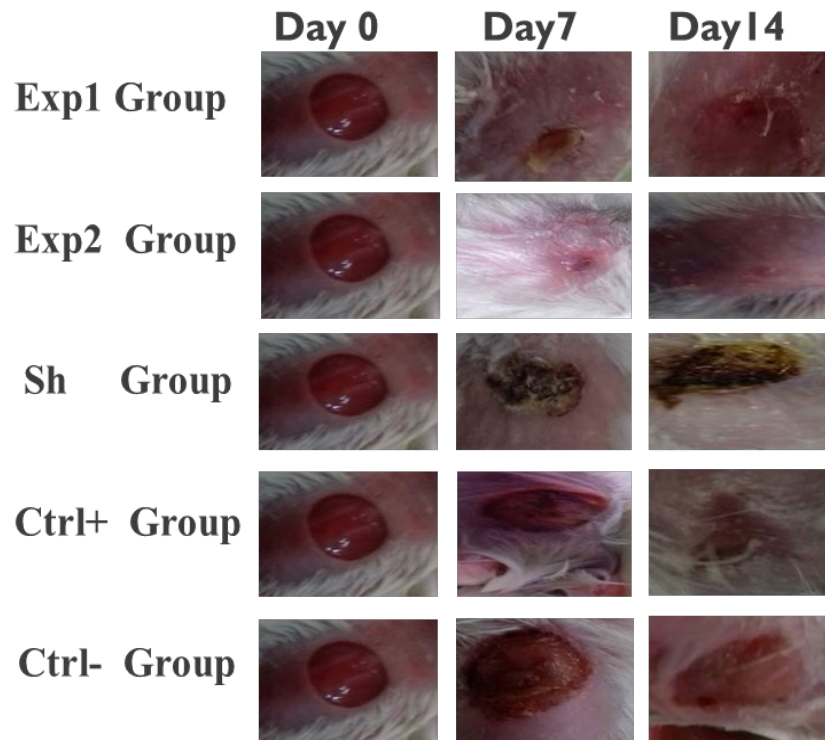


Figure 2. Macroscopic images of wound samples under different treatments at days 0, 7, and 14 of the study.

3.2 Counting blood vessels (Angiogenesis indicator)

Figure 3 shows the rate of angiogenesis indicator (in 500 μm^2) during the wound healing process in different groups on the study days. The obtained results in this study show that the rate of angiogenesis on the 7th day of the study was 2.41 ± 0.08 , 4.25 ± 0.72 , and 9.33 ± 0.30 micrometers in the negative control,

positive control, and sham groups, respectively. On 14th day of study, they changed to 4.75 ± 0.90 , 5.83 ± 0.36 , and 6.91 ± 0.36 , respectively. In case of experimental groups 1 and 2, compared to 0 day, the rate of angiogenesis on the 7th day of the study increased from 11.33 ± 0.46 to 14.33 ± 0.33 ; Also angiogenesis decreased to 11.50 ± 0.38 and 9.08 ± 0.33 on 14th day of the study ($P < 0.05$).

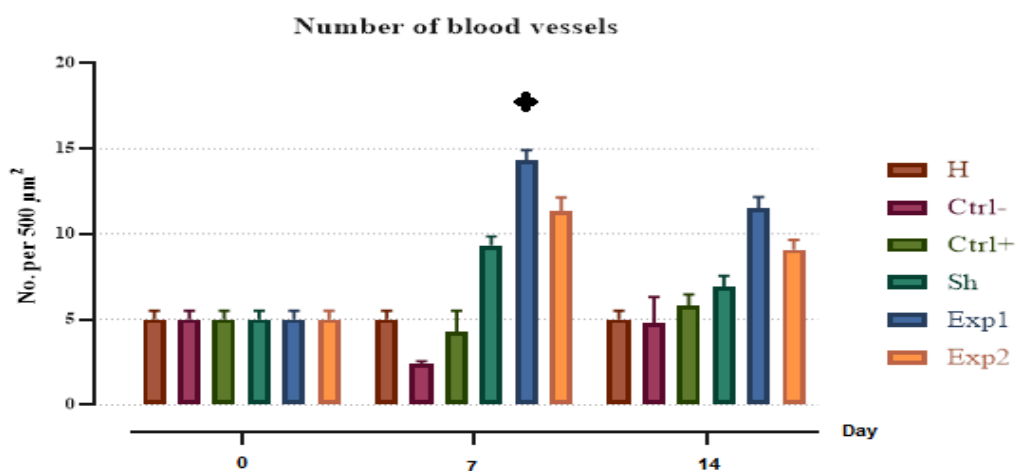


Figure 3. Changes in the number of blood vessels in different groups during the treatment process. The highest number of blood vessels belonged to experimental group1. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. The P- values were considered significant at $*P < 0.05$ levels.

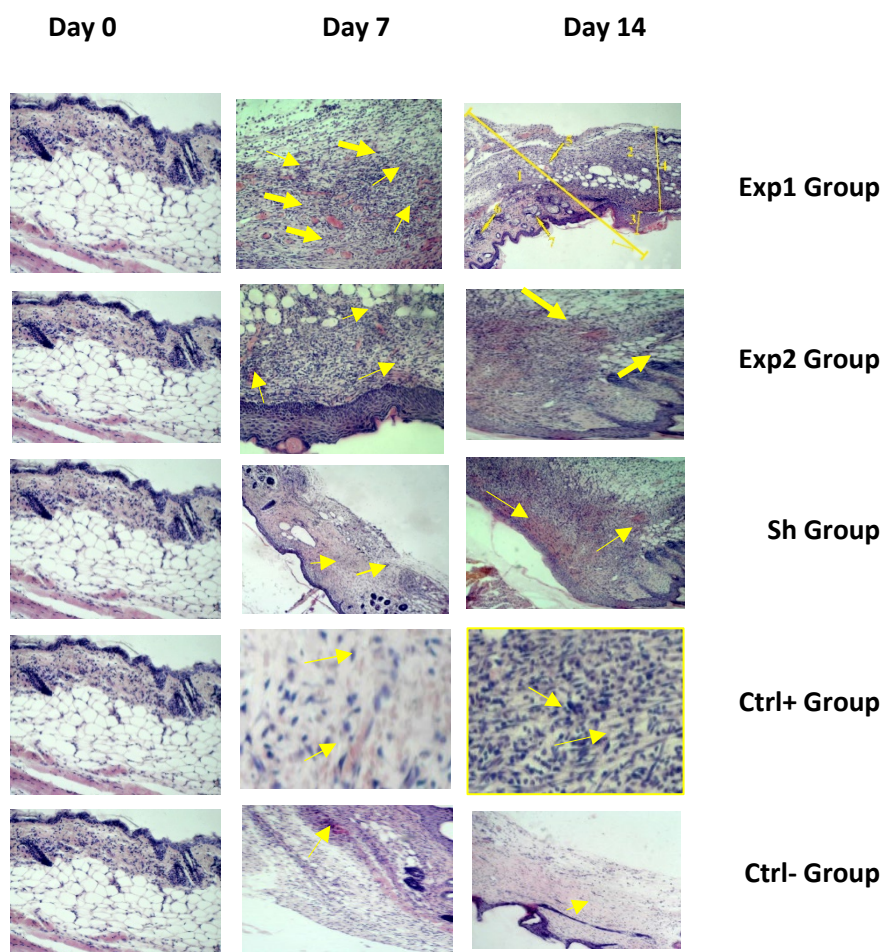


Figure (4) Microscopic images of the wound section. In the study groups during 14 days of study. Tissue samples were stained with hematoxylin- eosin and tissue images were photographed with Olympus microscope on days 0, 7, and 14 of the study. Yellow arrows in groups indicate blood vessels. The highest number of blood vessels was seen on day 7 in the experimental group1. A section of different parts of skin belongs to experimental group 1, numbered on the 14 day of study is in the following figure: 1. Healthy skin, 2. Wound location, 3. Epidermis, 4. Dermis, 5. Blood vessel, 6. Hair follicle, 7. Sebaceous glands

4. Discussion

This study aimed to investigate the effect of probiotic bacteria on the duration of acute wound healing. Hence, an experiment was designed to determine the most effective indicator of acute wound healing by measuring various qualitative indicators according to the known mechanisms of wound healing. Regarding numerous studies previously conducted on *Lactobacilli* in healing gastrointestinal ulcers and scarce research on the role of *bifidobacteria* in healing skin wounds, the study focused on the potential role of *Bifidobacterium b.* probiotic bacteria to reduce the duration of the treatment. Previous studies have employed probiotic bacteria in various forms, such as extracts and cell lysates (8, 16). Given the possible toxic and fatal

effects of living probiotic bacteria in the blood, the topical application of supernatant resulting from bacterial cell culturing could be more appropriate in terms of stability at room temperature compared to live cells, making it suitable for *in vitro* and *in vivo* studies (8, 17). This experiment would rather use bacterial culture supernatant instead of living bacteria. A study by Walaa Mohammedsaeed (2015) at the University of Manchester also showed that lysed *Lactobacillus rhamnosus G.G* did not have harmful effects as the live bacteria. Moreover, lysed probiotics are more cost-effective for the treatment of skin infections, as there is no need to preserve living bacteria (8).

The *in vitro* experiment of the current study examined 44 female BALB/c mice in six groups. The results of this experiment were analyzed concerning the indicators of wound diameter and number of blood vessels, assessed by macroscopic studies and calculated by histological studies along with statistical analysis, respectively. Reduction in the wound size and depth is a determining indicator during the healing period. This important repair response begins in the proliferative phase with the migration of fibroblasts and myofibroblasts to the wound. Proliferation and production of matrix and procollagen proteins 1 and 3 at the end of the first post-injury week and extracellular matrix density later support cell migration and the repair process. Wound contraction occurs with the removal of fibroblasts. In the remodeling phase, collagen is regenerated, wounds are completely consolidated, and collagen fibers are intertwined to reduce the scar thickness (18, 19).

The present study showed that the application of the probiotic *Bifidobacterium b.* led to the reduction of treatment duration. The data obtained in accordance with cellular and molecular mechanisms of wound healing showed the most significant decrease in the indicator of wound diameter in the experimental groups compared to sham, positive, and negative control groups ($P < 0.05$) (Figure 1). A comparison of the experimental groups 1 and 2 indicated more and faster healing response of wound contraction in experimental group 1 ($P < 0.05$) with the smaller wound size on the seventh day of the treatment. The probiotic agent seemed to shorten the duration of the inflammatory phase, leading to faster onset of fibroblasts migration and proliferation phase. Previous studies have mentioned the role of Toll-like receptors (TLRs) expression in neutrophils, fibroblasts, monocytes, and macrophages in the repair process. Researchers believe that these may be due to probiotic function through TLRs that play a key role in the innate immune system (20).

Angiogenesis and vasculogenesis play a crucial role in wound healing. Neovascularization or angiogenesis is involved in the growth of new capillaries to form granular tissue. Three to five days after tissue damage, the capillaries become visible as granular tissue forms on the wound site, functioning as a network for blood vessel proliferation, fibroblast migration, and new collagen (21,22). Any factor that can accelerate the formation of blood vessels in the wound and establish blood circulation to the tissue area helps to stimulate the wound healing process and prevent the wound deepening. In this study, the culture supernatant of the *Bifidobacterium b.* showed the potential to increase angiogenesis in the experimental groups. Hence, a comparison of the experimental group 1 and the sham group showed that despite the common

hydrogel composition in both dressings and the antibacterial and antiviral properties of the constituents of hydrogels (23,24) in preventing microbial growth and reducing inflammation and pain (8,25), the experimental group 1 has a better performance in the process of wound healing and angiogenesis because of the probiotic agent.

As the results show, experimental groups 1 and 2 had the highest angiogenesis on the 7th day, respectively, compared to the control groups. This result suggests that the increase in angiogenesis is due to the probiotic bacterium *Bifidobacterium b.* function. It is well known that the rate of angiogenesis in granular tissue reaches its peak around the 7th day of injury, after which the blood vessels are gradually destroyed. In this experiment, the highest rate of angiogenesis occurred on the 7th day of treatments in experimental group 1, which is consistent with previous studies ($P < 0.05$). Given the ascending trend of angiogenesis until the 7th day of the injury, such as what happens in the proliferative phase, and its gradual decline, the quantitative index of blood vessels follows a decreasing trend from the 7th to 14th day of the study in the experimental groups, which is consistent with re-epithelialization phase (Figure 2) ($P < 0.05$). The use of bacterial culture supernatant also seems to act as a stimulant and increase angiogenesis (Figure 2). Previous studies have shown that it is possible to improve angiogenesis by activated macrophages and epidermal tissue. Until recently, acid or basal fibroblast growth factors seemed to be responsible for such activities, but it is now clear that other molecules such as vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenin, and angiopoietin are involved in angiogenic activities (19). Keratinocytes produce VEGF from the early to the final stages of wound healing. Activated fibroblasts, mast cells, and macrophages express VEGF in injured skin. In fact, myeloid cells (monocytes and macrophages) are the major source of VEGF in the post-injury stages. Studies have also shown the effects of both keratinocyte-derived and myeloid cell-derived VEGF on wound healing (26). It also seems that the tissue stimulates macrophages to secrete VEGF in the face of hypoxia (8). Studies on mouse models have shown that a lack of VEGF in myeloid cells and keratinocytes delays wound contraction, decreases blood vessel density, and reduces granular tissue formation. Low levels of oxygen in injured skin activate the Hypoxia Inducible Factor, leading to VEGF gene transcription (26). A study in mice showed that probiotics increased the expression of VEGF and TGF- β (27).

As shown by Halper *et al.*, *Lactobacillus* extract stimulates the production of TNF- α and angiogenesis in the inflammatory phase of tissue repair as inflammatory cells such as macrophages, lymphocytes,

and plasma cells support pro-inflammatory processes (28).

According to the intragroup comparison of experimental groups 1 and 2 in the present study, Eucerin did not contribute to wound healing and the increasing number of blood vessels. There are no reports on the antibacterial or antiviral properties of Eucerin, which softens and relieves dry skin. Therefore, a careful comparison of the groups showed that although the bacterial culture supernatant coupled with Eucerin affected the wound healing process, the use of this liquid with hydrogel had the greatest effect on wound healing and angiogenesis ($P < 0.05$). No infection was observed in the experimental groups of the present study as probiotics prevented wound infection by antimicrobial mechanisms, including secretion of antimicrobial peptides, inhibition of bacterial invasion, and inhibition of pathogenic bacteria adhesion to epithelial cells (29). On the other hand, the intra-group comparisons of the control groups also showed no significant differences in the wound diameter and the number of blood vessels in the group receiving no treatment (negative control) and the group receiving Eucerin dressing (positive control).

In general, as the results of this study showed, increased angiogenesis and decreased wound diameter was consistent with previous studies (5, 6), while the probiotic bacterium *Bifidobacterium b.* reduced the duration of treatment. It is well known that time plays a crucial role in reducing or increasing the outcomes of wounding (30, 31). Given the significant decrease in the wound diameter and increase in angiogenesis of the experimental groups on the 7th day, it seems that shorter phases of three, five, seven, and nine days (32) may help determine a more accurate interval for these two indicators in future studies. It is also possible to use the bacterial culture supernatant of *Bifidobacterium b.* probiotic bacterium alone and investigate its effects.

References

1. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, skin (integument), epidermis. 2017.
2. Jimi S, Jaguparov A, Nurkesh A, Sultankulov B, Saparov A. Sequential delivery of cryogel released growth factors and cytokines accelerates wound healing and improves tissue regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:345 (DOI:10.3389/fbioe.2020.00345) (PMID) (PMCID)
3. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health.

5. Conclusion

According to the results of the current study, the probiotic bacterium *Bifidobacterium b.* reduces wound diameter, increases angiogenesis, and decreases the duration of the treatment significantly ($P < 0.05$). This study, which is in line with research on the therapeutic effects of probiotics in scientific and academic centers of Iran and other parts of the world (8), indicates the effectiveness and usefulness of this therapeutic method. Besides, this study shows that the bacterial culture supernatant of *Bifidobacterium b.* probiotic bacterium can be an alternative and reliable treatment. Thus, it is possible to use the designed biological dressing containing bacterial culture supernatant of *Bifidobacterium b.* probiotic bacterium and Aloe vera hydrogel to treat acute wounds after further studies.

Acknowledgment

This current research article has been adapted from the dissertation of Ms. Pegah Moussavi Amin with University code number 33262. The ethical instructions were approved by the Vice-Chancellor for Research and Technology of the Islamic Azad University, East Tehran Branch. Also, thanks go to everyone who has helped us to achieve this important goal.

Author Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest concerning this manuscript.

Funding

This article is an independent study that was conducted without organizational financial support.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

Nutrients. 2017;9(9):1021.

(DOI:10.3390/nu9091021) (PMID) (PMCID)

4. Zommiti M, Feuilloy MG, Connil N. Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*. 2020;8(12):1907. (DOI:10.3390/microorganisms8121907) (PMID) (PMCID)
5. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*. 2019;10(suppl_1):S49-S66.

- ([DOI:10.1093/advances/nmy063](https://doi.org/10.1093/advances/nmy063)) (PMID) (PMCID)
6. Satish L, Gallo PH, Johnson S, Yates CC, Kathju S. Local probiotic therapy with *Lactobacillus plantarum* mitigates scar formation in rabbits after burn injury and infection. *Surg infections*. 2017;18(2):119-27. ([DOI:10.1089/sur.2016.090](https://doi.org/10.1089/sur.2016.090)) (PMID) (PMCID)
 7. Lolou V, Panayiotidis MI. Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Ferment Technol*. 2019;5(2):41. ([DOI:10.3390/fermentation5020041](https://doi.org/10.3390/fermentation5020041))
 8. Mohammedsaeed W. Characterisation of the potential of probiotics or their extracts as therapy for skin: The University of Manchester (United Kingdom); 2015.
 9. Mirani B, Pagan E, Currie B, Siddiqui MA, Hosseinzadeh R, Mostafalu P, et al. An advanced multifunctional hydrogel-based dressing for wound monitoring and drug delivery. *Adv Healthc*. 2017;6(19):1700718. ([DOI:10.1002/adhm.201700718](https://doi.org/10.1002/adhm.201700718)) (PMID) (PMCID)
 10. Saberian M, Delshad ES, Habibi M. The Effect of *Bifidobacterium Bifidum* Supernatant and Cell Mass on the Proliferation Potential of Rat Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *IJMS*. 2020;45(4):269.
 11. Masson-Meyers DS, Andrade TA, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int j Exp Pathol*. 2020;101(1-2):21-37. ([DOI:10.1111/iep.12346](https://doi.org/10.1111/iep.12346)) (PMID) (PMCID)
 12. Yasuda K, Ogushi M, Nakashima A, Nakano Y, Suzuki K. Accelerated wound healing on the skin using a film dressing with β -glucan paramylon. *In Vivo*. 2018;32(4):799-805. ([DOI:10.21873/invivo.11310](https://doi.org/10.21873/invivo.11310)) (PMID) (PMCID)
 13. Hesari AK, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Saboory E. Crocin prevention of anemia-induced changes in structural and functional parameters of mice testes. *J. Appl. Biomed*. 2015;13(3):213-23. ([DOI:10.1016/j.jab.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.02.001))
 14. Shahrooz R, Agh N, Jafari N, Kalantari A, Jalili R, Karimi A. Effects of fish oil replacement with vegetable oils in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings diet on growth performance and foregut histology. *Turkish J. Fish. Aquat Sci*. 2018;18(6):825-32. ([DOI:10.4194/1303-2712-v18_6_09](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_6_09))
 15. Gurina TS, Simms L. *Histology, Staining*. 2020.
 16. Farghali H, Canová NK, Zakhari S. Hepatoprotective properties of extensively studied medicinal plant active constituents: possible common mechanisms. *Pharm Biol*. 2015;53(6):781-91. ([DOI:10.3109/13880209.2014.950387](https://doi.org/10.3109/13880209.2014.950387)) (PMID)
 17. Brandi J, Cheri S, Manfredi M, Di Carlo C, Vanella VV, Federici F, et al. Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-14. ([DOI:10.1038/s41598-020-68483-4](https://doi.org/10.1038/s41598-020-68483-4)) (PMID) (PMCID)
 18. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J. Leukoc Biol*. 2016;100(5):979-84. ([DOI:10.1189/jlb.4MR0316-102R](https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R)) (PMID) (PMCID)
 19. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA, editors. *Angiogenesis in wound healing*. JIDSP; 2000: Elsevier. ([DOI:10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x](https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x)) (PMID)
 20. Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Leichtle A, Yang Y, Cogen AL, et al. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med*. 2009;15(12):1377-82. ([DOI:10.1038/nm.2062](https://doi.org/10.1038/nm.2062)) (PMID) (PMCID)
 21. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;146:97-125. ([DOI:10.1016/j.addr.2018.09.010](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.010)) (PMID) (PMCID)
 22. Honnegowda TM, Kumar P, Udupa EGP, Kumar S, Kumar U, Rao P. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Aesthetic Plast Surg*. 2015;2:243-9. ([DOI:10.4103/2347-9264.165438](https://doi.org/10.4103/2347-9264.165438))
 23. Teplicki E, Ma Q, Castillo DE, Zarei M, Hustad AP, Chen J, et al. The Effects of Aloe vera on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. 2018;30(9):263-8.
 24. Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I, Gómez-Serranillos MP. Pharmacological update properties of Aloe vera and its major active constituents. *Molecules*. 2020;25(6):1324. ([DOI:10.3390/molecules25061324](https://doi.org/10.3390/molecules25061324)) (PMID) (PMCID)

25. Darzi S, Paul K, Leitan S, Werkmeister JA, Mukherjee S. Immunobiology and Application of Aloe vera-Based Scaffolds in Tissue Engineering. *Int. J. Mol.* 2021;22(4):1708. ([DOI:10.3390/ijms22041708](https://doi.org/10.3390/ijms22041708)) ([PMID](#)) ([PMCID](#))
26. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv wound care.* 2014;3(10):647-61. ([DOI:10.1089/wound.2013.0517](https://doi.org/10.1089/wound.2013.0517)) ([PMID](#)) ([PMCID](#))
27. Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov H, Davis SC, et al. Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regen.* 2017;25(6):912-22. ([DOI:10.1111/wrr.12607](https://doi.org/10.1111/wrr.12607)) ([PMID](#)) ([PMCID](#))
28. Halper J, Leshin L, Lewis S, Li W. Wound healing and angiogenic properties of supernatants from Lactobacillus cultures. *Exp. Biol Med.* 2003;228(11):1329-37. ([DOI:10.1177/153537020322801111](https://doi.org/10.1177/153537020322801111)) ([PMID](#))
29. Sinha A, Sagar S, Madhumathy M, Osborne WJ. Probiotic Bacteria in Wound Healing; An In-Vivo Study. *Iranian Journal of Biotechnology.* 2019;17(4):e2188.
30. Nagle SM, Waheed A, Wilbraham SC. Wound Assessment. *StatPearls (Internet).* 2020.
31. Kuru B. The adventure of axillary treatment in early stage breast cancer. *Eur. J. Breast Health.* 2020;16(1):1. ([DOI:10.5152/ejbh.2019.5157](https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.5157)) ([PMID](#)) ([PMCID](#))



بررسی تأثیر مایع رویی کشت باکتری بیفیدوباکتریوم بر افزایش رگزایی در ترمیم زخم حاد پگه موسوی امین^۱، اکرم سادات طباطبایی بفرویی^۱، بابک خلیلی حداد^{۲*}

۱. گروه زیست شناسی، واحد تهران - شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۶/۱۴

موضوع: باکتری شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

بابک خلیلی حداد، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

ایمیل:

khalili@riau.ac.ir

مقدمه

زمینه و اهداف: درمان زخم نتیجه تعاملات میان سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، خون و ماتریکس خارج سلولی است. رویارویی با این مسئله چالش برانگیز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های حوزه سلامت و پزشکی، راهکارهای درمانی متعددی را می‌طلبد. یکی از جدیدترین روش‌های درمانی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک است. هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در ترمیم زخم و کشف توان بالقوه مایع رویی کشت باکتری در افزایش رگزایی در موش ماده در قالب طراحی پانسمان بیولوژیک است.

مواد و روش کار: در این تحقیق ۴۴ موش ماده BALB/c در شش گروه و در دو فاز هفت و چهارده روزه مطالعه شدند. پس از ایجاد جراحت، ناحیه زخم هر ۴۸ ساعت با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. موش‌ها تیمار و پانسمان شدند. نمونه‌های بافت‌شناسی مطالعه و داده‌ها به‌صورت آماری بررسی گردید.

یافته‌ها: بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نه تنها توان بالقوه خود را به‌عنوان عامل درمانی نشان داد بلکه آزمایش ما اثبات کرد که استفاده از باکتری به همراه هیدروژل (گروه تجربی ۱) به‌طور چشمگیری طول درمان را کاهش می‌دهد و رگزایی را افزایش می‌دهد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این مطالعه، پانسمان بیولوژیک طراحی شده شامل باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و هیدروژل آئونه ورا بعد از مطالعات بیشتر می‌تواند در درمان زخم‌های حاد استفاده شود.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، ترمیم زخم حاد، مایع رویی کشت

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

کار بردند اما الی مچنیگف، ایمنی شناس روس در سال ۱۹۰۷ بود که در کتاب «طول عمر (The prolongation of life)» به مطالعه اثر درمانی باکتری‌ها پرداخت (۴). از آن هنگام تاکنون، تحقیقات دامنه داری درباره اثرات درمانی و نحوه عمل پروبیوتیک‌ها صورت گرفته است. آزمایشات برون‌تنی (*in vitro*) و درون‌تنی (*in vivo*) در انسان و مدل‌های حیوانی نشان داده است که پروبیوتیک‌ها قادر به تنظیم سیستم ایمنی در وضعیت‌های عفونی، آلرژیک و التهابی هستند. مهمترین و مرسوم ترین پروبیوتیک‌ها به جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تعلق دارند. مطالعات والدز و همکاران (Valdez et al.) با اشاره به استفاده مؤثر از لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک در درمان اختلالات گوارشی، توانایی آنها را در ترشح اسیدها، باکتریوسین‌ها و دیگر محصولات فرعی که می‌توانند عفونتهای ناشی از پاتوژن‌ها را خنثی کنند نشان دادند (۵). ساتیش و همکاران (Satish et al.) با اشاره به اثرات ضد پاتوژنی باکتری‌های پروبیوتیک که پیشتر توسط دیگر محققان

پوست بزرگترین عضو بدن است که پوشش خارجی بدن موجودات زنده را تشکیل می‌دهد. صدمه به این عضو محافظ بدن، به طور مثال ایجاد زخم، موجود زنده را در معرض خطرات جدی قرار می‌دهد. در پی ایجاد زخم فرآیند ترمیم مطرح می‌گردد که شامل فازهای مختلفی است. این فازها از طریق فاکتورهای رشد چنگانه و سایتوکاین‌های آزاد شده از محل زخم، تنظیم می‌شوند (۱، ۲). برای درمان زخم تاکنون شیوه‌های متعدد درمانی از قبیل درمان با ترکیبات طبیعی و یا داروهای شیمیایی مطرح بوده است. اما امروزه با شناسایی و مطالعه باکتریهای پروبیوتیک، روش پروبیوتیک درمانی نیز در مجامع علمی مورد توجه قرار گرفته است. پروبیوتیک از کلمه لاتین «Pro» به معنی برای و کلمه یونانی «Biotic» به معنی زندگی مشتق شده است (۳). این اصطلاح به ارگانیسم‌های زنده ای اطلاق می‌شود که در صورت مصرف به میزان کافی، دارای اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می‌باشند. نخستین بار لیلی و استیلول واژه پروبیوتیک را در سال ۱۹۶۵ به

مواد و روش‌ها

۲.۱ مواد شیمیایی و معرف‌ها

کلیه مواد شیمیایی برای تهیه هیدروژل و محیط کشت MRS براث برای تهیه مایع رویی کشت باکتری از شرکت مرک (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) تهیه شد. داروهای کتامین و زایلازین از شرکت آلفاسان (Alfasan Diergeneesmiddelen B.V, Netherland) خریداری شدند. کشت زنده باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ۱۶۴۴ PTCC از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتریهای ایران تهیه شد.

۲.۲ آماده‌سازی مایع رویی کشت باکتری باکتری

پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم

باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در محیط کشت MRS براث با pH ۵/۵ کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوایی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌گذاری شد تا سوسپانسیون میکروبی با کدورتی معادل ۱ مک فارلند ($10^8 \times 3$) بدست آید (۱۰). سپس سوسپانسیون بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۷۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. برای اطمینان از نبود باکتری، مایع رویی کشت از فیلتر غشائی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد.

۲.۳ تهیه هیدروژل

۰/۱ گرم متیل پارابن به همراه ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ژل آلونه ورا در بن ماری با دمای ۶۰-۵۰ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مخلوط حاصل از کاغذ صافی واتمن (شماره ۱) عبور داده شد و در مرحله بعد ۱۰۰ میلی لیتر آب و ۱۰ گرم کارباپول اضافه گردید و ترکیب به طور کامل همگن شد. در انتها به ترکیب ۴ گرم گلیسرول اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد.

۲.۴ ایجاد زخم پوستی در موش‌ها و تیمار با

فرمولاسیون‌های دارویی

در این تحقیق، ۴۴ موش ماده BALB/c (۶-۸ هفته ای) با وزن تقریبی ۲۳-۱۸ گرم از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. به منظور سازگاری با محیط جدید موش‌ها یک هفته در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز و در قفس‌های مجزا و قابل استریل نگهداری شدند. در طول مدت تحقیق، دمای 4 ± 22 درجه سلسیوس، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی همراه با دسترسی کامل به آب و غذا

توضیح داده شده است، تصریح می‌کنند که مطالعه آن‌ها اولین توصیف از باکتری درمانی پروبیوتیک بوده است که می‌تواند شکل‌گیری اسکار را کاهش دهد (۶). مطالعه Lolou و همکاران نیز در دانشگاه نیوکاسل نشان داد که کاربرد لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها سبب کاهش التهابات پوستی می‌شود و در درمان درماتیت آتوپیک و درماتیت تماسی آلرژیک اثر بخش است (۷). در مطالعه‌ای دیگر توسط Walaa در دانشگاه منچستر در سال ۲۰۱۵ اثر درمانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر زخم پوستی از طریق دو مدل متفاوت کشت سلول درون‌تنی و کشت پوست برون‌تنی بررسی گردید. در هر دو مدل، لاکتوباسیلوس رامنوسوس فرآیند اپیتلیال‌سازی مجدد را از طریق فعال‌سازی مهاجرت و تکثیر سلول تحریک کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که اثر درمانی لاکتوباسیلوس رامنوسوس در مهاجرت سلولی و تکثیر کراتینوسیت‌ها احتمالاً به بیش تنظیمی ژن‌های *cxc12/cxcr2* می‌انجامد. این یافته‌ها حاکی از آن است که ژن *cxc12* نقش بسیار مهمی در فرآیند ترمیم زخم مانند تحریک مهاجرت کراتینوسیت‌ها، تکثیر و اتصال دارد (۸). در مطالعه‌ای که توسط Mirani و همکاران نیز در دانشگاه ویکتوریا در سال ۲۰۱۷ صورت گرفت، پانسمانی چند منظوره برای مدیریت زخم ساخته شد. پانسمانی مهندسی شده با نام ژل درم که بر پایه هیدروژل بود. این پانسمان بستر زخم را مرطوب نگه می‌داشت و از رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا جلوگیری می‌نمود (۹).

با وجودی که اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها و به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها بر زخم‌های گوارشی و پوستی در مطالعات داخلی و خارجی بررسی گردیده، اما تاکنون، تحقیقات اندکی بر تأثیر بیفیدوباکتریوم‌ها که شباهت‌ها و تفاوت‌های شناخته شده‌ای با لاکتوباسیلوس‌ها دارند، بر ترمیم زخم‌های پوستی صورت گرفته است. بنابراین، مطالعه حاضر با توجه به این رویکرد نوین، با بررسی تأثیر درمانی باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم از طریق مداخله مایع رویی کشت باکتری در ترمیم زخم حاد در موش‌های ماده (BALB/c)، در قالب طراحی پانسمانی نوین، این مهم را مورد آزمایش و ارزیابی قرار داده است. از سوی دیگر، به منظور کنترل عوارض جانبی‌ای مانند ترک‌خوردگی بستر زخم که موجب شکنندگی و آسیب مجدد می‌گردد، همچنین مرطوب نگه داشتن زخم و کاهش درد از طریق خنک‌کنندگی، در این پانسمان استفاده از هیدروژل آلونه ورا در نظر گرفته شد

مقاطع بافتی، لام تهیه شد. لام‌ها با رنگ همتاکسیلین- ائوزین برای مطالعات بافت شناسی (اندازه گیری قطر زخم و شمارش عروق خونی) رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ زمینه روشن (Olympus, Tokyo, Japan) عکس برداری شدند (۱۳-۱۵).

۲.۶. آنالیزهای آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه آنوا (ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) بررسی و به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. معیار استنتاج آماری، $P\text{-value} < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطالعات بافت شناسی

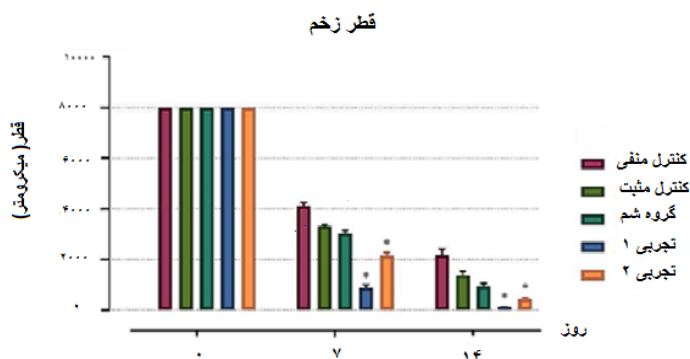
۳.۱ اندازه گیری قطر زخم در گروه‌های مورد مطالعه

همانطور که در شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، قطر زخم در تمام گروه‌ها به جز گروه کنترل منفی کاهش معنی داری در روزهای ۷ و ۱۴ مطالعه نسبت به روز صفر ($8000 \pm 0/00$ میکرومتر) نشان داد. قطر زخم در روز هفتم مطالعه در گروه کنترل منفی $82/72 \pm 4111/10$ میکرومتر و در گروه‌های کنترل مثبت و شم به ترتیب $34/79 \pm 3306/48$ و $60/70 \pm 3024/77$ میکرومتر به دست آمد. قطر زخم در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ در روز هفتم به ترتیب معادل $75/30 \pm 870/67$ و $2132/99 \pm 78/57$ میکرومتر اندازه گیری شد. نتایج روز چهاردهم در مورد گروه‌های کنترل منفی، مثبت، شم به ترتیب معادل $1373/69 \pm 72/17$ و $935/50 \pm 2159/97$ میکرومتر به دست آمد و در مورد گروه‌های تجربی ۱ و ۲ به ترتیب $56/2 \pm 124/23$ و $33/04 \pm 415/08$ میکرومتر بود ($P < 0.05$).

در نظر گرفته شد و تمام اصول نگهداری حیوانات آزمایشگاهی (کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.118) رعایت شد. پس این حیوانات به طور تصادفی، در گروه‌های تجربی، شم^۱، کنترل و گروه سالم تقسیم شدند. به منظور ایجاد زخم، موش‌ها از طریق تزریق درون صفاقی با داروی کتامین (100 mg/kg)، زایلازین (20 mg/kg) بیهوش گردیدند. پس از تراشیدن موهای ناحیه پشتی و استریل نمودن پوست این ناحیه با الکل، زخمی با ابعاد 8000 میکرومتر با پانچ بیوپسی 8 میلیمتری (Kai, Japan)، بر روی ناحیه تراشیده شده به صورت ضخیم (Full-Thickness) ایجاد شد (۱۱). سپس سطح پوست در ناحیه زخم به طور کامل جدا گردید و روز جراحی، روز صفر در نظر گرفته شد. در مراحل مختلف آزمایش ضمن رعایت مسائل اخلاقی سعی شد از هر گونه آزار جسمی اجتناب گردد. موش‌ها در پنج گروه تجربی ۱، تجربی ۲، شم، کنترل‌های منفی و مثبت تقسیم شدند که در گروه‌های تجربی ۱ و ۲، ۵ سر موش، گروه‌های کنترل مثبت، منفی و شم ۳ سر موش وجود داشت. همچنین یک گروه شامل موش‌های سالم با ۳ سر موش نیز در نظر گرفته شد. تیمارها هر ۴۸ ساعت یکبار به ازاء هر موش 50 میلی‌لیتر از مایع رویی کشت 72 ساعته باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به همراه 8 میلی‌لیتر از هیدروژل تهیه شده به عنوان پایه دارویی برای گروه تجربی ۱ و اوسرین برای گروه تجربی ۲ بر روی گاز استریل طبی 100 درصد پنبه قرار داده و پانسمان شد. گروه کنترل منفی هیچ گونه درمانی نگرفتند. گروه کنترل مثبت فقط با اوسرین پانسمان شدند. در گروه شم از هیدروژل برای پانسمان استفاده شد. سپس ابعاد زخم‌ها هر ۴۸ ساعت به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد (۱۲).

۲.۵ مطالعات بافت شناسی

پس از کشتن موش‌ها در روزهای هفت و چهارده مطالعه، نمونه گیری انجام شد. نمونه‌های بافتی در فرمالین 10 درصد نگهداری و از



شکل ۱. تغییرات اندازه قطر زخم در گروه‌های مختلف در طول دوره تیمار. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. معیار استنتاج آماری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

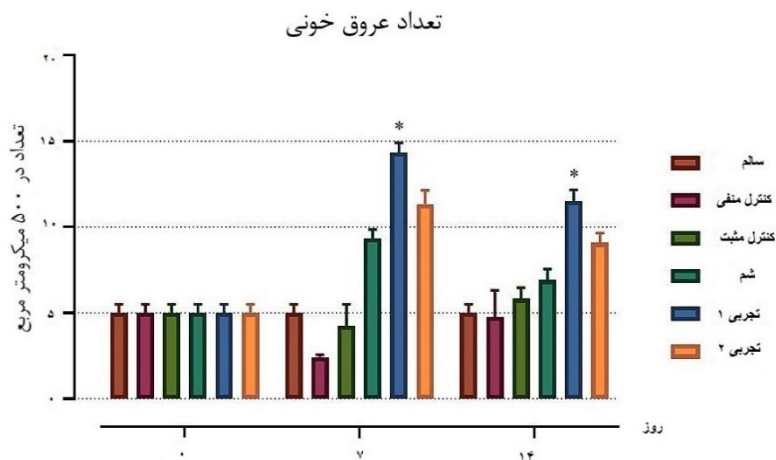
1. Sham Group



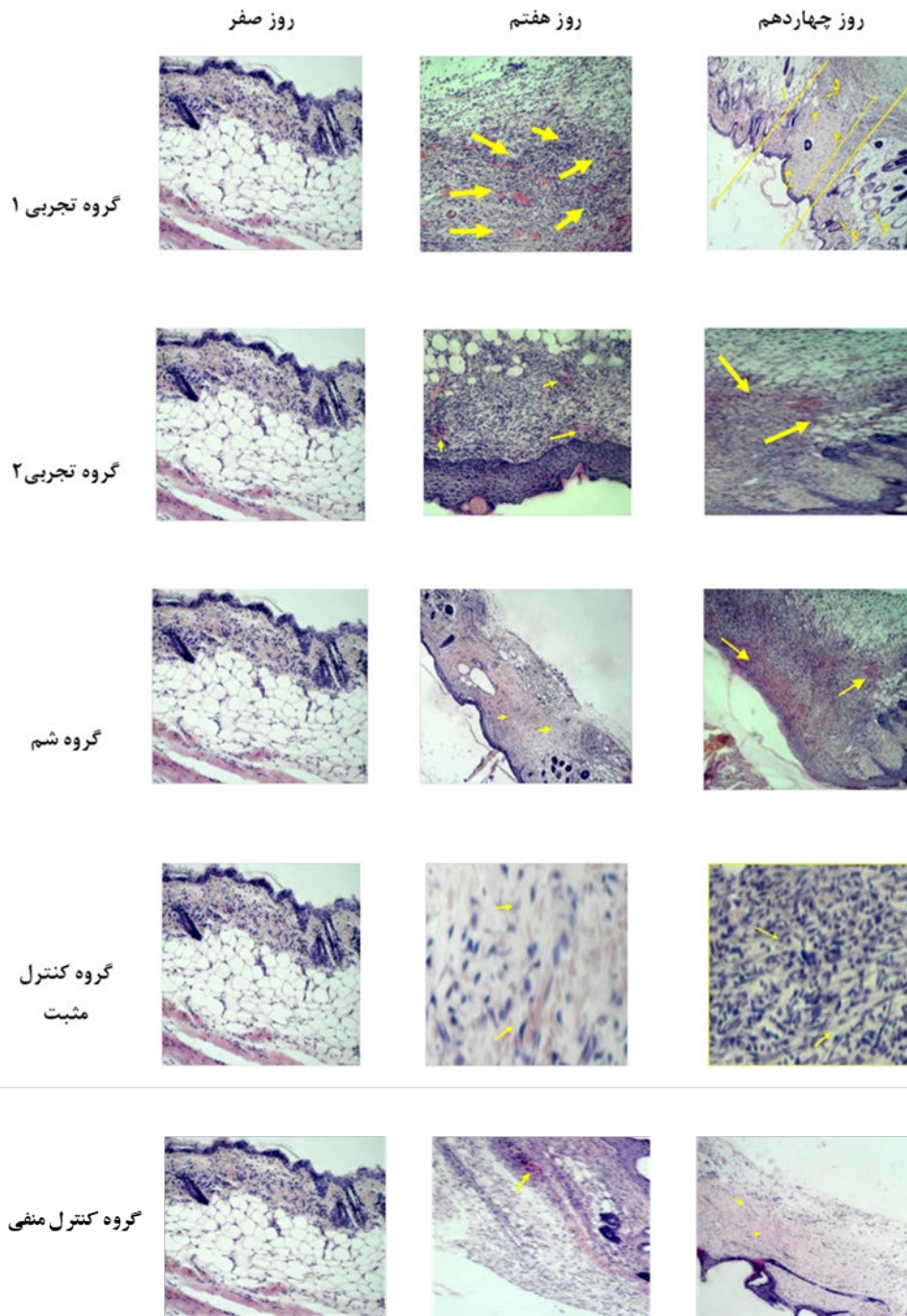
شکل ۲. تصاویر ماکروسکوپی نمونه‌های زخم تحت تیمارهای مختلف در روزهای ۷، ۱۴ مطالعاتی

چهاردهم به ترتیب به 0.90 ± 0.75 ، 0.36 ± 0.83 و 0.36 ± 0.36 \pm ۶/۹۱ میکرومتر تغییر یافتند. در مورد گروه‌های تجربی ۱ و ۲ میزان رگزایی در روز هفتم مطالعه نسبت به روز صفر از 0.46 ± 0.33 به 0.33 ± 0.33 * $14/33$ میکرومتر افزایش یافتند و در روز چهاردهم به ترتیب به 0.38 ± 0.50 و 0.33 ± 0.08 میکرومتر کاهش یافتند.

شکل ۳ میزان شاخص رگزایی (در 500 میکرومتر مربع) را در طی روند التیام زخم در گروه‌های مختلف و در روزهای مورد بررسی نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده در این تحقیق، نشان می‌دهند که به ترتیب در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و شم میزان رگزایی در روز هفتم مطالعه به ترتیب 0.08 ± 0.41 ، 0.72 ± 0.25 و 0.30 ± 0.33 میکرومتر بدست آمد که در روز



شکل ۳. تغییرات تعداد عروق خونی در گروه‌های مختلف در طول دوره تیمار. بیشترین میزان تعداد عروق خونی مربوط به گروه تجربی ۱ بود. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. معیار استنتاج آماری، $P < 0.05$ * در نظر گرفته شد.



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپی از مقطع زخم در گروه‌های مورد بررسی در طی چهارده روز مطالعه. نمونه‌های بافتی با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند و تصاویر بافتی با میکروسکوپ Olympus در روزهای ۷، ۱۴ و مطالعاتی تهیه گردیدند. فلش‌های زرد رنگ در گروه‌ها عروق خونی را نشان می‌دهند. بیشترین تعداد عروق خونی در روز ۷ در گروه تجربی ۱ دیده شد. مقطعی از قسمتهای مختلف پوست مربوط به گروه تجربی ۱ در روز چهارده مطالعاتی در شکل شماره گذاری شده است: ۱. محل سالم پوست، ۲. محل زخم، ۳. اپیدرم، ۴. درم، ۵. رگ خونی، ۶. فولیکول مو، ۷. غدد سباسه.

بحث

مکانیسم شناخته شده فرایند ترمیم زخم حاد مشخص شود کدام شاخص مؤثرترین نتیجه را داشته است. به این منظور با توجه به تعدد مطالعات پیشین بر روی لاکتوباسیلها در ترمیم زخم‌های

مطالعه حاضر، با هدف بررسی تأثیر باکتری پروبیوتیک بر طول دوره ترمیم زخم حاد انجام شده است. بر این اساس، آزمایشی طراحی شد تا با سنجش شاخص‌های کیفی گوناگون در انطباق با

گروه‌های تجربی، نسبت به گروه‌های شم، کنترل مثبت و کنترل منفی نشان دادند ($P < 0/05$) (شکل ۱). مقایسه بین گروه‌های تجربی ۱ و ۲ تحقیق حاضر، نشان داد که پاسخ ترمیمی انقباض زخم در گروه تجربی ۱ بیشتر و سریعتر بوده است ($P < 0/05$) و اندازه ناحیه زخم در روز هفتم درمان، کوچکتر شد. به نظر می‌رسد که عامل پروبیوتیک سبب کاهش طول دوره فاز التهابی شده و در ادامه، فاز تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌ها سریعتر آغاز گردیده است. مطالعات پیشین نقش بیان TLRs¹ در نوتروفیل‌ها، فیبروبلاست‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها را در فرآیند ترمیم مطرح می‌کند. پژوهشگران بر این باورند که اینها احتمالاً ناشی از عملکرد پروبیوتیک‌ها از طریق گیرنده‌های پروتئین‌های شبه تول (TLRs) است که نقشی کلیدی در سیستم ایمنی ذاتی دارند (۲۰).

میزان رگزایی و افزایش تعداد عروق خونی یکی از موثرترین عوامل ترمیم زخم است. نو رگزایی (neovascularization) یا رگزایی در رشد مویرگ‌های جدید برای شکل دادن به بافت گرانوله موثر است. سه تا پنج روز پس از آسیب بافتی مویرگ‌ها با تشکیل بافت گرانوله در بستر زخم قابل رویت می‌شوند و به عنوان شبکه‌ای برای تکثیر رگ‌های خونی، مهاجرت فیبروبلاست‌ها و کلاژن جدید عمل می‌کنند (۲۱، ۲۲). هر عاملی که بتواند تشکیل عروق خونی را در زخم ایجاد شده تسریع نموده و گردش خون ناحیه بافتی را برقرار سازد، به پیشبرد روند ترمیم زخم در جهت بهبود کمک کرده و از عمیق شدن زخم جلوگیری می‌کند. در این تحقیق، مایع رویی کشت باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، توان بالقوه ای را در افزایش رگزایی در گروه‌های تجربی از خود نشان داد. به طوریکه، مقایسه دو گروه تجربی ۱ و شم، نشان داد که با وجود ترکیب مشترک هیدروژل در هر دو پانسمان و خواص ضد باکتریایی و ضد ویروسی ترکیبات سازنده هیدروژل (۲۳، ۲۴) در جلوگیری از رشد میکروبی و کاهش التهاب و درد (۲۵، ۸)، گروه تجربی ۱ در فرآیند ترمیم زخم و رگزایی برتر بود که دلیل آن، عامل پروبیوتیک است.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، نشان می‌دهند که به ترتیب در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ در روز هفت بیشترین فرآیند رگزایی در مقایسه با گروه‌های کنترل صورت گرفته است. این نتیجه چنین مطرح می‌کند که افزایش رگزایی به سبب عملکرد باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم است. چنان که می‌دانیم میزان رگزایی در بافت گرانوله در حوالی روز هفتم آسیب به بالاترین میزان خود می‌رسد و بعد از آن عروق به تدریج تخریب

گوارشی و بررسی‌های اندکی که بر روی بیفیدوباکتریوم‌ها با هدف ترمیم زخم پوستی صورت گرفته است، توان باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر کاهش طول دوره درمان مطرح شد. در مطالعات پیشین از باکتری‌های پروبیوتیک به صور مختلفی مانند عصاره، لایزیت سلولی و... استفاده شده است (۱۶، ۸). از آن جا که امکان دارد ورود باکتری پروبیوتیک به صورت زنده به جریان خون سمی بوده و به اندازه باکتری‌های بیماریزا کشنده باشد، اهمیت کاربرد موضعی مایع رویی حاصل از کشت سلول باکتریایی با در نظر داشتن پایداری آن در دمای اتاق نسبت به سلول‌های زنده، در مطالعات برون و درون‌تنی مناسب تر شناخته شده است (۱۷، ۸). در این آزمایش ترجیح داده شد تا از مایع رویی کشت باکتری به جای باکتری زنده استفاده گردد. مطالعه والا محمد سعید در دانشگاه منچستر در سال ۲۰۱۵ نیز نشان داد که لایزیت لاکتوباسیلوس رامنوسوس جی جی اثرات زیانبار باکتری زنده را ندارد. به علاوه استفاده از لایزیت پروبیوتیک‌ها برای درمان پوست دارای عفونت در مقایسه با باکتری زنده بسیار ارزان‌تر است زیرا به حفظ و نگهداری باکتری به صورت زنده نیازی نیست (۸).

در آزمایش برون‌تنی مطالعه حاضر، ۴۴ موش BALB/c ماده، در شش گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این آزمایش از نظر شاخص‌های قطر زخم و تعداد عروق خونی ارزیابی و تحلیل شدند. شاخص قطر زخم از طریق مطالعات ماکروسکوپی ارزیابی گردید و تعداد عروق خونی با مطالعات بافت شناسی و تحلیل بررسی‌های آماری مورد محاسبه قرار گرفت. کاهش اندازه و عمق زخم شاخصی تعیین کننده در طول دوره ترمیم است. این پاسخ مهم ترمیمی در فاز تکثیر و با مهاجرت فیبروبلاست‌ها و میوفیبروبلاست‌ها به درون زخم آغاز می‌شود. تکثیر و تولید پروتئین‌های ماتریکس و پرو کلاژن یک و سه، در پایان هفته نخست پس از جراحی، و تراکم ماتریکس خارج سلولی بعدتر به پشتیبانی از مهاجرت سلول و فرآیند ترمیم می‌انجامد. با حذف فیبروبلاست‌ها رویداد انقباض زخم رخ می‌دهد. در مرحله مدل‌سازی مجدد، کلاژن بازسازی می‌شود، زخم‌ها به طور کامل بسته شده و فیبرهای کلاژن برای کاهش ضخامت اسکار در هم تنیده می‌شوند (۱۹، ۱۸). مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم منجر به کاهش طول دوره درمان می‌شود. داده‌های به‌دست آمده در تطابق با مکانیسم‌های سلولی و مولکولی ترمیم زخم، بیشترین کاهش معنادار را در شاخص قطر زخم در

1. Toll- like receptors

پلاسماسل ها، موجب تحریک تولید TNF-a و رگزایی در فاز التهابی ترمیم بافت می شود (۲۸).

همچنین در مطالعه حاضر مقایسه درون گروهی بین گروه های تجربی ۱ و ۲ با یکدیگر نشان داد که اوسرین هیچ نقشی در ترمیم و افزایش تعداد عروق خونی نداشته است. در مورد اوسرین که سبب نرمی و از بین بردن خشکی پوست می شود، تاکنون هیچ گونه گزارشی مبنی بر داشتن خواص ضد باکتریایی و یا ضد ویروسی اعلام نشده است. بنابراین، با مقایسه دقیق گروه ها مشخص شد که اگرچه مایع رویی کشت باکتری همراه با اوسرین در فرایند ترمیم زخم موثر است؛ ولی زمانی که این مایع به همراه هیدروژل مورد استفاده قرار می گیرد تأثیری حداکثری بر ترمیم زخم و رگزایی دارد ($P < 0.05$). در این مطالعه در گروه های تجربی هیچ گونه عفونتی دیده نشد، زیرا پروبیوتیک ها با مکانیسمی ضد میکروبی شامل ترشح پپتیدهای ضد میکروبی، مهار هجوم باکتری ها و مهار چسبندگی باکتری های بیمارزا به سلول های اپیتلیالی، مانع ایجاد عفونت در زخم می گردند (۲۹). از طرف دیگر، داده های بدست آمده از مقایسه درون گروهی بین گروه های کنترل نیز نشان می دهد که در گروهی که هیچ گونه درمانی دریافت نکردند (گروه کنترل منفی) با گروه پانسمان شده با اوسرین (گروه کنترل مثبت) تفاوت قابل توجهی در قطر زخم و تعداد عروق خونی مشهود نبود.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش رگزایی و کاهش قطر زخم در انطباق با مطالعات پیشین رخ داده است (۵)، و باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم سبب کاهش طول دوره درمان می گردد. همان طور که می دانیم زمان نقش اساسی در کاهش و یا افزایش پیامدهای ناشی از ایجاد زخم دارد (۳۱)، (۳۰). با توجه به این که ما در روز هفتم تیمار شاهد کاهش محسوس قطر زخم و افزایش چشمگیر رگزایی در گروه های تجربی بودیم؛ به نظر می رسد که اگر در مطالعات بعدی فازهای کوتاه تری در روزهای سه، پنج، هفت و نه روزه در نظر گرفته شود (۱۱)، شاید بتوان بازه زمانی دقیق تری را برای این دو شاخص تعیین کرد. همچنین اگر در این مطالعه از مایع رویی کشت باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به تنهایی استفاده شود، اثر باکتری به تنهایی نیز قابل بررسی خواهد بود.

می شوند، در این آزمایش هم بیشترین میزان رگزایی در روز هفت تیمار در گروه تجربی ۱ رخ داد که با مطالعات پیشین همخوانی دارد ($P < 0.05$). با توجه به روند صعودی تشکیل عروق خونی تا روز هفتم آسیب، مانند آنچه که در فاز تکثیر رخ می دهد و سیر نزولی تدریجی آن، شاخص تعداد عروق خونی در گروه های تجربی از روز هفت به چهارده مطالعه روندی کاهشی را نشان داد که با فاز اپیتلیالیزاسیون مجدد همخوانی دارد (شکل ۳) ($P < 0.05$). همچنین به نظر می رسد که استفاده از مایع رویی کشت باکتری، مانند یک تحریک کننده عمل کرده و رگزایی را افزایش داده است (شکل ۳). مطالعات پیشین نشان داده است که فعالیت رگزایی می تواند از طریق ماکروفاژهای فعال شده و همچنین بافت اپیدرم بهبود یابد. تا چندی پیش به نظر می رسید که عامل رشد فیبروبلاست اسیدی یا عامل رشد فیبروبلاست پایه، مسئول این فعالیت هاست، اما اکنون روشن شده است که مولکول های دیگری از جمله عامل رشد واسکولار اندوتلیال (VEGF)، آنژیوپوئین و آنژیوپوئین در فعالیت رگزایی دخیل هستند (۱۹). در همان مراحل ابتدایی ایجاد زخم و تا مراحل پایانی ترمیم زخم توسط کراتینوسیت ها تولید می شود. فیبروبلاست های فعال شده، ماست سل ها و ماکروفاژ ها، VEGF را در پوست مجروح بیان می کنند. در واقع، سلول های میلوئید (به عبارت دیگر، مونوسیت ها و ماکروفاژ ها) منبع عمده VEGF در مراحل پسا جراحی هستند و همچنین مطالعات نشان داده است که سلول های میلوئید مشتق شده VEGF و کراتینوسیت های مشتق شده بر ترمیم زخم اثر گذارند (۲۶). همچنین تصور می شود که بافت در مواجهه با کمبود اکسیژن، ماکروفاژها را برای ترشح عامل رشد VEGF تحریک می کند (۸). مطالعات روی تأخیر در انقباض زخم، کاهش تراکم عروق خونی، و کاهش شکل گیری بافت گرانوله در مدل موش نشان داد که علت، فقدان VEGF در سلول های میلوئید و کراتینوسیت ها بوده است. سطح پایین اکسیژن در پوست زخمی سبب فعال سازی عامل رونویسی HIF¹ می شود که به رونویسی ژن VEGF منجر می گردد (۲۶). مطالعه بر روی موش ها نشان داد که پروبیوتیک موجب افزایش بیان عامل رشد VEGF و عامل رشد تبدیل کننده بتا (TGF- β) (B) می شود (۲۷).

بررسی های هالپر و همکاران (Halper et al.) نیز نشان داد که عصاره باکتری لاکتوباسیلوس با پشتیبانی از فرآیندهای پیش التهابی توسط سلول های التهابی نظیر ماکروفاژها، لنفوسیت ها و

¹ Hypoxia Inducible Factor

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم قطر زخم را کاهش می‌دهد و به طور قابل توجهی، سبب افزایش رگزایی و کاهش طول دوره درمان می‌شود ($P < 0.05$). این پژوهش که در راستای مطالعات صورت گرفته بر تأثیرات درمانی پروبیوتیک‌ها، در مراکز علمی و دانشگاهی ایران و دیگر نقاط جهان، و بر پایه آنها انجام گردیده است (۸)، بر اثرگذاری و سودمندی این نوع درمان دلالت می‌کند. همچنین، این پژوهش نشان می‌دهد که مایع رویی کشت باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، می‌تواند به عنوان درمانی جایگزین و قابل اعتماد مطرح باشد. از این رو، پانسما بیولوژیک طراحی شده شامل مایع رویی کشت باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و هیدروژل آلونته ورا بعد از مطالعات بیشتر می‌تواند در درمان زخم‌های حاد استفاده شود.

سیاسگزاری

این مقاله تحقیقی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم پگاه موسوی امین مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران - شرق با شماره طرح ۳۳۲۶۲ استخراج شده است. بدین وسیله از تمامی کسانی که در تحقق این مهم ما را یاری کردند قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع

کلیه نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ تضاد منافی با مقاله حاضر ندارند.

منابع مالی

ندارد.