ارزیابی ترمیم زخم و خواص ضدمیکروبی پانسمان زخم هیدروژلی نشاسته حاوی عصاره اتانولی پروپولیس در موش صحرایی

اصغر اسکندری‌نیا[1]، محمد رفیعی‌نیا[1]

۱- گروه بیومتریال، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان،

نویسنده مسئول : محمد رفیعی نیا، دانشیار گروه بیومتریال، دانشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

ایمیل: m_rafienia@med.mui.ac.ir

مقدمه: در این تحقیق هدف این است که بتوان با ترکیب نشاسته و پروپولیس به روش ریخته‌گری به پانسمان هیدروژلی دست یافت که از نظر ویژگی‌های مناسب برای درمان زخم باشد. پانسمان های موجود توانایی محافظت از صدمات و آلودگی های به وسیله‌ی میکرواورگانسیم به صورت ایده‌آل را ندارند.

روش‌ها: برای ساخت فیلم، نسبت مشخصی از نشاسته ذرت را با آب دو بار تقطیر مخلوط و سپس گلیسرول را با نسبت ۴۰/۱۰۰ وزن خشک نشاسته افزوده شد. عصاره اتانولی پروپولیس تهیه شده را در نسبت های ۰/۲۵، ۰/۵و ۱٪ به محلول اضافه شد و در قالب تفلونی ریخته‌گری شده است. آزمون‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌توان به خواص ضدمیکروبی، SEM و آزمون حیوانی اشاره کرد.

یافته‌ها: خواص ضدمیکروبی پانسمان زخم با افزایش غلظت پروپولیس افزایش داشته است. طبق نتایج حاصله، اندازه زخم در گروه پانسمان شونده با هیدروژل نشاسته- عصاره اتانولی پروپولیس با گروه دیگر اختلاف معناداری مشاهده شد($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: بنابر یافته های این مطالعه استفاده از پانسمان هیدروژلی نشاسته- عصاره اتانولی پروپولیس می تواند در کنترل عفونت زخم‌های سطحی مؤثر واقع گردد.

واژگان کلیدی: نشاسته، پروپولیس، پانسمان زخم

مقدمه

زخم‌ها را می‌توان آ سیب یا پارگی پو ست عنوان کرد که نتیجه‌ی آ سیب های فیزیکی و شیمیایی می‌با شد همچنین سبب به خطر افتادن شرایط فیزیولوژیکی بدن می‌شـود(۱, ۲). پانسـمان‌های موجود توانایی جلوگیری از آلودگی را به صـورت ایده آل را ندارند. تفاوت در اجزاء و مواد تشکیل دهنده پانسمان ها منجر به درجات کم یا بیشتر عملکرد آنها شده و هر کدام از مواد پانسمانی می‌بایست با زخم خاصی که بر روی آن قرار خواهند گرفت، متناسب باشد(۷). پانسمان ها باید ترشحات ایجاد شده به وسیله زخم را نیز جذب نمایید. گرم و مرطوب نگه داشتن محیط و عدم چسبندگی به هنگام تعویض برای تسریع در ترمیم زخم بسیار موثر است(۳).

پلی ساکاریدها موادی در دسترس و غیرسمی می‌باشند(۴). نشاسته پلی ساکاریدی است که از قسمت‌های مجزا تشکیل شده است(۵). نشاسته به عنوان یکی از ماده‌هایی که برای کاربردهای مختلف از جمله داربست های مهندسی، بستری برای کشت سلول و پانسمان زخم استفاده می شود. اهمیت زیست تخریب پذیری و زیست سازگار پلیمرهای طبیعی مانند نشا سته، کیتو سان و یا مشتقات آنها به طور قابل توجهی بیش از دو دهه گذشته به علت تجدید پذیر خواص بیولوژیکی مطلوب رشد کرده است (۶, ۷). ابتدا باید ویژگی های اساسی در مورد پوشش زخم، روند بهبود زخم و انواع مختلف پانسـمان در دسـترس برای درمان زخم مورد توجه قرار گیرد و علاوه بر آن باید خواص انواع نشـاسـته را در نظر گرفت. مسیرهای مختلفی برای فرآوری تولید پانسمان زخم بر پایه نشاسته استفاده شده است(۸).

پروپولیس یکی از محصولات جانبی زنبور عسل است که زنبور جهت گندزدایی کندو تولید می‌کند. . از لحاظ ترکیب در پروپولیس به دلیل دارا بودن در صد بالایی از فلاونوئیدها خواص ضدمیکروبی و ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی دارد(۹). از جمله فلاونوئیدها ، اسیدهای فنولیک که وظیفه زیست شناختی پروپولیس را بر عهده دارد. به طور طبیعی پروپولیس از ۳۰٪ موم، ۵۰٪ صمغ،۱۰٪ چربی‌های ضروری، آروماتیک و مواد معطر گیاهی تشکیل شده است(۱۰).

هدف از انجام این پژوهش تهیه فیلم هیدروژلی از ترکیب نشاسته و عصاره اتانولی پروپولیس و سپس بررسی تأثیر پروپولیس بر روی ویژگی ضدمیکروبی و ترمیم کنندگی در محیط درون‌تن فیلم‌های تهیه شده بوده است.

روش‌ها

مواد

نشاسته ذرت (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا)، گلیسرول بدون آب (شرکت مرک، آلمان)، پروپولیس تهیه شده از کندوداران اصفهان، اتانول ٪۹۶ درصد (شرکت مرک،آلمان) و آب دوبار تقطیر به منظور حلال برای آماده سازی نمونه مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت فیلم

به منظور ساخت فیلم ۲ درصد وزنی/حجمی از نشاسته ذرت را با آب دو بار تقطیر به وسیله هیتر مجهز به همزن مغناطیسی تا ۲± ۹۵ درجه سانتی گراد و تحت همزدن با دور ۶۰۰ دور بر دقیقه حرارت داده شد. بعد از ۲۰ دقیقه گلیسرول را به عنوان پلاستی سایزر با نسبت ۴۰/۱۰۰ وزن خشک نشاسته در همان دما به محلول اضافه شده است. عصاره اتانولی پروپولیس تهیه شده در نسبت های ۰/۲۵ ٪(S2)، ۰/۵ ٪(S3) و ۱٪(S4) با در صدهای مختلف نشا سته محلول شده‌اند و به مدت ۶۰ دقیقه بروی همزن قرار گرفته شده ا ست. در مرحله پایانی محلول در قالب‌های تفلونی ۱۰×۱۰ سانتی متر ریخته‌گری شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴۰ درجه به منظور خشک شدن نمونه در اون قرار داده شد.

میکروسکوپ الکترونی پویشی SEM

برای مشاهده شکل‌شناسی نمونه‌های غشای تخت،نمونه های مورد آزمایش بعد از خشک شدن در ابعاد ۱×۱ بریده شده و بعد از آن به منظور ایجاد وضوح مناسب سطح غشا پوشش‌دهی شدند. سپس سطح رویی و برش عرضی نمونه غشاهای تخت با استفاده ازمیکروسکوپ الکترونی پویشی تصویر برداری شده اند.

خواص ضدمیکروبی

برای بررسی خواص ضدمیکروبی فیلم‌های هیدروژلی ، روش دیسک دیفیوژن مورد استفاده قرار گرفت. به وسیله پانچر دیسک های به قطر ۱۰ میلی‌متر از نمونه های مورد نظر جدا گردید. جهت تهیه سو سپانسیون میکروبی چند کلونی خالص از کشت ۲۴ ساعته باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* در داخل لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل حل شد و تا کدروتی معادل لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند به دست آید. سواب استریل راآغشته به سوسپانسیون میکروبی کرده و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار بصورت چمنی کشت داده شد. فیلم‌های

هیدروژلی به وسیله پنس روی این محیط ها انتقال یافتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور قرار گرفتند. قطر هاله عدم رشد باکتری ایجاد شده با نرم افزار Image J اندازه‌گیری شد.

مطالعه حیوانی

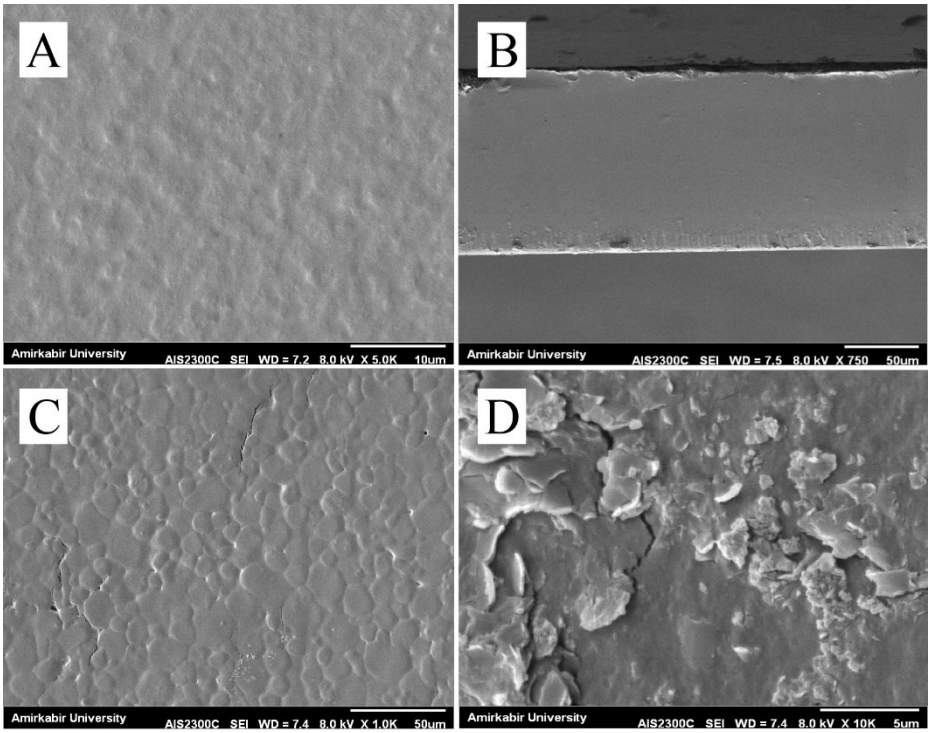
جهت بررسی تاثیرات پانسمان هیدروژل ساخته شده به ۲ گروه آزمایشی نیاز است. روش نمونه گیری در این مطالعه به صورت تصادفی بود و تعداد نمونه‌های مورد نیاز با سطح اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. هر گروه شامل ۶ رت از نژاد Wistar که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره‌های دوازده ساعته رو شنایی و تاریکی نگهداری شدند. تغذیه آنها با حبه‌های (pellet) مخصوصِ حیوانات آزمایشگاهی و آب آ شامیدنی لوله‌کشی صورت گرفت. به منظور ایجاد زخم ابتدا موش ها توسط تزریق درون صفاقی محلول کتامین و زایلازین میلی‌گرم بر کیلوگرم انجام شد. موهای پشت حیوان کوتاه (Shave) شد، سپس دو برش به قطر یک سانتی‌متر و به فاصله دو سانتی‌متر از ستون مهره‌ها و در سمت چپ و راست حیوان بعد از آغشته کردن پوست با محلول بتادین، به کمک قیچی ایجاد گردید. برای گروه اول از پانسمان هیدروژلی نشاسته (S1) جهت درمان استفاده شد. برای گروه دوم هیدروژل نشاسته/ عصاره اتانولی پروپولیس(S4) جهت درمان استفاده شده است. در روزهای ۷،۱ و ۱۴ گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج بدست آمده در گروه آزمایشی و گروه کنترل با یکدیگر مقایسه گردید. جهت اندازه‌گیری طول زخم از نرم‌فزار Image J استفاده شد.

آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین ±انحراف معیار (Mean±SD) به دست آمده و برای تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) استفاده گردید و آزمون آماری واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن اختلافات با $p<۰/۰۵$ محاسبه گردید.

یافته‌ها

ریز ساختار فیلم‌های شاهد نشان داد که این فیلم‌ها دارای سطوحی صاف و یکنواخت بوده و هیچ گونه خلل و فرج حاصل از SEM و ترکی در آنها مشاهده نمی شود (شکل۱–A و B). عکس سطح رویی از فیلم هیدروفوب ساختاری ناصاف برآمده و سه‌بعدی را در روی سطح فیلم نشان داد (شکل۱–C و D). نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی فیلم‌ها نشان داد که وجود عصاره پروپولیس با دارا بودن ترکیبات پلی فنلی، اثرات ضدمیکروبی بالایی را از خود نشان می دهد. بر اساس نتایج این تحقیق فیلم‌های حاوی عصاره پروپولیس موجب افزایش معنی داری در مساحت هاله بازدارندگی رشد باکتری‌ها در محیط کشت در مقایسه با فیلم‌های بدون عصاره می شود($p<۰/۰۵$). فیلم نشاسته بدون عصاره (S1) و نیز غلظت ۰/۲۵ در صد(S2) هیچ گونه اثر ممانعت کنندگی بروی باکتری *ا شریشیاکلی* و *ا ستافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند. بررسی نتایج هاله ممانعت از رشد به عنوان معیار اثرات ضدباکتریایی فیلم حاوی عصاره اتانولی پروپولیس نشان داد که بیشترین تأثیر با غلظت ۱ درصد(S4) و بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۶/۷۲±۰/۸۴ میلیمتر بوده و سپس باکتری *اشریشیاکلی* هاله ۲/۰۲±۰/۲۱ میلی‌متر قرار دارند(جدول ۱). در آزمون حیوانی روند بهبودی ابعاد زخم ایجاد شده در موش پس از ۱۴ روز مشاهده شد که مساحت زخم در موش‌هایی که با فیلم هیدروژلی نشاسته حاوی عصاره اتانولی پروپولیس پانسمان شده بودند، نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش داشت؛ به طوری که میانگین مساحت زخم در گروه‌ی که با فیلم هیدروژلی نشاسته حاوی پروپولیس پانسمان شده بودند، ۱۲/۲۵±۲/۴۹ میلی‌متر مربع و در گروهی که با پانسمان نشاسته پانسمان شده بودند، ۲۵/۳۸±۳/۱۲ میلی‌متر مربع به دست آمد(شکل ۲). در بررسی روند بهبودی زخم در این مدت مشاهده شد، حیواناتی که تحت پانسمان هیدروژلی نشاسته حاوی پروپولیس قرار گرفته بودند به صورت معنی داری سرعت بهبودی بهتری نسبت به گروه شاهد داشتند. همچنین نتایج بالینی به دست آمده برای هر ۲ گروه در مدت ۱۴ روز نشان داد که موش‌هایی که پانسمان حاوی عصاره اتانولی پروپولیس درمان شده بودند، حالت جمع شدگی و خشک شدگی بهتری نسبت به پانسمان شاهد داشتند.



شکل۱. تصاویر سطح و مقطع عرضی SEM پانسمان های زخم با درصد های مختلف پروپولیس (A و B فیلم هیدروژلی نشاسته خالص و C و D فیلم حاوی ۱ درصد پروپولیس)

جدول ۱. میزان قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر

نام باکتری	ناحیه ممانعت از رشد برحسب mm			
	S1-control	S2	S3	S4
استافیلوکوکوس اورئوس	۰	۰	۲/۴۶±۰/۶۵	۶/۷۲±۰/۸۴
اشریشیاکلی	۰	۰	۱/۱۲±۰/۱۸	۲/۰۲±۰/۲۱

شکل۲

شکل ۲. تصاویر مقایسه‌ای اثر بهبودی زخم در گروه پانسمان هیدروژلی نشاسته و گروه پانسمان هیدروژلی حاوی عصاره اتانولی پروپولیس

بحث

امروزه تلاش های زیادی برای گنجاندن عوامل ضـــد میکروبی در زخم‌پوش‌ها و پانســـمان‌ها در حال انجام اســـت. به منظور مطالعه تغییرات ریزساختاری در فیلم‌ها، تصاویری به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح و مقطع عرضی تجسم توپوگرافی سطح همه‌ی فیلم‌های آماده شده از نشاسته ذرت و عصاره اتانولی پروپولیس گرفته شد. در واقع بر روی سطح فیلم برجستگی‌های تپه مانندی وجود دارند که نشان دهنده‌ی، حضور اسید چرب در این قسمت می باشد(۱۱). ولی در نمونه شاهد از فیلم‌های که فقط حاوی نشاسته ذرت می‌باشند مقایسه‌ای انجام گرفت مشاهد شده که سطح نمونه صاف‌تر از نمونه‌های حاوی عصاره پروپولیس می‌باشد.

بنابر مطالعات متعدد انجام شده، خواص ضدمیکروبی و طبیعی بودن پروپولیس همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. وجود ترکیبات فعال مانند فلاوونوئید، اسید سینامیک و فنول با خواص مختلف ثابت شده مانند ضد باکتریایی در عصاره اتانولی پروپولیس امکان استفاده از آن را در قالب این فیلم‌ها امکان پذیر می‌ســازد(۱۲, ۱۳). کنترل باکتری *اســتافیلوکوکوس اورئوس و اشــریشــیاکلی* که عامل چندین نوع بیماری می‌باشند از اهمیت زیادی در ارتباط جلوگیری از عفونت زخم برخوردار است. نتایج مطالعه‌ای که توسط Torlak و همکاران مشخص شد عصاره اتانولی پروپولیس در فیلم کیتوسان قابلیت مهار رشد باکتری های شایع *استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی* دارد(۱۴, ۱۵).

مدیریت عفونت های پوستی به ویژه عفونت های ناشی از تروما و سوختگی از اهمیت ویژه‌ای بر خوردار می باشد، به طوری که امروزه ارائه‌ی درمان ها با مواد طبیعی در کنار درمان‌های آنتی بیوتیکی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است. نتایج این مطالعه نشان داد که پانسمان نشاسته-عصاره اتانولی پروپولیس اثر قابل توجهی در بهبودی زخم‌های مورد بررســی داشــت این در حالی بود که پیش از این de Almeida و همکاران در گزارش های خود در یک مطالعه‌ی بالینی به نقش عصاره اتانولی پروپولیس در بهبودی زخم ها اشاره کرده بودند(۱۶).

در این تحقیق مشاهده شد که پانسمان نشاسته پروپولیس دارای خواص ضدمیکروبی محسوسی را نشان می‌دهد که به دلیل وجود فلاونویید و اسید سینامیک موجود در پروپولیس می‌باشد. به نظر می رسد استفاده از این پانسمان هیدروژلی می تواند در کنترل عفونت زخم‌های سطحی مؤثر واقع گردد.

References

1. Torres FG, Commeaux S, Troncoso OP. Starch-based biomaterials for wound-dressing applications.Starke. 2013;65(7-8):543-51.
2. Ahmed EM. Hydrogel: preparation, characterization, and applications.J Adv Res. 2013.
3. Merei JM. Pediatric clean surgical wounds: is dressing necessary.J Pediatr Surg. 2004;39(12):1871-3.
4. Cascone M, Barbani N, P. Giusti CC, Ciardelli G, Lazzeri L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides.J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(3):267-81.
5. Abbas KA, Khalil SK, Hussin ASM. Modified starches and their usages in selected food products: a review study.J Agric Sci. 2010;2(2):90.
6. Pal K, Banthia A, Majumdar D. Starch based hydrogel with potential biomedical application as artificial skin.African Journal of Biomedical Research. 2006;9(1).
7. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. Int. J. Pharm. 2014;463(2):127-36.
8. Pal K, Banthia A, Majumdar D. Preparation of transparent starch based hydrogel membrane with potential application as wound dressing.Trends Biomater Artif Organs. 2006;20(1):59-67.
9. Filipič B, Gradišnik L, Ružić-Sabljić E, Trtnik B, Pereyra A, Jaklič D, et al. Water Soluble Propolis and Royal Jelly Enhance the Antimicrobial Activity of Honeys and Promote the Growth of Human Macrophage Cell Line. 2016.
10. Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ, Hu F-L. Recent advances in the chemical composition of propolis.Molecules. 2014;19(12):19610-32.
11. Pastor C, Sánchez-González L, Cháfer M, Chiralt A, González-Martínez C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content.Carbohydr Polym. 2010;82(4):1174-83.
12. Kim JI, Pant HR, Sim H-J, Lee KM, Kim CS. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. Mater. Sci. Eng. C. 2014;44:52-7.
13. Bitencourt C, Fávaro-Trindade C, Sobral P, Carvalho R. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films.Food Hydrocoll. 2014;40:145-52.
14. Torlak E, Sert D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens.Int J Biol Macromol. 2013;60:52-5.
15. Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pac J Trop Biomed. 2011;1(2):154-60.
16. de Almeida EB, Cardoso JC, de Lima AK, de Oliveira NL, de Pontes-Filho NT, Lima SO, et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. J Ethnopharmacol. 2013;147(2):419-25.

Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of hydrogel dressings of starch containing ethanolic extract propolis in Rat

Background: In this experiment, we intend to fabricate hydrogel wound dressing by solvent-casting method with combination of starch and propolis, which is suitable for wound due to their suitable properties. Current wound dressings don't have capability of protecting wound from injuries and micro organs contaminations ideally.
Methods: For preparation of film, a certain amount of corn starch was mixed with deionized water and followed by the addition of glycerol in a specific ratio (4/10 dried weight of starch). The ethanolic propolis extract was added to the aforementioned solution in ratios of 0.25%, 0.5% and 1%. The obtained mixture was casted on PTFE mold and their structure and features were characterized by mechanical properties, SEM and Antimicrobial activity.
Findings: The antimicrobial properties of the wound dressing showed significant improvement by the increasing of the propolis concentration. According to our results, there is a significant difference about the rate of wound healing in group of hydrogel dressing of starch and hydroalcoholic extract propolis compared to other group ($p<0.05$).
Conclusion: According to our findings, nanosilver dressing can be effective in controlling superficial wound infection.
Keywords: Starch, Propolis, Wound dressing