



بررسی اثر عصاره جلبک گراسیا کرتیکاتا (*Gracilaria Corticata*) بر خون‌رسانی و فیبروز

زخم‌های آلوده پوست رت

هومن عکاشه^۱، ایرج میرزایی دیزگاه^{۱*}، سیدجواد حسینی شکوه^۲

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

چکیده

مقدمه: ترمیم زخم وابسته به رگزایی و میزان تولید کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها است. جلبک‌های دریایی از جمله ارگانیسیم‌هایی هستند که امروزه مورد توجه مصارف درمانی برای بهبود زخم هستند. این تحقیق به بررسی تأثیر جلبک دریایی به نام *Gracilaria corticata* برای افزایش رگزایی و فیبروز زخم پوستی عفونی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: هشتاد موش نر صحرایی در این آزمایش شرکت کردند که طبق پروتکل مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. حیوانات به چهار گروه (هر گروه ۲۰ موش صحرایی) تقسیم شدند و در تمام حیوانات آزمایشی یک زخم مربعی پشت انجام شد. زمان نقطه ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از جراحی بود. پس از ایجاد زخم، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی 2×10^8 CFU/mL میکروب استافیلوکوکوس روی زخم ریخته شد. گروه‌ها شامل شاهد (بدون درمان)، اکسید روی (کنترل)، پماد ۳٪ و ۷٪ (درمان با جلبک) تقسیم شدند. نمونه‌ها در فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده شد و سپس در پروسه عمل‌آوری بافت و رنگ‌آمیزی با ترکروم قرار گرفتند. ترکروم برای نشان دادن رشته‌های کلاژن و میزان فیبروز انجام شد. از طرفی دو آنتی‌بادی VEGF و TGF- β برای ارزیابی ایمنوهِیستوشیمی به کار رفت.

نتایج: استفاده از جلبک بیشتر از تجویز اکسید روی، باعث افزایش بروز VEGF و TGF- β شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از جلبک به شکل پماد، اثر تقویتی بر بهبود زخم عفونی دارد که می‌تواند مربوط به خون‌رسانی بیشتر و در نتیجه ایمنی‌بخشی بیشتر در زخم، همراه با اثرات ضد میکروبی باشد.

واژه‌های کلیدی: جلبک دریایی، رگزایی، فیبروپلازی، زخم عفونی.

***نویسنده مسئول:** گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران. **تلفن:** ۰۲۱-۴۳۸۲۲۲۰۴، **نمابر:** ۰۲۱-۸۸۳۳۷۹۲۱۰ **Email:** emirzai@alumnus.tums.ac.ir

ارجاع: عکاشه هومن، میرزایی دیزگاه ایرج، حسینی شکوه سیدجواد. بررسی اثر عصاره جلبک گراسیا کرتیکاتا (*Gracilaria Corticata*) بر خون‌رسانی و فیبروز زخم‌های آلوده پوست رت. *مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی* ۱۴۰۲؛ ۱۸(۲): ۲۴-۳۲.

مقدمه

زخم‌ها و روند بهبود آنها از اختلالات شایع پوست و بیماری‌های زیر جلدی است. زخم‌ها از آسیب‌های ترومایی ایجاد می‌شوند که منجر به باز شدن اپیدرم و درم زیرین می‌شود. برای بازگرداندن وضعیت آشفته پوست و قطع استمرار اپیتلیال و بافت همبند به حالت طبیعی، مبحث بهبود زخم اهمیت پیدا می‌کند. فرآیندهای بهبود زخم به شدت تروما، تهاجم میکروارگانیزم‌های فرصت‌طلب، واکنش‌های التهابی، ایمونولوژیکی و متابولیکی بستگی دارد. روند بهبود بستگی به نوع لکوسیت‌های نفوذیافته، ماست سل‌های فعال شده، محتوای ماتریکس خارج سلولی و واسطه‌های التهابی یا تنظیمی مختلف دارد که به بازبانی یکپارچگی بافت کمک می‌کند (۱ و ۲). در مرحله اول بهبود زخم، واسطه‌های التهابی آزاد می‌شوند که در ایجاد هموستاز محیط زخم نقش دارند. پس از یک روز، مرحله تشکیل بافت جوانه گوشتی است که شامل تکثیر عروق، انقباض، تکثیر فیبروبلاست، سنتز کلاژن و شروع حرکت سلول‌های اپیتلیال است. در نهایت، زخم به مرحله سوم یعنی بازسازی می‌رود که در آن باندهای کلاژن ضخیم منظم‌تر می‌شوند و عروق و سلول‌ها کاهش می‌یابد (۳). پس از آسیب، فاکتور رشد بتا (TGF- β : Transforming Growth Factor beta) توسط ماکروفاژها، کراتینوسیت‌ها و پلاکت‌ها ترشح می‌شود (۴). TGF- β برای شروع تشکیل بافت جوانه گوشتی و فیبروز ضروری است. علاوه بر این، TGF- β برای مهاجرت سلولی در طول ترمیم زخم ضروری است (۵). فاکتور رشد VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor اجزای متعددی از آشبار رگ‌زایی را تحریک می‌کند. در اوایل بهبودی آزاد می‌شود تا رشد مویرگی به حداکثر برسد (۶). انواع مختلفی از میکروارگانیزم‌ها مانند استافیلوکوکوس اورئوس و E.coli می‌توانند زخم‌ها را آلوده کنند و منجر به تأخیر در بهبود زخم شوند (۷). مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمولی که برای درمان عفونت زخم استفاده می‌شود یک پیامد مضر است. با این وجود، انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها عوارض جانبی برای شرایط فیزیولوژیکی طبیعی ایجاد می‌کنند و میکروب‌های پاتوژنی که زخم را آلوده می‌کنند، مقاومت بیشتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول ایجاد کرده‌اند (۸). بررسی روی عصاره‌های مختلف گیاهان سنتی، توانایی التیام زخم‌های پوستی را نشان داده است. این عصاره‌های دارویی با القای تکثیر اپیتلیال و فیبروبلاست‌ها، مهاجرت و تمایز لکوسیت‌ها و فعالیت ضد میکروبی در برابر عفونت، بهبود زخم را تقویت می‌کنند (۹). استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری بیماری‌زا است که می‌تواند نواحی زخم را آلوده کند. شکل مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند منجر به شکست درمان شود. تشکیل بیوفیلم عاملی است که نفوذ آنتی‌بیوتیک را کاهش می‌دهد (۱۰). استفاده سنتی از درمان با عصاره

گیاهی پزشکی برای ترویج داروهای مؤثر ترمیم زخم هر روز در حال توسعه است. علاوه بر بسیاری از گیاهان، ما از یک جلبک دریایی به نام *Gracilaria corticata* برای اهداف مشابه استفاده کردیم. محققان از سال‌های گذشته تا به امروز ثابت کرده‌اند که عصاره‌های گیاهی خواص آنتی‌بیوتیکی و ترمیم زخم قابل توجهی را القا می‌کنند، که ممکن است به‌عنوان یک داروی انتخابی، کارآمد، ایمن و اقتصادی برای التیام زخم‌های عفونی به کار رود. گراسیلیا یک جلبک حاوی آنتی‌اکسیدان‌های بسیاری از جمله گلوتاتیون (GSH: Glutathione)، توکوفرول‌ها Tocopherols، فلاونوئیدها flavonoids، آسکوربات Ascorbate و پلی‌فنول‌ها Polyphenol است. علاوه بر این، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زیادی نیز دارد که شامل گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione Reductase)، گلوتاتیون S ترانسفراز (GST: Glutathione S Transferase)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD: Superoxide Dismutase)، آسکوربات پراکسیداز (APX: Ascorbate Peroxidase) و پراکسیداز است (۱۱). مطالعه‌ای بر روی تجزیه و تحلیل محتوای زیستی گراسیلیا نشان داد که تانن‌ها فراوان‌ترین ترکیبات هستند (۱۲). عصاره جلبک به دلیل خواص زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر عالی، پانسمان مناسب زخم است. آنها با هدف دوگانه به روند بهبودی کمک می‌کنند. آنها می‌توانند زخم را بیوشانند تا از خشک شدن و عفونت جلوگیری کنند. علاوه بر این، آنها می‌توانند داروهای مختلفی را به محل زخم منتقل کنند (۱۳). جالب توجه است که جلبک‌های دریایی می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بیوشیمیایی و آلی عمل کنند یکی از بهترین میکروارگانیزم‌هایی که علیه بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی عمل می‌کند، ریزجلبک‌ها هستند. آنها بسیاری از مواد فعال را سنتز می‌کنند که می‌تواند خواص ضد میکروبی زیادی را افزایش دهد. ارزیابی طراحی جلبک به‌عنوان آنتی‌بیوتیک در بسیاری از کشورها اما برای اولین بار در فیلیپین نشان داده شده است. این فعالیت‌های ضدباکتری، آنتی‌اکسیدانی و فنی در جلبک‌ها گزارش شده است (۱۴). زخم‌های مزمن پوستی و زخم‌های دیابتی و عفونی دارای مشکلات عمده مراقبت‌های بهداشتی در افراد دیابتی و همچنین بیمارانی است که از عفونت پوستی رنج می‌برند. روش‌های درمانی فعلی فقط تا حدی مؤثر هستند و چنین زخم‌هایی میزان عود بالایی را نشان می‌دهند. زخم‌های باز در معرض خطر بالای عفونت زخم تهاجمی هستند که می‌تواند منجر به قطع عضو و ناتوانی بیشتر شود. یک رویکرد بین رشته‌ای برای توسعه درمان‌های جدید و مؤثرتر مورد نیاز بود.

مواد و روش‌ها

۸۰ موش صحرایی ۲۰۰+۳۰ گرمی نر ویستار با میانگین سنی ۲۰ هفته در شرایط آزمایشگاهی بهینه ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت

معرض پراکسید هیدروژن ۳ درصد متوقف شد. آنتی‌ژن‌های اضافی پس از ریختن ۱٪ آلبومین سرم گاوی روی نمونه مسدود شد. ما اسلایدها را با یک آنتی‌بادی اولیه علیه فاکتور رشد بتا $TGF-\beta$ (Santa, sc-518018 Cruz Biotechnology Inc., USA) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF (کلون EP1176Y، شرکت سما تشخیص آریا)، به صورت جداگانه در رقت‌های ۱:۴۰۰ در طول شب انکوبه کردیم. پس از شستشوی بافت‌ها، لام‌ها را با آنتی‌بادی IgG ضد موش بزی (Abcam) به مدت ۱ ساعت در رقت‌های ۱:۴۰۰ در دمای اتاق انکوبه کردیم. اسلایدها را به مدت ۵ دقیقه پس از شستشو با DAB آغشته نمودیم. رنگ‌آمیزی پس زمینه با همتوکسیلین انجام شد. اسلایدهای بافت در الکل و سپس زایلین قرار داده شد. سپس برای ارزیابی میزان بیان ژن مورد مطالعه قرار گرفتند.

داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون مقایسه‌های چندگانه دانت با نرم‌افزار Graph pad prism 9.0 برای رسم نمودارها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵- معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ns: بدون معنی، * > ۰/۰۳، ** > ۰/۰۰۲، *** > ۰/۰۰۰۲ و **** > ۰/۰۰۰۱

نتایج

گروه‌های کنترل اکسید روی و جلیک باعث تسریع بهبود زخم و کاهش قابل توجه سطح زخم در مقایسه با گروه شاهد در روزهای ۷ و ۱۴ پس از عمل شدند. در مقابل، تفاوت معنی‌داری بین همه گروه‌ها در روز بیست و یکم وجود نداشت (شکل ۴-۱).

در روزهای ۷ و ۱۴، بیان $TGF-\beta$ در گروه جلیک ۳ درصد بسیار بیشتر از سایرین بود. بیان $TGF-\beta$ در گروه جلیک ۷ درصد بسیار کمتر از گروه جلیک ۳ درصد بود. در مقابل، در روز ۲۱، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های جلیک ۷ درصد نسبت به جلیک ۳ درصد و گروه کنترل وجود داشت. این بیان روز ۲۱ در گروه جلیک ۷ درصد بالاترین بود. از این جهت بهترین نتیجه در مورد بروز فاکتور رشد $TGF-\beta$ در گروه جلیک ۳ درصد دیده شد (شکل ۸-۵).

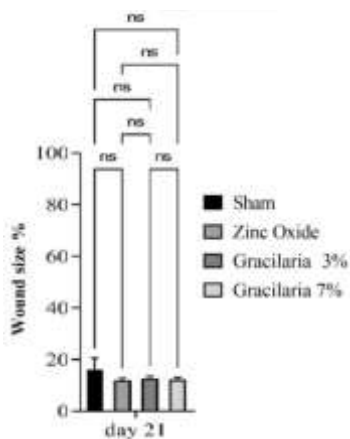
بیان VEGF نشان‌دهنده افزایش رگ‌های خونی است. بروز VEGF تیمار با گروه‌های جلیک در روز سوم به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و کنترل بود. بیان آن در روز ۷ در گروه جلیک ۷ درصد بیشتر از بقیه گروه‌ها بود. تفاوت معنی‌داری در روز ۲۱ مشاهده نشد (شکل ۱۲-۹).

(60 ± 5 درصد) و نور ۱۵ ساعت تحت عمل جراحی قرار گرفتند. جیره طبق پروتکل مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی پلیت و آب بود. حیوانات به چهار گروه پنج سری از هر زمان عمل تقسیم شدند. زمان دقیق ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از عمل بود. پس از ایجاد زخم، تمام زخم‌های پشت موش‌ها را با 50×10^4 CFU/mL استافیلوکوک حاوی سوسپانسیون آلوده کردیم (۱۵). ما اندازه زخم را به صورت $St/S0 \times 100$ محاسبه کردیم، SO ناحیه زخم در زمان اولیه ۰ و St ناحیه زخم در زمان t است. گروه اول بدون هیچ درمانی، گروه کنترل منفی بود. گروه دوم با ۲۵ درصد اکسید روی به عنوان تیمار انتخابی تیمار شد و گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. گروه III و IV با عصاره جلیک دریایی گراسیا به عنوان پماد ۳٪ و ۷٪ تحت درمان قرار گرفتند. برش و اصلاح در محل عمل انجام شد و سپس یک زخم مربعی با ضخامت $1/5 * 1/5$ سانتی‌متر ایجاد شد. پمادها از روز بعد پس از جراحی یک بار در روز روی محل زخم مالیده می‌شد.

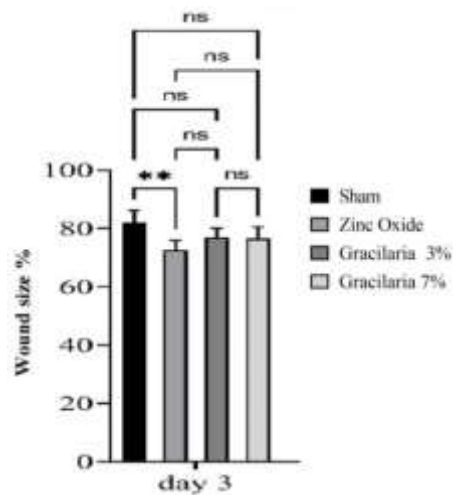
جلیک دریایی گراسیا *Gracilaria corticata* از خلیج فارس در عمق ۵۰-۱۰۰ سانتی‌متر تهیه شد. بعد از شستن جلیک‌ها برای از بین بردن اپی‌فیت‌ها و آلودگی، با دستمال کاغذی آبیگری کردید و بیرون آورده شد تا در مجاورت هوا و دور از تابش مستقیم خورشید خشک شود. بعد توسط دستگاه همزن برقی کاملاً به پودر تبدیل شدند. ۵۰ گرم از پودر به دست آمده درون فیلتر استوانه‌ای دستگاه سوکسله (Soxhlet) تولید (FALC ایتالیا) و ۴۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول درون فلاسک دستگاه ریخته شد و پس از نصب کامل دستگاه سوکسله منبع حرارت‌دهنده دستگاه روشن شد. در این حال با تبخیر مرتب حلال از بالن تحتانی، به طور مداوم حلال خالص بر روی ماده گیاهی قرار گرفت و موجب خروج کامل مواد مؤثره از درون سلول‌های جلیک شد. پس از ۱۲ ساعت محتویات فلاسک در دستگاه دسیکاتور در شرایط خلاء کاملاً خشک شد و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. زمان مصرف آنها را در یخچال با دمای ۴ درجه نگهداری و پس از تهیه پماد استفاده کردیم (۱۱).

پس از القای بیهوشی در رت‌ها با تزریق عضلانی زایلازین ۲٪ (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و کتامین ۱۰ درصد (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، موش‌ها به صورت شکمی روی میز قرار گرفتند سپس سطح پشتی موش‌ها از ناحیه کتف تا ایلئوم با محلول ید ۱۰٪ آماده‌سازی و اسکراب شد و یک زخم مربع شکل با ابعاد ۲/۵ در ۲/۵ به وسیله تیغ جراحی در محل دو کتف ایجاد شد. با ایجاد زخم به روش برشی تمام لایه‌های اپیدرم، درم و هیپودرم به طور کامل برداشته شد.

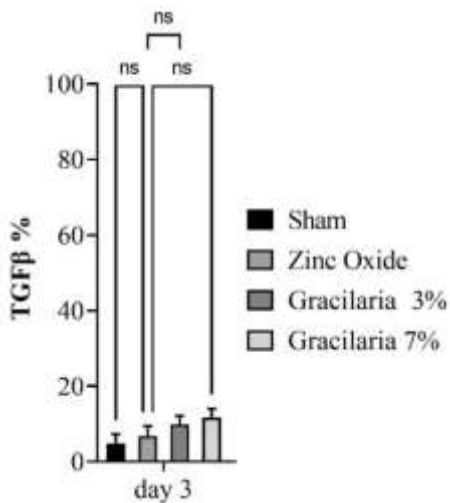
پس از تثبیت نمونه‌ها و قرار دادن آنها در پارافین، آنها را به مقاطع بافتی ۵ میکرومتری برش دادیم. پراکسیداز درون‌زا با قرار گرفتن در



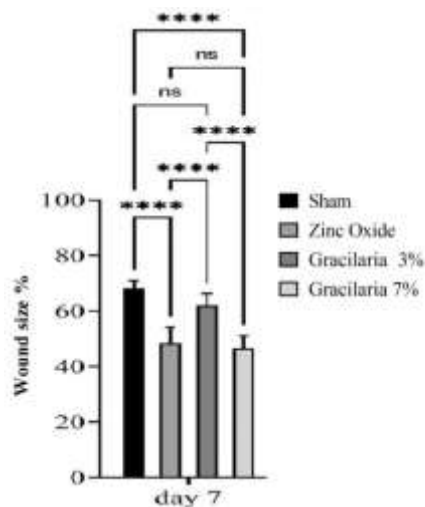
شکل ۴- درصد بسته شدن زخم با توجه به نقاط زمانی نشان داده شده در روز ۲۱



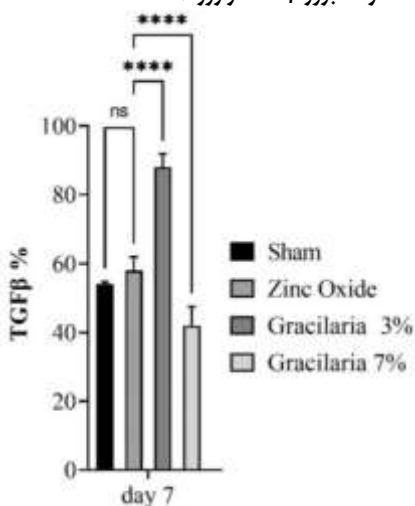
شکل ۱- درصد بسته شدن زخم با توجه به نقاط زمانی نشان داده شده در روز ۳



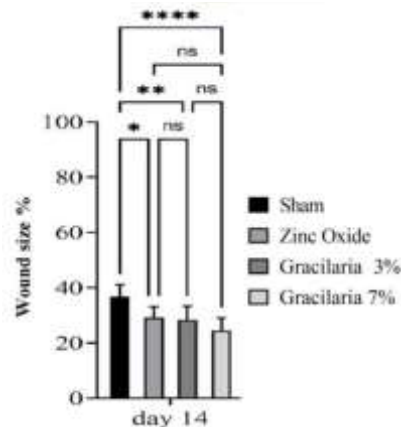
شکل ۵- مقایسه درصد بروز TGF-β در روز ۳



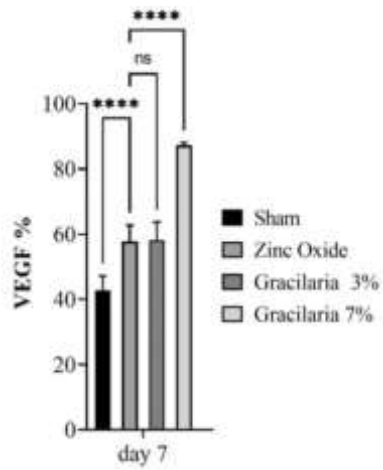
شکل ۲- درصد بسته شدن زخم با توجه به نقاط زمانی نشان داده شده در روز ۷



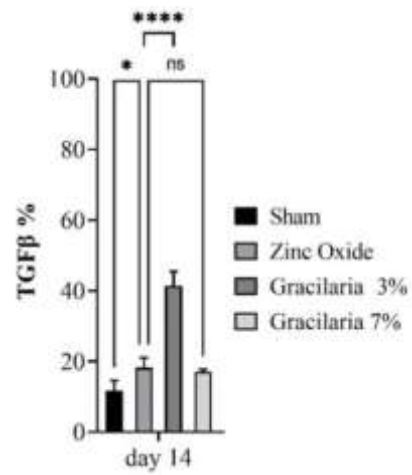
شکل ۶- مقایسه درصد بروز TGF-β در روز ۷



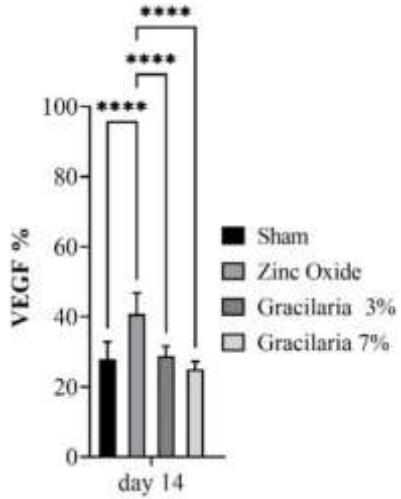
شکل ۳- درصد بسته شدن زخم با توجه به نقاط زمانی نشان داده شده در روز ۱۴



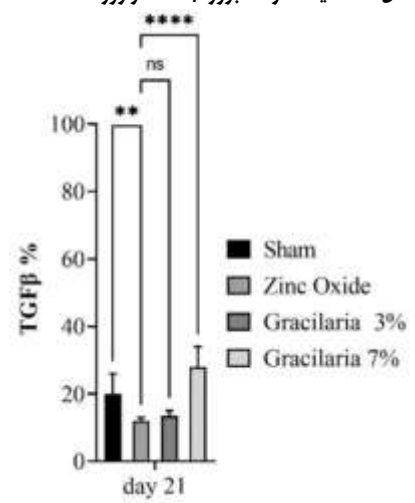
شکل ۱۰- مقایسه درصد بروز VEGF در روز ۷



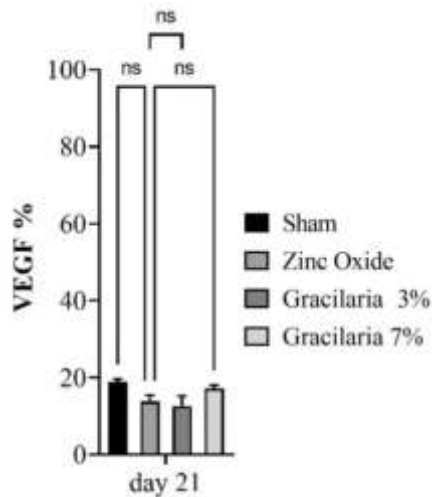
شکل ۷- مقایسه درصد بروز TGF-β در روز ۱۴



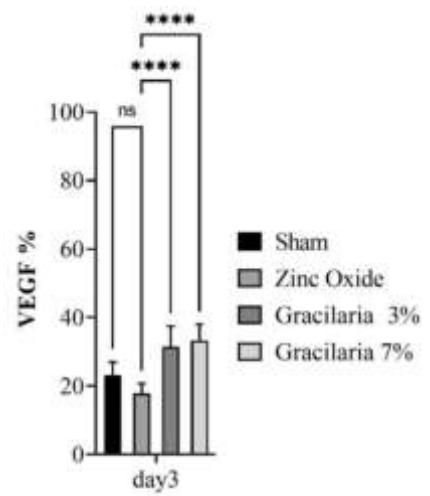
شکل ۱۱- مقایسه درصد بروز VEGF در روز ۱۴



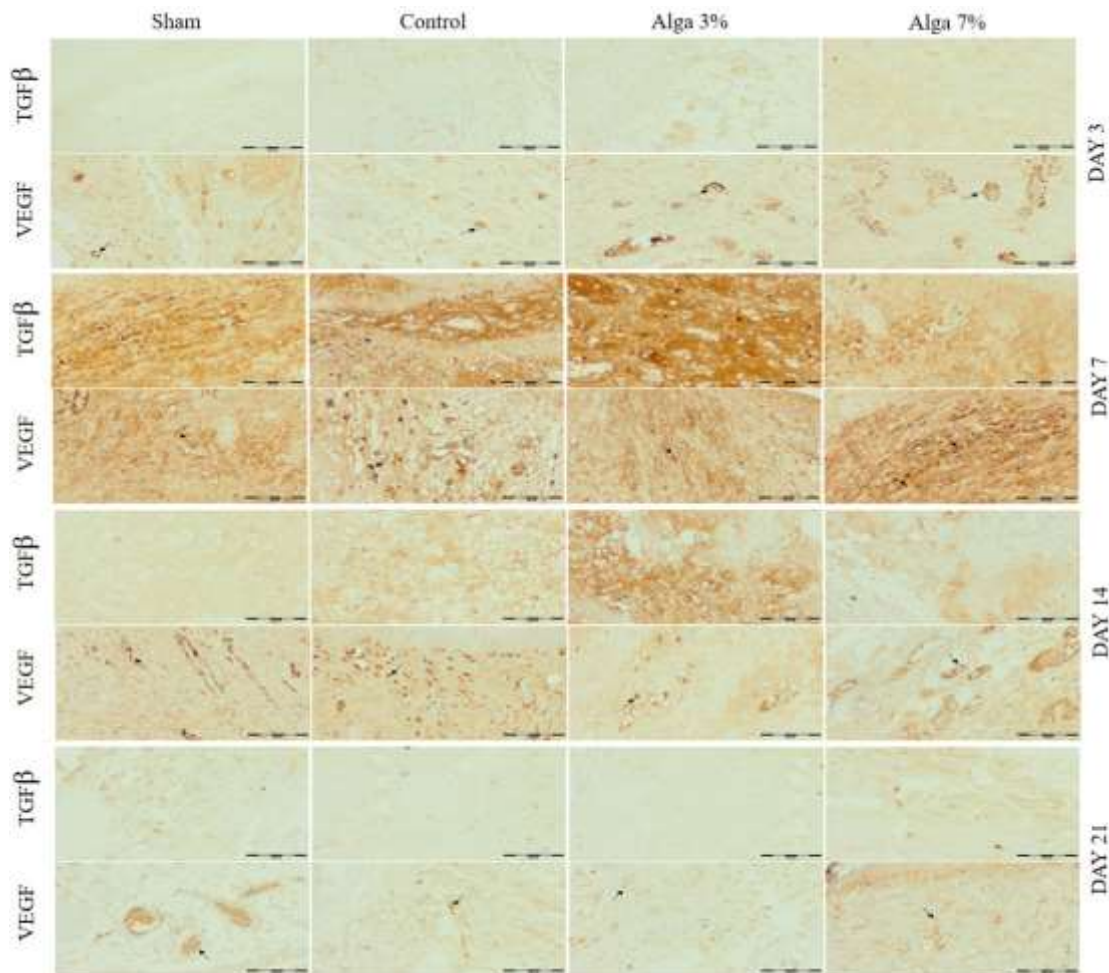
شکل ۸- مقایسه درصد بروز TGF-β در روز ۲۱



شکل ۱۲- مقایسه درصد بروز VEGF در روز ۲۱



شکل ۹- مقایسه درصد بروز VEGF در روز ۳



شکل ۱۳- سنجش ایمونوهیستوشیمی از زخم‌های پوستی آلوده موش‌های تحت درمان با جلبک ۳٪ و ۷٪ در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از جراحی فلش: آنژیوبلاست. نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

بحث

کاربرد دارد و چون فرار است به راحتی می‌تواند انسان را مسموم نماید. برخی از مطالعات نشان داد که خواص آنتی‌اکسیدانی آلژینات کلسیم جلبک‌های دریایی قهوه‌ای می‌تواند از اثرات سمی آسیب کبدی ناشی از تتراکلریدکربن در موش صحرائی التیام یافته و جلوگیری کند (۱۶). برخی از مطالعات نشان داد که ریزجلبک‌ها حاوی متابولیت‌هایی هستند که در برابر رشد و رشد برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بیماری‌زا مؤثر هستند. ترکیبات فنلی سهم عمده‌ای در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک‌ها دارند (۱۴). در مطالعه حاضر نیز شاهد اثرات ترمیمی خوب احتمالاً ناشی از محدود شدن رشد باکتری و خاصیت ضدباکتریایی جلبک گراسیلاریا هستیم. خروجی‌های ارزشمند مطالعه حاضر ممکن است بینشی قوی در زمینه کشف داروهای طبیعی داشته باشد. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ نشان داد که جلبک دریایی گراسیلاریا یکی از بهترین منابع زیستی فعال مانند فیتوکمیکال‌های مختلف، آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند.

عصاره جلبک به دلیل خواص زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر عالی، پانسمان مناسب زخم است. آنها با هدف دوگانه به روند بهبودی کمک می‌کنند. آنها می‌توانند زخم را بپوشانند تا از خشک شدن و عفونت جلوگیری کنند. علاوه بر این، آنها می‌توانند داروهای مختلفی را به محل زخم منتقل کنند. علاوه بر این، جالب توجه است که جلبک‌های دریایی می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بیوشیمیایی و آلی عمل کنند. جنس *Gracilaria* یک جلبک دریایی اقتصادی است زیرا منبع جهانی آگار است. این جلبک دریایی در سراسر مناطق گرمسیری رشد می‌کند. استخراج جلبک دریایی معمولاً با فرآیندهای استخراج با حلال با الکل و استون و از طریق بخار آب یا تقطیر انجام می‌شود. (۱۱). تتراکلریدکربن: CCl_4 Carbon Tetrachloride یک حلال غیرقطبی مناسب برای برخی از واکنش‌ها، ساخت کپسول‌های آتش‌نشانی و تمیزکاری سطوح صنعتی

بود. این مطالعه بیشتر روی فاکتورهای تشکیل عروقی (به صورت مولکولی) متمرکز شده بود که تا به حال به این شکل تخصصی بررسی نشده بود. همچنین ما با بررسی اثرات این جلبک‌ها در دو غلظت متفاوت که قبلاً کار نشده بود و قیاس آنها نشان داد که هر کدام از این غلظت‌ها چگونه می‌توانند در ایجاد روند بهتر رگ‌زایی و فیبروپلازی تأثیرگذار باشند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی آجا تشکر می‌شود.

References

1. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery* 2008;26:31-7. doi: 10.1016/j.mpsur.2007.11.005
2. Makrantonaki E, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Pathogenesis of wound healing disorders in the elderly. *J Dtsch Dermatol Ges* 2017;15:255-75. doi: 10.1111/ddg.13199
3. Belachew TF, Asrade S, Geta M, Fentahun E. In vivo evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of 80% methanol crude flower extract of *Hagenia abyssinica* (Bruce) JF Gmel in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020;2020. doi: 10.1155/2020/9645792
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
5. Wang X-J, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG. Role of TGF β -mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2006;11:112-7. doi: 10.1038/sj.jidsymp.5650004
6. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 2009;153:347-58. doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023
7. Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules* 2018;23:2392. doi:10.3390/molecules23092392
8. Parastan R, Kargar M, Solhjoo K, Kafilzadeh F. Staphylococcus aureus biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports* 2020;20:100739. doi:10.1016/j.genrep.2020.100739
9. Negut I, Dorcioman G, Grumezescu V. Scaffolds for wound healing applications. *Polymers (Basel)* 2020;12:2010. doi:10.3390/polym12092010
10. Durham PG, Sidders AE, Beam JE, Kedziora KM, Dayton PA, Conlon BP, et al. Harnessing ultrasound-stimulated phase change contrast agents to improve antibiotic efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofilm* 2021;3:100049. doi: 10.1016/j.biofilm.2021.100049
11. Kannan M, Pushparaj A, Dheeba B, Nageshwari K, Kannan K. Phytochemical screening and antioxidant activity of marine algae *Gracilaria corticata* and *Spirulina platensis*. *J Chem Pharm Res* 2014;6:312-18.
12. Petchidurai G, Nagoth JA, John MS, Sahayaraj K, Murugesan N, Pucciarelli S. Standardization and quantification of total tannins, condensed tannin and soluble phlorotannins extracted from thirtytwo drifted coastal macroalgae using high performance liquid chromatography. *Bioresource Technology Report* 2019;7:100273. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100273
13. Kuznetsova TA, Andryukov BG, Besednova NN, Zaporozhets TS, Kalinin AV. Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: A review. *J Mar Sci Eng* 2020;8:481. doi: 10.3390/jmse8070481

هشت بیومولکول در جلبک‌های گراسیلاریا وجود دارد. عصاره خامی که می‌تواند رشد پاتوژن‌های مختلف پوست را کنترل کند (۱۱ و ۱۷). در مورد موضوع بسته شدن زخم برخی از مطالعات نشان داد که استفاده موضعی از عصاره جلبک می‌تواند انقباض زخم را افزایش داده و زمان بسته شدن زخم را کاهش دهد (۲۰-۱۸). در کار حاضر نیز بسته شدن زخم در گروه‌های جلبکی بسیار خوب نسبت به گروه‌های دیگر اتفاق افتاد. کاهش اندازه زخم در حیوانات تحت درمان با جلبک گراسیلاریا در مقایسه با گروه کنترل تا روز بیستم و یکم معنی‌دار بود. اثرات عصاره در مقایسه با داروهای معمول بهبود کامل را نشان داد. این امر در گروه جلبک ۷ درصد روز هفتم و چهاردهم قابل توجه بود و در نتیجه اثرات مثبت جلبک در این غلظت را نسبت به گروه با غلظت ۳ درصد جلبک ثابت کرد.

برخی از مطالعات در بهبود رگ‌زایی زخم‌های پوستی توسط عصاره جلبک نشان داد که فعالیت خون‌رسانی زخم موش‌های تحت درمان با عصاره گراسیلاریا بهتر از پماد استاندارد در روز ششم بررسی بود (۲۱). در مطالعه حاضر نیز روند رگ‌زایی بهتر در گروه‌های جلبکی ادامه داشت با این تأکید که گروه جلبک ۷ درصد نسبت به گروه ۳ درصد تشکیل عروق بسیار زیادتری در روز سوم و هفتم داشت. کم بودن تعداد عروق تازه تشکیل برخلاف آنچه که تا روز هفتم نامطلوب است، در روز چهاردهم فاکتوری دال بر روند خوب بسته شدن و ترمیم زخم است. زیرا فراهم‌کننده بستری مناسب جهت نظم بهتر رشته‌ها و باندل‌های کلاژن خواهد بود. این استحکام رشته‌ها و هم جهت بودن باندل‌ها موجب استحکام بیشتر مجموعه زخم در حال ترمیم است (۲۲). در مطالعه حاضر نیز کاهش مفید در روز چهاردهم به صورت کاهش معنی‌دار در عروق گروه‌های جلبک نسبت به گروه کنترل داشتیم که نشان‌دهنده اثرات مطلوب جلبک در کاستن تعداد عروق در زمان مناسب برای ترمیم بهتر زخم است.

فیبروپلازی و فراخوانی فیبروبلاست‌ها رابطه مستقیم با وجود TGF- β دارد (۵). در مطالعه حاضر نیز بیان TGF- β در گروه ۳ درصد بسیار بیشتر از کنترل و گروه ۷ درصد بود. گروه کنترل بیش از گروه ۷ درصد بود. این یافته به معنای شرایط بهینه در گروه درمان شده با جلبک ۳ درصد است. ما استدلال کردیم که گروه جلبک ۳ درصد در فیبروپلازی موفق‌تر از بقیه بود.

اغراق در تداوم رگ‌های خونی تازه تشکیل شده، برخلاف انتظار، می‌تواند روند بهبودی را به تأخیر بیندازد. به نظر می‌رسد گروه جلبک در هدایت اجزای ترمیم زخم بهتر از گروه شاهد بود. رشد رگ‌زایی مفید (تا روز ۷) در گروه ۷ درصد بهترین بود. روند فیبروپلازی در گروه ۳٪ تحت درمان با جلبک بهترین بود. بنابراین استفاده از عصاره جلبک در رگ‌زایی و فیبروپلازی در غلظت‌های متفاوت بهتر از داروی رایج عمل کرد. با توجه به عفونی بودن زخم می‌تواند ناشی از تأثیرات مهاری روی رشد باکتری باشد. علت معنی‌دار نبودن و یکسان بودن نتایج در روز بیست و یکم مطالعه مربوط به پایان روند التیام و شباهت ظاهری همه گروه‌ها در این روز

14. Arguelles E. Proximate analysis, antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant capacity of a green microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. *Asian J of Microbiol Biotech Env Sc* 2018;20:150-8.
15. Paharik AE, Parlet CP, Chung N, Todd DA, Rodriguez EI, Van Dyke MJ, et al. Coagulase-negative staphylococcal strain prevents *Staphylococcus aureus* colonization and skin infection by blocking quorum sensing. *Cell Host Microbe* 2017;22:746-56. doi: [10.1016/j.chom.2017.11.001](https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.001)
16. Al-Dulaimi O, Rateb ME, Hursthouse AS, Thomson G, Yaseen M. The Brown Seaweeds of Scotland, Their Importance and Applications. *Environments* 2021;8:59. doi: [10.3390/environments8060059](https://doi.org/10.3390/environments8060059)
17. Athitya L, Bharath V, Nellore J, Prakash P. Screening of *Gracilaria corticata* extracts for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Res J Pharm Technol* 2018;11:3848-50. doi: [10.5958/0974-360X.2018.00704.7](https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00704.7)
18. Adolph S, Jung V, Rattke J, Pohnert G. Wound closure in the invasive green alga *caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44:2806-8. doi: [10.1002/anie.200462276](https://doi.org/10.1002/anie.200462276)
19. Madkour FF, Hassan MM, Abdo W, Khalil WF. Wound healing activity of brown algae plus polyherbal extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Adv Vet Res* 2013;3:102-8.
20. Premarathna AD, Ranahewa TH, Wijesekera SK, Wijesundara RRMKK, Jayasooriya AP, Wijewardana V, et al. Wound healing properties of aqueous extracts of *Sargassum illicifolium*: An in vitro assay. *Semin Arthritis Rheum* 2019;24:1-7. doi: [10.1016/j.wndm.2018.11.001](https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.11.001)
21. Premarathna AD, Ranahewa TH, Wijesekera SK, Harishchandra DL, Karunathilake KJK, Waduge RN, et al. Preliminary screening of the aqueous extracts of twenty-three different seaweed species in Sri Lanka with in-vitro and in-vivo assays. *Heliyon* 2020;6:e03918. doi: [10.1016/j.heliyon.2020.e03918](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03918)
22. Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and wound angiogenesis. *Int J Mol Sci* 2017;18:1419. doi: [10.3390/ijms18071419](https://doi.org/10.3390/ijms18071419)



Investigating the Effect of Gracilaria Corticata Algae Extract On Blood Supply and Fibrosis of Infected Rat Skin Wounds

Hooman Akasheh (D.V.M.)¹, Iraj Mirzaii-Dizgah (Ph.D.)^{1,2*}, Seyyed Javad Hosseini Shokouh (M.D.)²

1- Dept. of Physiology, School of Medicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Infections Diseases Research Center, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 23 March 2022, Accepted: 4 April 2023

Abstract:

Introduction: Wound healing depends on angiogenesis and collagen production by fibroblasts. Seaweeds are among the organisms that are of interest today for healing wounds. This study examines the effect of seaweed called *Gracilaria corticata* to increase angiogenesis and fibrosis of infectious skin wounds.

Methods: Eighty male rats that participated in this experiment were maintained according to the Laboratory Guidelines for Animal Care. The animals were divided into four groups (20 rats in each group), and a square wound on the back skin was performed on all rats. The time points were 3, 7, 14, and 21 days after the surgical procedure. After creating a wound, an aliquot of 50 μ L of suspension containing 2×10^8 CFU/mL of *Staphylococcus* bacteria was inoculated onto each wound. The groups were divided into control (no treatment), zinc oxide (control), 3%, and 7% ointment (algae treatment). The samples were placed in 10% buffered formalin and then in the tissue processing and staining with trichrome. Trichrome staining is used to show collagen fibers and the degree of fibrosis. On the other hand, VEGF and TGF-B antibodies were used for immunohistochemical evaluation.

Results: The use of algae increased the occurrence of VEGF and TGF-B more than the administration of zinc oxide.

Conclusion: The use of algae has a strengthening effect, especially in the form of ointment, on the healing of infected wounds. It can be related to more blood supply and, as a result, more immunity in the wound, along with antimicrobial effects.

Keywords: Marine algae; Angiogenesis; Fibroplasia; Infected wound.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: I. Mirzaii-Dizgah, Email: emirzaii@alumnus.tums.ac.ir

Citation: Akasheh H, Mirzaii-Dizgah I, Hosseini Shokouh S.J. Investigating the effect of *gracilaria corticata* algae extract on blood supply and fibrosis of infected rat skin wounds. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(2):24-32.