التیام، دوره ۱۲، شماره ۱: ۱۸۵-۱۷۲، ۱۴۰۴ Eltiam 12 (1): 172-185, 2025

التیام
شاپا الکترونیکی:۲۷۸۳۳۲۹۱
eltiam.ivsa@yahoo.com
http://eltiamjournal.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر بزاق زالو در ترمیم زخم باز عفونی با باکتری پروتئوس میرابیلیس در رت

سیده شقایق زنوزاده [۱]، سحر غفاری خلیق [۲*]، حمید استاجی [۲]، حمیدرضا مسلمی [۳]

۱. دانش‌آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
s_ghaffari@semnsn.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۳، تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۰۳/۱۳

https://doi.org/10.61882/eltiamj.12.1.12

کپی‌رایت © مجله التیام: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان. ناشر: انجمن جراحی دامپزشکی ایران.

چکیده

زمینه مطالعه: کنترل عفونت و بهبود روند ترمیم زخم از اهمیت بالایی برخوردار است. بزاق زالو دارای خواص ضدالتهابی، ضدمیکروبی و ترمیمی می‌باشد به‌همین سبب می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایجی باشد که بسیاری از باکتری‌ها به آن‌ها مقاوم هستند.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر بزاق زالو بر روند ترمیم زخم پوستی باز عفونی‌شده به‌وسیله باکتری پروتئوس میرابیلیس به‌کمک بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی و میکروبیولوژی می‌باشد.

روش‌کار: پس از تهیه بزاق زالو، پماد زالو پنج درصد (۹۵ گرم اوسرین، ۵ گرم بزاق زالو) ساخته شد و ۶۰ سر رت نر نژاد ویستار تهیه و به ۴ گروه تقسیم شدند. در پوست ناحیه بین دو کتف هر رت، زخمی به قطر ۱/۵سانتی‌متر به‌وسیله پانچ بیوپسی ایجاد و سپس با تلقیح میزان 10^6 cfu از باکتری، عفونی گردید. سپس گروه‌ها به صورت جداگانه تحت درمان با پماد جنتامایسین، اوسرین و پماد زالو قرار گرفتند و یک گروه به عنوان گروه کنترل، هیچ دارویی دریافت نکرد. پمادها یک‌روز درمیان تا ۲۱ روز تجدید شدند. به منظور بررسی‌های میکروبی و هیستوپاتولوژی در هر در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱، ۵ سر رت به صورت تصادفی جدا گردید و پس از آرام‌کشی، نمونه پوستی به صورت استریل اخذ گردید و۲۱از ۵ رت به صورت تصادفی پس از آرام‌کشی، نمونه استریل اخذگردید.

نتایج: در بررسی میکروبی تعداد تام باکتری‌ها در طول۲۱روز، در گروه درمان‌شده با بزاق زالو کمتر از سایر گروه‌ها بود که با گروه کنترل اختلاف معنادار داشت و به صورت قابل توجهی تعداد باکتری‌ها در گروه درمان‌شده با بزاق زالو در روز هفت با سایر گروه‌ها معنادار بود. در بررسی مقاطع پاتولوژی از جمله بررسی کلاژن، اپیتلیزاسیون، تراکم فیبروبلاست و میزان التهاب و انژیوژنز اختلاف معنادار مشخصی در گروه درمانی با بزاق زالو با کنترل در کنترل التهاب و اپیتلیزاسیون و تولید کلاژن وجود داشت و بین گروه زالو و جنتامایسین در اکثر پارامترها بجز فاکتور اپیتلیزاسون که دارای اختلاف معنادار در روز ۲۱ درمان بود، اختلاف معناداری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری نهایی: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد، بزاق زالو باعث ساخت کلاژن و افزایش سرعت روند اپیتلیزاسیون شده. همچنین، باتوجه به خواص ضدمیکروبی آن، بزاق زالو می‌تواند تا حدی در کنترل طولانی مدت جمعیت باکتریایی پروتئوس‌میرابیلیس کمک‌کننده باشد و جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک در مصرف کوتاه مدت باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر بزاق زالو در کنترل التهاب و تسریع روند ترمیم در زخمهای عفونی با باکتری پروتئوس میرابیلیس بوده که با توجه به بحث مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح‌شده در مورد این باکتری، می‌توان از بزاق زالو در کنار آنتی‌بیوتیک مناسب جهت کنترل و تسریع روند زخم‌های عفونی به خصوص زخم‌های عفونی شده با پروتئوس میرابیلیس استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بزاق زالو، پروتئوس میرابیلیس، زخم باز عفونی ، میکروبیولوژی ،هیستوپاتولوژی

مقدمه

پوست وسیع‌ترین اندام در بدن محسوب می‌شود. در دامپزشکی بسته به گونه و سن جاندار، ۱۲٪ تا ۲۴٪ وزن بدن را شامل می‌شود. پوست عملکردهای بسیاری را شامل می‌شود که از جمله این عملکردها می‌توان به تنظیم دمای بدن، تولید رنگ‌دانه و ویتامین D، ایجاد حس لامسه و عمل به عنوان سد دفاعی انتخابی بین بدن و محیط بیرون اشاره‌کرد (Aiello و هم‌کاران، ۲۰۱۶). عملکرد دفاعی پوست به عنوان اصلی‌ترین وظیفه‌ی پوست شناخته می‌شود که این عملکرد مانع نفوذ میکروب‌ها، مواد سمی و اشعه به بدن می‌شود(نوروزیان، ۱۳۷۰). به از بین رفتن یکنواختی آناتومی طبیعی و اختلال در عملکرد متابولیک ساختارهای بدن که شامل ارگان‌ها، بافت‌ها و سلول‌ها می‌باشد، زخم گفته می‌شود. عوامل مختلفی از جمله عوامل فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می‌توانند در ایجاد زخم دخیل باشند (Enoch و Leaper، ۲۰۰۵). زخم‌ها به دو نوع باز و بسته تقسیم بندی می‌شوند (Thakur و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از متداول‌ترین و مهم‌ترین عوامل بازدارنده در التیام زخم عفونت می‌باشد که جراحان به طور معمول با آن مواجه می‌شوند. عفونت باکتریایی می‌تواند روند التیام زخم را از چند طریق با خطر مواجه کند. تهاجم میکروب‌ها به زخم ممکن است موجب ترشح اکسودا شود و سطوح زخم را بطور مکانیکی از یکدیگر جدا کند. همچنین، با کاهش روند خون‌رسانی، جلوگیری از تشکیل عروق خونی جدید و افزایش واکنش‌های سلولی، که خود منجر به طولانی شدن مرحله پاکسازی زخم می‌شود، ترمیم زخم را به تعویق می‌اندازد (Singh و همکاران، ۲۰۱۱). اغلبگونه‌های باکتریایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳۷٪) و پس از آن *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۷٪)، *پروتئوس میرابیلیس* (۱۰٪)، *اشریشیا کلی* (۶٪) و گونه‌های کورینه باکتریوم (۵٪) در ایجاد زخم‌های عفونی دخیل هستند (Bessa و همکاران، ۲۰۱۵). جنس پروتئوس، متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این خانواده بزرگترین مجموعه از باسیل‌های گرم منفی، غیرمتجانس و مهم در علم پزشکی و دامپزشکی می‌باشد و جنس‌های این خانواده بر اساس مشابهت DNA (DNA homology)، خصوصیات بیوشیمیایی، واکنش‌های سرولوژی و غیره دسته‌بندی می‌شوند. برخی از اعضای این خانواده علاوه براینکه فلور طبیعی روده تقریبا تمامی حیوانات و انسان می‌باشند، به طور گسترده در دنیا از آب، خاک و سبزی‌ها جدا می‌گردند (حسنی و فیروزی، ۲۰۱۴). گونه‌های جنس پروتئوس، متشکل از باکتری‌های پلی‌مورف متحرکی است که توانایی تخمیر گلوکز و عدم توانایی تخمیر لاکتوز را دارند و برخی از آن‌ها فلور طبیعی دستگاه گوارش پستانداران و انسان نیز می‌باشند و در انسان به راحتی روی پوست رشد می‌کند. از خصوصیات بارز این جنس می‌توان به توانایی حرکت هجومی (Swarming) بر روی سطح آگار اشاره کرد که وجه تشخیص این جنس نسبت به اکثر جنس‌های دیگر این خانواده می‌باشد. باکتری‌های این جنس می‌توانند در درجه حرارت پایین و سطوح مرطوب به آسانی رشد کنند (Rozalski و همکاران، ۲۰۱۲؛ Stickler، ۲۰۰۲). *پروتئوس میرابیلیس* می‌تواند در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها از جمله خاک، کود، منابع آبی و فاضلاب‌ها زندگی کند اما غالبا در دستگاه گوارش انسان و حیوانات یافت می‌شود (Rozalskiو همکاران، ۲۰۱۲). از جمله عوامل حدت باکتری *پروتئوس میرابیلیس* می‌توان به توکسین‌ها، فلاژل، آنزیم‌ها، فرار از سیستم ایمنی و ادهسین‌ها (adhesin)اشاره کرد. (Armbruster و همکاران، ۲۰۱۷). زالو درمانی یکی از قدیمی‌ترین شیوه‌های درمانی غیر تهاجی در پزشکی محسوب می‌شود که قدمت آن به ۱۵۰۰ سال قبل از میلاد حضرت مسیح و به مصر باستان باز می‌گردد. تنها ۱۵ گونه از ۶۰۰ گونه شناخته شده زالوها برای زالو درمانی پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که عمده‌ی آن‌ها *Hirudo medicinalis* و از خانواده‌ی *Hirudinidae* هستند. واژه‌ی زالو از کلمه‌ی لاتین Laece به معنای پزشک برگرفته شده است (Wollina و همکاران، ۲۰۱۶؛ Abdullah و همکاران، ۲۰۱۲). زالو نوعی انگل از دسته کرم‌های حلقوی محسوب می‌شوند. این جانوران هرمافرودیت هستند و عمدتا در آب شیرین زندگی می‌کنند. از دیگر خصوصیات این جانوران می‌توان به حساسیت آن‌ها به ارتعاشات آب، نور، گرما و صدا اشاره کرد (Eldor و همکاران، ۱۹۹۶). اکثر فواید درمانی زالوها به دلیل خون مکیده شده در حین گاز گرفتن نیست، بلکه به دلیل مواد فعال زیستی مختلف موجود در بزاق است (Rigbi و همکاران، ۱۹۹۶). با اینکه تا کنون امکان جداسازی هیچ‌گونه مولکول ضددردی از ترشحات زالو وجود نداشته است ولی اعتقاد بر این است که زالوها به دلیل این‌که توسط میزبان حس نمی‌شوند اثرات ضدالتهابی و

بی‌دردی مطلوبی دارند (Clarke، ۲۰۱۶). بنابراین در زمینه اثرات ضد التهابی و بی دردی بزاق زالو، مطالعات در جهت شناسایی مکانیسم‌های غیرمستقیم متمرکز شده‌اند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که برخی کینینازها و آنتیستاسین‌ها ممکن است مکانیسم کینین-کالیکرین را که یک مسیر اصلی مرتبط با درد است را مهارکنند (Nutt و همکاران، ۱۹۹۱). انعقاد در طی تغذیه برای زالوها کشنده است بنابراین وجود عوامل ضدانعقادی در بزاق برای بقای آن‌ها ضروری هستند (Clarke، ۲۰۱۶). ترومبین در فعالیت پلاکت‌ها و آزادسازی ADP تأثیر بسزایی دارد و بنابراین مهارکننده‌ها ممکن است به‌طور غیرمستقیم بر عملکرد پلاکت‌ها اثر منفی داشته باشند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۵). تا به امروز تنها دو مولکول اصلی، دستبیلاز(Destabilase) و کلرمیستین (Chloromycetyn) فعالیت ضدمیکروبی داشته‌اند (Das، ۲۰۱۴؛ Zaidiو همکاران، ۲۰۱۱؛ Abdullah و همکاران، ۲۰۱۲) و همان‌طور که گفته شد دستبیلاز فعالیت بتا گلیکوزیداز دارد. این آنزیم به طور مستقیم پیوندهای β_1 و β_4 را که واجد اهمیت در لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها هستند را می‌شکنند (Zaidi و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که فعالیت ضدمیکروبی بزاق زالو تنها به فعالیت آنزیمی گلیکوزیداز وابسته نیست و با عوامل غیرآنزیمی نیز مرتبط است (Zavalova و همکاران، ۲۰۰۶). اشکال معادل فارسی دستبیلاز اثر باکتریواستات وابسته به دوز علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلای* نشان می‌دهد (Indergand و Graf، ۲۰۰۰). کلرمیستین یک آنتی‌بیوتیک قوی موجود در ترشحات زالو می‌باشد. اما متأسفانه اطلاعات در مورد این مولکول محدود است (Abdullafoadh و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه براین تروماسین، ترومایزین و پپتید بتا به‌عنوان پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده‌اند (Tasiemski و همکاران، ۲۰۰۴: Tasiemski، ۲۰۰۸).

مواد و روش کار

مطالعه حاضر برگرفته از پایان نامه دانشجویی با کد اخلاق E_98_11 می‌باشد که از نوع تجربی (مداخله‌ای) است که در دسته‌ی کارآزمایی بالینی تصادفی (Randomized clinical trial or RCT) قرار می‌گیرد. جهت انجام این مطالعه از ۶۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن حدودی ۳۰۰-۲۵۰ گرم که از نظر ظاهری کاملا سالم بودند، استفاده شد. این مطالعه در خرداد ماه سال ۱۴۰۱ انجام گرفت. به منظور تطابق رت‌ها با محیط و پرهیز از استرس، به مدت یک هفته هیچ گونه آزمایشی روی رت‌ها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات غذای یکسان) نگهداری شدند. در طول مدت مطالعه رت‌ها در قفس‌های مخصوص نگهداری از رت از جنس پلی کربنات شفاف با بستر خاک اره نگهداری شدند و تغذیه رت‌ها به وسیله پلت‌های خوراکی مخصوص تغذیه حیوانات آزمایشگاهی (شرکت بهپرور،تهران، ایران) صورت گرفت و امکان دسترسی به آب به صورت آزاد برای رت‌ها فراهم گشت.

تهیه بزاق زالو

به منظور استخراج بزاق زالو، پارافیلم اطراف سطح خارجی ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری متصل گردید. بین پارافیلم و لایه خارجی ارلن محلولی حاوی یک میلی‌مول آرژنین و ۰/۱۵ مول کلرید سدیم اضافه گردید. ارلن به سه‌پایه فلزی متصل شده و زالو روی پارافیلم چسبانده شد تا از محلول تغذیه کرده و خودبه‌خود جدا شود. پس از جدا شدن زالو از پارافیلم آن را داخل بشر و ۱۰ دقیقه درروی یخ قرار دادیم و سپس ظرف نزدیکی شعله قرار داده شد. با فعال شدن مجدد زالو مایعی غلیظ که همان بزاق زالو بود در بشر جمع‌آوری گردیده و به میکروتیوب منتقل می‌گردید (Abdualkader و همکاران، ۲۰۱۱؛ گریوانی، ۱۳۹۷). غلظت پروتئین موجود در بزاق زالو بعد از جمع‌آوری، با برنامه $A_{۲۸۰}$ نانودراپ، ۸۰۰ میکروگرم در سی‌سی اندازه‌گیری شد و بزاق جمع‌آوری‌شده به مدت سه روز در فریزر قرارگرفت.

تهیه سوسپانسیون باکتری

برای انجام این مطالعه، سوسپانسیونی از باکتری *پروتئوس میرابیلیس*، اهدایی از بانک میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، در سرم فیزیولوژی تهیه شد که در دستگاه اسپکتروفتومتر(اسمارت نانو، کانادا) در طول موج ۶۰۰ نانومتر دارای جذب نوری ۰/۱ (حاوی $۱/۵\times۱۰^۸$CFU/ml) باشد. سپس میزان یک سی‌سی از این سوسپانسیون، جهت تهیه رقت، به نه سی‌سی پپتون واتر ۰/۱٪ اضافه شد و

مجددا یک سی‌سی از محلول به دست آمده به نه سی‌سی پپتون واتر ۰/۱٪ دیگر اضافه شد تا محلولی با رقت CFU/ml ۱×۱۰۶ به دست آید. پس از تهیه رقت مورد نظر از باکتری، لوله‌ی حاوی نمونه‌ی باکتری با رقت مذکور در کنار کمپرس سرد به شهمیرزاد انتقال داده شد.

روش جراحی

در شرایط استریل، توسط ترکیبی از داروهای کتامین هیدروکلراید دامی ساخت شرکت آلفا سان هلند پنج درصد با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین هیدروکلراید دامی ساخت شرکت آلفا سان هلند دو درصد با دوز پنج میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، بیهوشی صورت گرفت. بعد از بیهوشی کامل ناحیه میان دو کتف تمامی رت‌ها توسط تیغ تراشیده شد و موضع جراحی ضدعفونی گردید. در این ناحیه، برشی دایره‌ای شکل به قطر یک و نیم سانتی‌متر توسط پانچ بیوپسی استریل ایجاد شد و پوست ناحیه مذکور به همراه بافت همبند زیرین آن تا رسیدن به عضله به صورت کامل توسط قیچی استریل برداشته شد. پس از ایجاد زخم در کلیه‌ی نمونه‌ها، میزان یک سی‌سی (پنج الی شش قطره) از سوسپانسیون تهیه شده از باکتری *پروتئوس میرابیلیس* با رقت CFU/ml ۱×۱۰۶ در محل زخم تلقیح شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح باکتری، جهت اطمینان از عفونی‌شدن محل زخم، به صورت تصادفی یکی از رت‌ها آرام‌کشی شد و جهت تهیه نمونه‌ی میکروبی به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه گرفته شده از زخم این رت در دو محیط کشت بلاد آگار و ss آگار کشت داده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با مشاهده رشد باکتری و شمارش کلنی‌ها در محیط‌ها از عفونی شدن موضع اطمینان حاصل گردید. پس از کسب اطمینان از عفونی شدن زخم‌ها، رت‌ها به چهار گروه (هر گروه شامل ۱۵ سر رت) تقسیم شدند. گروه کنترل، که هیچ درمانی روی آن‌ها انجام نشد، گروه درمانی با پماد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۰/۳٪ چشمی ، گروه درمانی با پماد پایه‌ی اوسرین شامل و گروه درمانی پماد بزاق زالو (حاوی غلظت ۵٪ ترکیب بزاق زالو و پماد پایه اوسرین) تقسیم شدند. برای تهیه پماد بزاق زالو، پس از قرار دادن ظرف مناسب استریل بر روی ترازو و صفر کردن عدد آن، میزان یک گرم بزاق زالو را به کمک سرنگ استریل به ۱۹ گرم پماد پایه اوسرین اضافه و با هم ترکیب کردیم تا کرم‌ای یکدست با غلظت ۵٪ حاصل شود. کرم به دست آمده را در ظرفی در بسته و درون یخچال نگهداری می‌کنیم. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تایید شدن عفونی شدن زخم‌ها و گروه‌بندی رت‌ها درمان آغاز گشت. روند اجرای این مطالعه ۲۸ روز به طول انجامید. بر اساس تحقیق انجام شده توسط نیکرو و همکاران در سال ۲۰۲۴ در روند درمان، مالیدن پماد بر روی زخم ایجاد شده از روز یک تا هفت، هر روز تکرار شد و بعد از روز هفت، درمان به صورت یک روز در میان ادامه پیدا کرد. در طی روند درمان رت‌ها کاملا هوشیار بودند و عمل مالیدن پماد بر روی زخم‌ها توسط سواپ استریل و بدون مهار رت‌ها به گونه‌ای که لایه‌ای نازک از پماد روی سطح زخم را به طور کامل بپوشاند، انجام شد. لازم به ذکر است که برای مالیدن پماد بر روی هر رت، سواپ استریل برای هر رت تعویض گشت.

نمونه گیری

در فواصل زمانی در روزهای هفت، ۱۴ و ۲۱، پنج رت از هر گروه خارج و با دوز بالای دی اتیل اتر آرام کشی شدند. پس از تایید عفونی شدن زخم و جهت نمونه برداری از زخم و انجام آزمایش میکروبی و هیستوپاتولوژی به آزمایشگاه انتقال یافتند.

آزمایشات میکروبی

برای انجام آزمایشات میکروبی، کل زخم و پوست اطرافی سالم با استفاده از قیچی استریل برداشت شد و سپس نمونه‌ی زخم و پوست اطراف آن به دو قسمت مساوی تقسیم شد و از یک نیمه جهت آزمایش میکروبی استفاده شد. با استفاده از ترازو میزان مساوی از نمونه‌های متعلق به یک گروه برداشته شد، به طوری که مجموع نمونه‌های برداشت‌شده از هر گروه به دو گرم برسد. دو گرم نمونه‌ی معرف هر گروه در هاون استریل با میزان دو سی‌سی پپتون واتر ۰/۱٪ به خوبی کوبیده شد تا شیرآبه‌یی یکدست از آن به دست آید. میزان ۱۰۰۰λ (معادل یک سی‌سی) از شیرابه‌ی به دست آمده توسط میکروپیپت با نه سی‌سی پپتون واتر، جهت رقت سازی، ترکیب شد و این عمل دو مرتبه‌ی دیگر جهت تهیه رقت تکرار شد. در نهایت از هر یک از رقت‌های به دست آمده که معادل ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ بودند، میزان ۱۰۰λ برای کشت در هر پلیت برداشته شد. برای کشت باکتری از دو محیط کشت بلاد آگار و ss

آگار (Salmonella Shigella Agar) استفاده شد و کشت برای هر رقت سه بار در هر یک از محیط‌ها تکرار شد. جهت کشت باکتری در هر یک از محیط‌ها، به کمک میکروپیپت میزان ۱۰۰λ از محلول رقت مورد نظر در کنار شعله در مرکز هر پلیت ریخته شد و سپس به کمک لوله پخش‌کننده L مانند شیشه‌ای (L-shaped spreader) استریل در سطح پلیت به صورت کامل پخش شد. پس از انجام کشت، تمامی پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از این مرحله، شمارش میکروبی صورت گرفت و کلنی‌هایی که در پلیت واجد شرایط بین ۳۰-۳۰۰ عدد کلنی در پلیت بودند مورد شمارش قرار گرفتند. در نهایت تعداد کلنی در هر گرم از جرم زخم توسط فرمول مقابل محاسبه گردید:

CFU/Gr= تعداد کلنی× رقت× عکس فاکتور ۱۰

آزمایش هیستوپاتولوژی

جهت تهیه نمونه‌ی هیستوپاتولوژی، کل زخم و مقداری از پوست اطراف آن توسط قیچی استریل برداشت شد و سپس نمونه‌ی زخم و پوست اطراف آن به دو قسمت مساوی تقسیم شد و از یک نیمه برش‌های یکنواخت با اندازه یک سانتی متر در یک سانتی متر حاوی زخم و مقداری پوست سالم اطراف آن تهیه و جهت آزمایش هیستوپاتولوژی استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله بعد از تهیه روی مقوایی با ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ سانتی‌متر فیکس شدند و در محلول فرمالین ۱۰٪ که از قبل تهیه شده بود و در ظروف نمونه‌گیری پلاستیکی استریل جداگانه قرار گرفتند. محلول فرمالین پس از ۲۴ ساعت با میزان مشابه از محلول جدید تعویض گردید. سپس نمونه‌ها جهت انجام مراحل فرآیند بافتی، قالب‌گیری، برش و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین به آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان امام خمینی تهران منتقل گردید. امتیازدهی لام‌های هیستوپاتولوژی به صورت نیمه‌کمی و بر اساس روش «Gal و همکاران، ۲۰۰۸» صورت گرفت. در این روش فاکتورهای تشکیل بافت پوششی یا اپیتلیزاسیون، میزان عروق‌زایی یا آنژیوژنز، میزان سلول‌های التهابی، تراکم و بلوغ رشته‌های کلاژن و میزان فیبروپلازی مورد بررسی قرار گرفت. جدول (۱)

جدول ۱: معیار امتیازدهی لام‌ها با روش نیمه‌کمی (Gal و همکاران، ۲۰۰۸)

اسکور	اپیتلیزاسیون	سلول التهابی	فیبروبلاست	آنژیوژنز	کلاژن
۰	ضخیم شدن لبه‌های برش	عدم حضور	عدم حضور	عدم حضور	عدم حضور
۱	مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰٪	خفیف (اطراف بافت)	خفیف (اطراف بافت)	خفیف (بافت زیرجلدی)	کمین (بافت گرانوله)
۲	مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰٪	خفیف (بافت گرانوله/ خط دماکاسیون)	خفیف (بافت گرانوله)	خفیف (بافت گرانوله)	خفیف (بافت گرانوله)
۳	پل زدن ناحیه برش	متوسط (بافت گرانوله/ خط دماکاسیون)	متوسط (بافت گرانوله)	متوسط (بافت گرانوله)	متوسط (بافت گرانوله)
۴	در حال شاخی‌شدن	برجسته (بافت گرانوله/ خط دماکاسیون)	برجسته (بافت گرانوله)	برجسته (بافت گرانوله)	برجسته (بافت گرانوله)

بر این اساس، امتیاز صفر به لام‌هایی داده شد که در آن‌ها لایه اپیدرم پوستی در لبه برش صورت نگرفته و صرفا محدود به افزایش ضخامت در محل برش می‌شود و هیچ سلول التهابی، فیبروبلاست، انژیوژنز و کلاژنی در آن‌ها مشاهده نشد. امتیاز یک به لام‌هایی داده شد که از نظر اپیتلیزاسیون، میزان مهاجرت سلول‌ها در آن‌ها کمتر از ۵۰٪ بود، سلول‌های التهابی و فیبروبلاست به میزان کمی در بافت پوششی مشاهده می‌شد، عروق‌زایی به میزان کمی در بافت زیرجلدی وجود داشت و کلاژن در کمترین میزان در بافت گرانوله حضور داشت. امتیاز دو به لام‌هایی داده شد که از نظر اپیتلیزاسیون، میزان مهاجرت سلول‌ها در آن‌ها بیشتر و مساوی ۵۰٪ بوده، سلول‌های التهابی به میزان کمی در بافت گرانوله و خط مرزی حضور داشتند و فیبروبلاست، آنژیوژنز و کلاژن به میزان کمی در بافت

گرانوله دیده می‌شدند. امتیاز سه به لام‌هایی داده شد که لایه اپیدرم پوست برش را پوشش داده، سلولهای التهابی به میزان متوسط در بافت گرانوله و خط مرزی دیده شده و فیبروبلاست، آنژیوژنز و کلاژن به میزان متوسط در بافت گرانوله حضور داشتند. امتیاز چهار به لام‌هایی داده شد که در آن‌ها شاخی شدن اپیتلیوم رخ داده بود، سلول‌های التهابی به شکل مشخص در بافت گرانوله و خط مرزی دیده شدند و فیبروبلاست، آنژیوژنز و کلاژن به میزان قابل ملاحظه‌ای در بافت گرانوله حضور داشت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت پذیرفت. داده‌های هیستوپاتولوژی با توجه به توزیع غیر نرمال در پارامترهای اپیتلیزاسیون، فیبروپلازی، عروق‌زایی و حضور کلاژن در گروه‌های مورد مطالعه توسط آزمون Kruskal-Wallis در فاکتورهای مختلف ترمیم بین روزهای ۷ تا ۲۱ پس از درمان با سطح معنی داری $P<0/05$ مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آزمایش‌های میکروبی با توزیع نرمال با آزمون ANOVA در سطح معنی‌داری $P<0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بررسی هیستوپاتولوژی:

در بررسی هیستوپاتولوژی (شکل ۱-۳)، روند التیام و ترمیم زخم به روش «Gal و همکاران، ۲۰۰۸» در گروه‌های مختلف کنترل منفی، اوسرین، بزاق، جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، فاکتورهای میزان فیبروپلازی، آنژیوژنز، میزان سلول‌های التهابی، اپیتلیزاسیون و تراکم و بلوغ رشته های کلاژن مورد بررسی شد. نتایج به دست آمده بر اساس میانه محاسبه و تغییرات در روزهای هفت، ۱۴ و ۲۱ و در جدول (۲) قابل مشاهده است.

جدول ۲: میانه داده‌های به دست آمده در روند تغییرات هیستوپاتولوژی بر اساس روش اماری Kruskal-Wallis در چهار گروه مورد بررسی در پارامترهای مورد بحث .حروف غیر همسان دارای اختلاف معنی دار در سطح $p<0.05$ می‌باشند.

پارامترهای هیستوپاتولوژیک	التهاب			کلاژن			آنژیوژنز			فیبروبلاست			اپیتلیزاسیون		
روزهای مطالعه	۷	۱۴	۲۱	۷	۱۴	۲۱	۷	۱۴	۲۱	۷	۱۴	۲۱	۷	۱۴	۲۱
کنترل	$a,c_۴$	$a_۴$	$a_۴$	$a_۰$	$a_{۰/۵}$	$a_۱$	$a_۰$	$a_۰$	$a_۱$	$a_۴$	$a_۴$	$a_۴$	$a_۰$	$a_۰$	$a_۱$
اوسرین	$c_۴$	$a_۴$	$a_۳$	$a,b_۰$	$a_۲c_۱$	$a,c_۱$	$a_۰$	$a,b_۱$	$a_۲$	$a_۴$	$a,b_۴$	$a,b,c_۳$	$a_۰$	$a,b_۱$	$a,b,c_۲$
انتی بیوتیک	$b_۲$	$b_۱$	$b_۱$	$a,b_۱$	$a,b,c_۱$	$a,b,c_۲$	$a_۱$	$a,b_۱$	$a_۲$	$a_۳$	$b_۳$	$c,b_۲$	$a_۰$	$a,b_۱$	$c,a_۱$
بزاق زالو	$a,b,,c_۳$	$b_۲$	$b_۱$	$b_۲$	$b_۲$	$b_۳$	$a_۱$	$b_۲$	$a_۱$	$a_۴$	$a,b_۳$	$b_۱$	$a_۱$	$b_{۱/۵}$	$b_۳$

فاکتورها با سطح معناداری $P<0/05$ مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی فاکتور التهاب در روز ۷ پس از درمان تنها گروه کنترل با انتی بیوتیک و گروه اوسرین با انتی بیوتیک در سطح معنی داری $P<0/05$قرار داشتند و در سایر گروه ها اختلاف معنی داری دیده نشد اما در روز ۱۴ علاوه بر اختلاف معنی دار در گروه های انتی بیوتیک با گروه کنترل و گروه اوسرین ،گروه بزاق زالو نیز اختلاف معنی دار با کنترل و گروه اوسرین را نشان داد که همین اختلاف معنی دار در روز ۲۱ در بین گروههای ذکر شده دیده شد. در بررسی میانه داده ها، فاکتورکلاژن در روز ۷ پس از درمان تنها گروه کنترل با بزاق زالو در سطح معنی داری $P<0/05$قرار داشتند و در سایر گروه ها اختلاف معنی داری دیده نشد اما در روز ۱۴ و روز۲۱ پس از درمان علاوه بر اختلاف معنی دار در گروه بزاق زالو با گروه کنترل، گروه اوسرین با گروه بزاق زالو نیزدارای اختلاف معنی دار بوده و سایر گروه ها فاقد اختلاف معنی دار می باشند. بررسی میانه با سطح معناداری $P<0/05$، آنژیوژنز در روز۷ و۲۱پس از درمان در هیچ یک از گروه ها اختلاف معنی دار دیده نشد اما در روز ۱۴ پس از درمان اختلاف معنی دار در گروه بزاق زالو با گروه کنترل مشاهده شد. در بررسی میانه داده ها، فاکتورفیبروبلاست در روز ۷ پس از درمان در هیچ یک از گروه ها در سطح معنی داری $P<0/05$قرار نداشتند اما در روز ۱۴ پس از درمان اختلاف معنی دار تنها در گروه انتی بیوتیک با گروه کنترل، دارای اختلاف معنی دار بوده و سایر گروه ها فاقد اختلاف معنی دار می باشند. در روز ۲۱ پس از درمان اختلاف معنی دار در گروه بزاق زالو با گروه کنترل و همچنین گروه آنتی بیوتیک با کنترل دیده شد و سایر گروه ها فاقد اختلاف معنی دار $P<0/05$می باشند. در بررسی میانه داده ها، فاکتوراپیتلیزاسیون در روز ۷ پس از درمان در هیچ یک از گروه ها در سطح معنی داری

P<۰/۰۵قرار نداشتند اما در روز ۱۴ پس از درمان اختلاف معنی دار تنها در گروه بزاق زالو با گروه کنترل، دارای اختلاف معنی دار بوده و سایر گروه ها فاقد اختلاف معنی دار می باشند. در روز ۲۱ پس از درمان اختلاف معنی دار در گروه بزاق زالو با گروه کنترل و همچنین گروه آنتی بیوتیک با گروه بزاق زالودیده شد و سایر گروه ها فاقد اختلاف معنی دار P<۰/۰۵می باشند.

بررسی میکروبی:

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت پذیرفت. داده‌های نرمال به دست آمده از شمارش پرگنه‌ها در هر دو نوع محیط کشت بلاد آگار وss آگار توسط تست ANOVA در سطح معناداری P<۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت. در همه‌ی روزهای هفت، ۱۴ و ۲۱ کشت باکتری در سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ صورت گرفت اما به دلیل عدم رشد باکتری در تعدادی از پلیت‌ها در رقت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱، در هر دو محیط، از رقت ۰/۱ برای انجام بررسی استفاده شد. به علت عمومی بون محبط بلاداگار و همچنین خاصیت تحرک هجومی باکتری *پروتئوس میرابیلیس* در محیط بلاداگار این محیط، صلاحیتی برای بررسی و اندازه‌گیری بار میکروبی در خصوص این باکتری ندارد و برای بررسی بار میکروبی صرفا به نتایج حاصل شده از محیط ss آگار اکتفا کردیم. در محیط ss آگار در هر سه روز برای سنجش میزان بار میکروبی به دلیل عدم رشد باکتری در تعدادی از پلیت‌ها در رقت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱، از رقت ۰/۱ استفاده شد. میانگین تعداد باکتری‌ها در یک گرم از زخم (cfu/gr) در سه روز هفت، ۱۴ و ۲۱ در چهار گروه مورد مطالعه به شرح زیر در جدول (۳) و شکل (۴) و تعداد تام باکتری‌ها در یک گرم زخم((cfu/gr در طول ۲۱ روز که حاصل جمع اعداد به دست آمده در روزهای هفت، ۱۴ و ۲۱ می‌باشد، در جدول(۴) و شکل (۵) قابل رویت است. با توجه به نمودار بررسی تعداد تام باکتری *پروتئوس میرابیلیس* در طول ۲۱ روز، در گروه بزاق کمترین تعداد نسبت به سایر گروه‌ها دیده می‌شود و بین این گروه و گروه کنترل در سطح معناداری P>۰/۱ اختلاف معناداری وجود دارد در حالی‌که هیچ اختلاف معناداری بین این گروه و گروه‌های اوسرین و آنتی‌بیوتیک یافت نشد.

جدول ۳: میانگین باکتری شمارش شده در یک گرم زخم در گروه‌های مورد بررسی در روزهای هفت، ۱۴ و ۲۱ در محیط ssآگار (در هر روز، بین گروه‌های با حروف غیر هم‌سان اختلاف معنادار وجود دارد و بین گروه‌هایی که حروف هم‌سان دارند اختلاف معنادار وجود ندارد.)

Mean± SD	جنتامایسین	اوسرین	کنترل	بزاق
روز هفتم	۴/۷۱×۱۰^۴ ±۹۱/۵۹(a)	۵/۶۱ ×۱۰^۴ ±۱۰۰/۵۸(a)	۵/۴۳۴×۱۰^۴ ±۷۷/۰۰(a)	۳/۰۲۳۴×۱۰^۴ ±۵۵/۱۳۹(b)
روز چهاردهم	۱۰^۲×۲/۳۴ ±۰/۵۷۷(c)	۴/۹۳۴×۱۰^۳ ±۱۲/۴۲(b)	۱/۵۶۷×۱۰^۳ ±۵۲/۱(a)	۱/۴۳۴×۱۰^۳ ±۲/۰۸(a)
روز بیست و یکم	۵/۶۶۶۷×۱۰^۴ ±۳۸۵/۰۰(c)	۳/۵۷۳۴×۱۰^۴ ±۹۴/۴۷(b)	۶/۵۸۶۷×۱۰^۴ ±۷۸/۲۹۷(a)	۲/۹۹۳۴×۱۰^۴ ±۸۷/۰۰(d)

جدول ۴: تعداد تام باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* شمارش شده در روند ۲۱ روزه مطالعه در یک گرم زخم (cfu/gr) در رقت ۰/۱ محیط کشت ss آگار بین گروه‌های غیر هم‌نام در سطح معناداری P<۰/۱ اختلاف معنادار وجود دارد.

Total ± SD	جنتامایسین	اوسرین	کنترل	بزاق زالو
تعداد تام باکتری	۱/۰۴۰۰۱×۱۰^۵ ± ۳۹۵/۷۴ (a)	۹/۶۷۶۸×۱۰^۴ ± ۱۳۸/۵۵ (a)	۱/۲۱۷۷۴×۱۰^۵ ± ۳۰۷/۵۸ (a)	۶/۱۶۰۲×۱۰^۴ ± ۱۰۳/۰۲ (b)

بحث

Abdisa و همکاران در سال ۲۰۱۸ دریافتند که برخی ترکیبات فعال زیستی موجود در بزاق زالو، دارای خواص ضد التهابی دارد و Alam و همکاران در سال ۲۰۱۶ دریافتند که برخی از ترکیبات بزاق زالو از تجمع لکوسیت‌ها در اطراف عروق جلوگیری می‌کند و سبب جلوگیری از

مزمن شدن زخم می‌شود. Sig و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که آنتیستاسین موجود در بزاق زالو دارای اثر مهارکنندگی بر روی سیستم کینین- کالیکرین می‌باشد که نقش مهمی در آبشار انعقادی و پاسخ‌های التهابی دارد. این ماده هم‌چنین مهارکننده قوی فاکتور Xa است که نقش مهمی در آبشار انعقادی دارد و منجر به فعال شدن پروترومبین می‌شود. Sig و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که اگلینC موجود در بزاق زالو، مهارکننده‌ی کاتپسین G و الاستاز نوتروفیل انسانی است و موجب کاهش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجود در نوتروفیل‌ها و در نتیجه کاهش التهاب بافت می‌شود؛ گوآمرین بزاق زالو منجر به مهار الاستاز لکوسیت‌ها می‌شود و پیگوآمرین خاصیت مهاری روی کالیکرین و تریپسین دارد.

Amarprakash و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان داشت که بدلینس (Bdellins) بزاق زالو خاصیت ضدالتهابی دارد و روند ترمیم زخم‌های دیابتی را تسریع می‌کند. در مقایسه‌ی گروه‌های مورد مطالعه در مطالعه‌ی هیستوپاتولوژی، روند التهاب در گروه درمان‌شده با بزاق زالو دارای اختلاف معنادار با گروه ای کنترل و اوسرین در روز ۱۴و ۲۱ پس از درمان می باشند که با مطالعات ذکر شده هم‌سویی دارد. از طرفی سطح معناداری داده ها نشان میدهد اگرچه گروه انتی بیوتیک نیز در روزهای هفت و ۱۴و ۲۱ دارای اختلاف معنا دار با گرو های کنترل و اوسرین بوده اما بزاق زالو نیز به طور کاملا همسو دارای این سطح معنا داری در روزهای ۱۴و۲۱ می باشد و میتواند جایگزین مناسبی برای انتی بیوتیک جنتامایسین و کاهش عوامل اثرات سو آن باشد. Leibovich و Ross در سال ۱۹۷۵ بیان کردند که تغییر بافت گرانوله به اسکار شامل سازمان‌دهی مجدد و بلوغ فیبرهای کلاژن است. در زخم طبیعی روند ساخت و از بین رفتن کلاژن طی مدت سه هفته بعد آسیب صورت می‌پذیرد. جهانگیری و همکاران به این نتیجه رسیدند که زالودرمانی باعث القای تشکیل بافت گرانوله روی پوست و هم چنین منجر به القای کلاژن‌سازی می‌شود.

در مطالعه‌ی انجام شده، در روند ترمیم از روز هفت تا ۲۱ مشاهده شد که در لام‌های گروهی که با بزاق زالو درمان شدند، میزان تشکیل فیبرهای کلاژن با سطح اختلاف معنا دار در روز هفت، ۱۴و۲۱در مقایسه با گروه های کنترل و اوسرین وجود دارد و در مورد این پارامتر، بین این مطالعه و مطالعات پیشین هم‌سویی وجود دارد که بیانگر تسریع و پایداری ترمیم زخم در استفاده از بزاق زالو را به اثبات می رساند. ملک‌محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که از فیبروبلاست‌ها اصلی‌ترین سلول مستقر در بافت همبند هستند که سنتز و ترشح ترکیبات بافت همبند و مولکول‌های پیش‌ساز انواع مختلف کلاژن و فیبرهای الاستیک را برعهده دارند. Singh و همکاران در سال ۲۰۲۰ به این نتیجه رسیدند که کلاژنازها و فیبرینازهای موجود در بزاق زالو منجر به کاهش تراکم بافت اسکار می‌شود و به کاهش فیبروبلاست‌های محل اسکار کمک می‌کند. در مطالعه‌ی انجام شده، با اینکه روند رو به کاهش در میزان فیبروبلاست در گروه درمانی با بزاق زالو مشاهده می‌شود اما بین مقدار این کاهش تنها در روز ۲۱ پس از درمان دارای اختلاف معناداربا گروه کنترل می باشد که میتوان نتیجه گرفت کاهش میزان فیبروبلاست تحت تاثیر بزاق زالو با افزایش روزهای پس از درمان قابل توجه بوده و درنهایت احتمال کاهش تراکم بافت اسکار را بالا برده و تا حدودی با مطالعات فوق الذکر همسویی دارد.

امانی و همکاران در سال ۲۰۲۱ و ۲۰۲۲ بیان‌کردند که ترکیبات موجود در بزاق زالو با سرعت بخشیدن به روند اپیتلیزاسیون و آنژیوژنز می‌تواند روند ترمیم زخم را سرعت بخشند و این ترکیبات با سرعت بخشیدن به روند ری‌اپیتلیزاسیون موجب تسریع ترمیم زخم می‌شوند. در مطالعه‌ی انجام شده، روند اپیتلیزاسیون در گروه درمانی با بزاق زالو نسبت در روزهای ۱۴و۲۱ پس ازدرمان با گروه کنترل دارای اختلاف معنا دار بوده و این اختلاف در روز ۲۱ بین گروه بزاق زالو با گروه انتی بیوتیک نیز معنا دار میباشد در پایان روز ۲۱ در بسیاری از لام‌های تهیه شده در گروه بزاق زالو نیزکراتینیزیشن مشاهده شد که با مطالعات پیشین هم‌سویی دارد.

Leibovich و Ross در سال ۱۹۷۵ بیان کردند که آنژیوژنز، به شکل‌گیری رگ‌های جدید اطلاق می‌شود که با وقوع هیپوکسی و تجمع اسید لاکتیک در بافت آغاز می‌شود و یکی از وقایع مهم در ترمیم زخم است. Di peppe و همکاران در سال ۲۰۰۲ بیان کردند که آنژیوژنز با افزایش خونرسانی در محل جراحت ، اکسیژن بافت، تغذیه و رشد سلول‌ها را تامین می‌کند و ایسکمی را محدود می‌کند و

موجب ترمیم جراحت می‌شود. امانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ به این نتیجه رسیدند که ترکیبات موجود در بزاق زالو منجر به آنژیوژنز اولیه می‌شود و این خود به روند التیام زخم کمک می‌کند. در مطالعه‌ی انجام شده، در گروه درمانی با بزاق زالو، میزان آنژیوژنز در روز ۱۴ دارای سطح اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد. این موضوع نشان‌دهنده‌ی برطرف‌شدن هیپوکسی بافت و محدودشدن ایسکمی محل جراحت و تزیع روند ترمیم می‌باشد. در روز ۲۱ نیز، کاهش آنژیوژنز در گروه درمانی بزاق زالو دیده شد اگرچه سطح معنی داری با سایر گروه ها نبود که نشان‌دهنده‌ی ترمیم بافت و بازگشت بافت آسیب دیده به شرایط نرمال می‌باشد که با مطالعات پیشین هم‌سویی دارد. به طور کلی، در بررسی هیستوپاتولوژی پارامترهای مورد نظر، با توجه به هم‌سویی نتایج به دست آمده در پارامترهای التهاب، ساخت کلاژن، اپیتلیزاسیون و آنژیوژنز با مطالعات پیشین می‌توان به این نتیجه رسید که می‌توان از بزاق زالو جهت تسریع و بهبود ترمیم زخم‌های عفونی‌شده با باکتری *پروتئوس میرابیلیس* استفاده کرد.

Bordoni و Herman در سال ۲۰۲۰ بیان کردند که زخم‌های عفونی به دسته زخم‌هایی اطلاق می‌شوند که معمولاً ناشی از مراقبت نادرست از زخم های تروماتیک هستند. زخم‌های این دسته، بافتی از بین رفته را نشان می‌دهند و معمولاً ناشی از میکروارگانیسم‌های موجود در احشاء سوراخ‌شده یا محل جراحی هستند. Cutting و Harding در سال ۱۹۹۴، علت تاخیر در روند ترمیم زخم را تولید توکسین‌ها و پروتئازها توسط باکتری‌های موجود در زخم خواندند. Singh و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Bessa و همکاران در سال ۲۰۱۵ دریافتند که باکتری‌ها از شایع‌ترین علل عفونت‌های زخم می‌باشند و اغلب، گونه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳۷٪) و پس از آن *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۷٪) ، *پروتئوس میرابیلیس* (۱۰٪) ، *اشریشیا کلی* (۶٪) و گونه‌های کورینه باکتریوم (۵٪) در ایجاد زخم‌های عفونی دخیل هستند. باکتری *پروتئوس میرابیلیس* یک باسیل گرم منفی و عضوی از خانواده باکتریایی انتروباکتریاسه می‌باشد. این باکتری به صورت نرمال جز فلور طبیعی روده انسان و جانداران است، به فراوانی در محیط‌زیست یافت می‌شود و به صورت یک پاتوژن فرصت‌طلب در عفونی کردن زخم‌ها نقش دارد (حسنی و فیروزی، ۲۰۱۴). sig و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که برخی ترکیبات موجود در بزاق زالو از جمله پپتید B، دستبیلاز، تروماسین و ترومایزین خاصیت ضد میکروبی دارند. فرم دناتوره‌ی دستبیلاز به عنوان باکتریواستات وابسته به دوز در کنترل جمعیت باکتری‌هایی چون *اشریشیا کلی*، استافیلوکوکوس اورئوس و *سودوموناس آئروژینوزا* عمل می‌کند (Indergand و Graf ، ۲۰۰۰). رسولی و همکاران در سال ۱۳۹۸ به این نتیجه دست یافتند که ترکیبات موجود در بزاق زالو در کنترل رشد دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشگاهی موثر است. رفیعی و همکاران در سال ۱۴۰۱ ترکیبات ضدمیکروبی موجود در بزاق زالو در کاهش بار میکروبی زخم‌های عفونی شده با *سودوموناس آئروژینوزا* موثر است. با توجه به خاصیت ضدمیکروبی ترکیبات موجود در بزاق زالو که در پژوهش‌های گذشته به اثبات رسیده است، بررسی‌های میکروبی در این مطالعه نشان از کاهش بار میکروبی در درجه اول در گروه زالو و در درجه دوم در گروه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین دارد. البته این کاهش بار میکروبی در گروه زالو تا روز هفت با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنادار بود و در روزهای ۱۴ و ۲۱ اختلاف معناداری بین این گروه و سایر گروه‌ها وجود نداشت. با توجه به اطلاعات به دست آمده و میزان باکتری در گروه آنتی‌بیوتیک در روز هفت، به نظر می‌رسد که آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در کنترل و کاهش تعداد باکتری *پروتئوس میرابیلیس* مورد استفاده بی‌تاثیر بوده است و سویه‌ی مورد استفاده نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان‌داده‌است. با این حال، در روز ۱۴، کاهش قابل ملاحضه‌ای در تعداد باکتری در گروه آنتی‌بیوتیک دیده می‌شود که با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنادار است اما به دلیل کاهش شدید میزان باکتری در تمامی گروه‌ها، احتمال می‌رود کاهش تعداد باکتری‌ها در روز ۱۴ در تمامی گروه‌ها به واسطه‌ی غلبه‌ی سیستم ایمنی میزبان به عفونت رقم خورده باشد. در روز ۲۱، بار میکروبی تمامی گروه‌ها به میزان زیادی افزایش یافته بود که احتمال می‌رود به دلیل برداشته‌شدن تاثیر غلبه ایمنی بدن با توجه به بسته شدن زخم اتفاق افتاده باشد. با توجه به روند کلی تغییرات میانگین تعداد باکتری‌ها در طول ۲۱ روز مشاهده شد که کاهش تعداد باکتری در گروه درمانی با بزاق زالو نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بوده است و این کاهش با گروه کنترل دارای اختلاف

معنادار بود. در بررسی تعداد تام بار میکروبی در طول ۲۱ روز، با اینکه بین گروه بزاق و گروه‌های آنتی‌بیوتیک و اوسرین اختلاف معناداری وجود نداشت اما اختلالی در روند ترمیم زخم در گروه درمانی با بزاق زالو ایجاد نشد و با توجه به کاهش قابل توجه تعداد باکتری‌ها در گروه بزاق در روز هفت نسبت به سایر گروه‌ها و همچنین تفاوت مشهود تعداد تام باکتری در طول ۲۱ روز در گروه بزاق با گروه کنترل، می‌توان به این نتیجه رسید که بزاق زالو در کنترل بار میکروبی زخم‌های عفونی‌شده با *پروتئوس میرابیلیس* به صورت کوتاه‌مدت موثر است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج باشد و در مصرف طولانی‌مدت نیز می‌تواند تا حدودی در کنترل بار میکروبی کمک‌کننده باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج موجود در بازار به دلیل انتقال ژن مقاوم پلازمید در باکتری *پروتئوس میرابیلیس* دیده می‌شود و هم‌چنین با توجه به خواص ضدالتهابی و ضدمیکروبی ترکیبات موجود در بزاق زالو پیشنهاد می‌شود از بزاق زالو در کنار آنتی‌بیوتیک مناسب (پس از انجام تست آنتی‌بیوگرام) جهت التیام و کنترل بار عفونی و کمک به تسریع و بهبود روند ترمیم زخم‌های جلدی عفونی‌شده باکتری *پروتئوس میرابیلیس* استفاده شود.

تعارض منافع

نویســـندگان هیچ گونه تعارض منافعی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

1. Abdisa T. Review on therapeutic importance of Leech and its impact in domestic animals. MOJ Drug Des Develop Ther. 2018;2(6):235-242. DOI: 10.15406/mojddt.2018.02.00068
2. Abdualkader AM, Merzouk A, Ghawi AM, Alaama M. Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. IIUM Engineering Journal. 2011 Dec 29;12(4). doi: https://doi.org/10.31436/iiumej.v12i4.156
3. Abdualkader AM, Ghawi AM, Alaama M, Awang M, Merzouk A. Leech therapeutic applications. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2013;75(2):127-137.
4. Abdullah S, Dar LM, Rashid A, Tewari A. Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. Arch Clin Exp Surg. 2012 Jan 1;1(3):172-80. doi: 10.5455/aces.20120402072447
5. Aiello SE, Moses MA, Allen DG, editors. The Merck veterinary manual. White Station, NJ, USA: Merck & Company, Incorporated; 2016 Nov.
6. Amani L, Fadaei F, Shams Ardakani M, Mirabzadeh Ardakani M, Shirbeigi L. Treatment of Diabetic Foot Ulcer (DFU) with Pharmaceutical Product using Hirudo orientalis: A Case Report. Journal of Advances in Medical and Biomedical Research. 2020 Jul 10;28(129):225-9. doi: http://dx.doi.org/10.30699/jambs.28.129.225
7. Amani L, Motamed N, Ardakani MM, Shasaltaneh MD, Malek M, Shamsa F, Fatemi E, Amin M. Semi-solid product of medicinal leech enhances wound healing in rats. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2021 Nov 30;16(4). doi: https://doi.org/10.5812/jjnpp.113910
8. Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, DeOrnellas V, Eaton KA, Yep A, Mody L, Wu W, Mobley HL. The pathogenic potential of Proteus mirabilis is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. Infection and immunity. 2017 Feb;85(2):10-128. doi: https://doi.org/10.1128/iai.00808-16
9. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. International Wound Journal. 2015 Feb;12(1):47-52. doi: https://doi.org/10.1111/iwj.12049
10. Clarke CE. Medical therapeutics derived from leeches (phy. Annelida; cl. Hirudinea). Muse Journal. 2016;3(1):211-223. doi: https://doi.org/10.31542/j.muse.297
11. Cutting KF, Harding KG. Criteria for identifying wound infection. Journal of Wound Care. 1994 Jun 2;3(4):198-201. doi: https://doi.org/10.12968/jowc.1994.3.4.198
12. Das BK. An overview on hirudotherapy/leech therapy. Indian Research Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014 Jun;1(1):34.
13. Eldor A, Orevi M, Rigbi MJ. The role of the leech in medical therapeutics. Blood Reviews. 1996 Dec 1;10(4):201-9. doi: https://doi.org/10.1016/S0268-960X(96)90000-4
14. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery (Oxford). 2008 Feb 1;26(2):31-7. doi: https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.11.005
15. Gal P, Kilik R, Mokry M, Vidinsky B, Vasilenko T, Mozes S, Bobrov N, Tomori Z, Bober J, Lenhardt L. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. Veterinary Medicine. 2008 Dec 31;53(12):652-9. doi: 10.17221/1973-VETMED
16. Garivani B. Investigating the effect of leech saliva on osteomyelitis induced by Kirschner wire and methicillin-

resistant Staphylococcus aureus in rat tibia bone. Veterinary Professional Doctoral Thesis No. 89, Semnan University, Semnan. 2018.
17. Hasani Tabatabai A, Firouzi R. Bacterial diseases of livestock (4th ed). Tehran University Press, Tehran. (in Persian) 2014.
18. Herman TF, Bordoni B. Wound classification; 2020.
19. Indergand S, Graf J. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of Aeromonas veronii biovar sobria and Hirudo medicinalis, the medicinal leech. Applied and Environmental Microbiology. 2000 Nov 1;66(11):4735-41. doi: https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4735-4741.2000
20. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier Health Sciences; 2005.
21. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. The American Journal of Pathology. 1975 Jan;78(1):71.
22. Nikrou B, Naeimi S, Rassouli M, Ghaffari Khaligh S. The healing of wounds infected with Staphylococcus aureus is accelerated by leech saliva ointment. Iranian Journal of Veterinary Surgery. 2024. doi: https://doi.org/10.30500/ivsa.2024.467335.1411
23. Norouzian A, Habibi Gh, Fariver M. Wound management in large animals. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran. (in Persian) 1991.
24. Nutt EM, Jain D, Lenny AB, Schaffer L, Siegl PK, Dunwiddie CT. Purification and characterization of recombinant antistasin: a leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1991 Feb 15;285(1):37-44. doi: https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90325-D
25. Rafiei A. Investigating the effect of leech saliva on the healing of open skin wounds with Pseudomonas aeruginosa bacteria in rats. Veterinary Professional Doctoral Thesis No. 175, Semnan University, Semnan. (in Persian) 2022.
26. Rasooli M, Estaji H, Beykha M, Maddah S, Raeisian B, Moshtaghi A, Roozbeh M. The effect of leech saliva (Hirudo medicinalis) on the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli in laboratory conditions. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;24(87):51-55. (In Persian) Available: https://sid.ir/paper/398030/fa
27. Rigbi M, Orevi M, Eldor A. Platelet aggregation and coagulation inhibitors in leech saliva and their roles in leech therapy. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 1996 Jun;22(3):273-278. doi: 10.1055/s-2007-999019
28. Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, Spinetti G, Melillo G, Napolitano M, Capogrossi MC. Adenovirus-mediated VEGF165 gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. Gene Therapy. 2002 Oct;9(19):1271-7. doi: https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301798
29. Różalski A, Torzewska A, Moryl M, Iwona K, Agnieszka M, Kinga O, Drzewiecka D, Zabłotni A, Palusiak A, Siwinska M, Paweł S. Proteus sp.–an opportunistic bacterial pathogen–classification, swarming growth, clinical significance, and virulence factors. Folia Biologica. 2012;8(1):1-17. doi: 10.2478/fobio-2013-
30. Sig AK, Guney M, Guclu AU, Ozmen E. Medicinal leech therapy—an overall perspective. Integrative Medicine Research. 2017 Dec 1;6(4):337-43. doi: https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.001
31. Singh AP. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2010 Nov 1;16(4):213-5. doi:

https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005
32. Singh K, Anderson E, Harper JG. Overview and management of sternal wound infection. Seminars in Plastic Surgery. 2011 Feb;25(1):25–33. doi: https://doi.org/10.1055/s-0031-1275168
33. Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. Journal of Applied Microbiology. 2002 May 1;92(s1):163S-70S. doi: https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.6.x
34. Tasiemski A. Antimicrobial peptides in annelids. Invertebrate Survival Journal. 2008 Jun 11;5(1):75-82.
35. Tasiemski A, Vandenbulcke F, Mitta G, Lemoine J, Lefebvre C, Sautiere PE, Salzet M. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech Theromyzon tessulatum. Journal of Biological Chemistry. 2004 Jul 23;279(30):30973-82. doi: https://doi.org/10.1074/jbc.M312156200
36. Thakur R, Jain N, Pathak R, Sandhu SS. Practices in wound healing studies of plants. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011 Oct;2011. doi: 10.1155/2011/438056
37. Wollina U, Heinig B, Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy). Our Dermatology Online/Nasza Dermatologia Online. 2016 Jan 1;7(1). doi: 10.7241/ourd.20161.24
38. Zaidi SM, Jameel SS, Zaman F, Jilani S, Sultana A, Khan SA. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. Alternative Medicine Review. 2011 Mar 1;16(1):59-65.
39. Zavalova LL, Artamonova II, Berezhnoy SN, Tagaev AA, Baskova IP, Andersen J, Roepstorff P, Egorov TA. Multiple forms of medicinal leech destabilase-lysozyme. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003 Jun 20;306(1):318-23. doi: https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00896-9

Abstracts in English

Evaluation of leech salivation on infectious opened-wound healing with *Proteus mirabilis* in rat

Seyedeh Shaghayegh Zenozadeh[1], Sahar GhaffariKhaligh[2*], Hamid Estaji[2], Hamidreza Moslemi[3]

1. Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
3.Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

s_ghaffari@semnsn.ac.ir*

Background: Infection control and improvement of the wound healing process are of great importance. Leech saliva has anti-inflammatory, antimicrobial, and restorative properties, so it can be a good alternative to common antibiotics resistant to many bacteria.

Objectives: This study aimed to investigate the effect of leech saliva on the healing process of an open skin wound infected by Proteus mirabilis by examining histopathological and microbiological changes.

Methods: After preparing leech saliva, a 5 percent leech ointment (95 grams of Eucerin, 5 grams of leech saliva) was made, and 60 male Wistar rats were prepared and divided into 4 groups. A wound with a 1.5cm diameter was created by a biopsy punch in the posterior area between the two scapulae skin of each rat. Then, it was infected by inoculation of 10^6cfu of bacteria. Then, the groups were treated separately with gentamicin ointment, Eucerin, and leech ointment. One group didn't receive any medication as a control. Ointments were renewed every other day for up to 21 days. For microbial and histopathological investigations, sterile samples were taken randomly from 5 rats on days 7, 14, and 21 after euthanizing.

Results: In the microbial investigation of the total number of bacteria during 21days, the bacterial population in the group treated with leech saliva was less than the other groups, which had a significant difference with the control group, and specifically, the difference in the number of bacteria on the seventh day was significant with the other groups. In the examination of pathology sections, including the examination of collagen, epithelization, fibroblast density, and the amount of inflammation and angiogenesis, there was a significant difference between the treatment group with leech saliva and the control group in inflammation, epithelization, and collagen production, and no significant difference was observed between the leech and gentamicin groups in most of the parameters, except for the epithelizing factor, which had a significant difference on the 21st day of treatment.

Conclusions: This research aims to investigate leech saliva's effect in controlling inflammation and accelerating healing in infected wounds with Proteus mirabilis bacteria. The findings of this study show that leech saliva causes collagen production and increases the speed of the epithelialization process. Also, due to its antimicrobial properties, leech saliva can control the Proteus mirabilis bacterial population and can be a suitable substitute for antibiotics in short-term use. According to the discussion of antibiotic resistance regarding this bacterium, leech saliva can be used with appropriate antibiotics to control and accelerate the process of infected wounds, especially wounds infected with Proteus mirabilis.

Keywords: Histopathology, Leech saliva, Microbiology, Open infectious wound, Proteus mirabilis.