

اثرات مقایسه‌ای عصاره بدن کرم خاکی و فنی توین سدیم بر ترمیم زخم بخیه در ماهی طلایی *Carassius auratus*سراج حیدری M.Sc.^۱، مهران عربی Ph.D.*^۱، امین نعمت‌اللهی Ph.D.^۲، ایرج کریمی Ph.D.^۲، امین بیغم صادق Ph.D.^۲

۱- دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی ۱۱۵، شهرکرد، ایران

۲- دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، صندوق پستی ۱۱۵، شهرکرد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mehranarabi@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۶

چکیده

هدف: در این تحقیق عصاره بدن کرم خاکی (*Eisenia foetida*) (در حلال شامل روغن زیتون و وازلین) به‌عنوان یک محرک جدید در ترمیم زخم بخیه ماهی طلایی (*Carassius auratus*) مورد استفاده قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: تقسیم بندی گروه‌ها عبارت بودند از: کنترل منفی (پوست سالم)، کنترل مثبت (زخم بخیه با فنی توین)، کنترل کاذب (شم: زخم بخیه با تیمار حلال) و تجربی (زخم بخیه با تیمار ۱۰ میلی گرم از عصاره بدن کرم خاکی). در هر ماهی در امتداد سر به دم یک زخم طولی دو سانتی‌متری ایجاد و پس از بخیه تیمار روزانه شد. پس از گذشت ۱۴ روز، خون‌گیری به‌عمل آمد. مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نیز به انجام رسید. همچنین محتوی پراکسیداسیون لیپیدها (LPO/MDA) در سرم خون ماهیان طلایی سنجیده شد.

نتایج: بررسی سطح بیرونی زخم‌ها و مشاهدات میکروسکوپی تاثیر بهتر تیمار با عصاره کرم خاکی در مقایسه با فنی توین را نشان داد. در تیمار با عصاره بدن کرم خاکی مشخص گردید که میزان کمتری از MDA نسبت به سایر گروه‌ها در سرم خون ماهیان طلایی تولید شده است.

نتیجه‌گیری: عصاره بدن کرم خاکی به‌عنوان کاندید جدید در ترمیم زخم آبزیان بوده که اجزایی از آن با ورود به خون و فعال‌سازی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانسی بدن موجب کاهش میزان LPO در سرم خون ماهیان می‌شود.

واژگان کلیدی: ترمیم زخم بخیه، ماهی طلایی، عصاره بدن کرم خاکی، فنی توین، LPO

مقدمه

یکی از مواردی که در علم آبی پروری مورد توجه قرار گرفته، نحوه برداشت خاویار از ماهیان خاویاری است. سابق بر این ماهی خاویاری ماده با عمر حدود ۶ تا ۷ سال را صید و سپس اقدام به خارج سازی تخم‌ها یا همان خاویار از شکم ماهی می‌نمودند، اما در سال‌های اخیر با روش جراحی شکم و سپس بیرون کشیدن خاویار، دیگر نیازی به کشتن ماهی مادر نبوده و این ماهی پس از درمان و ترمیم مناسب زخم در آب محل پرورش رها می‌شود. از طرف دیگر همیشه محیط زندگی ماهیان دربردارنده انواع عفونت‌ها و میکروب‌ها بوده که این خود تاثیر منفی در جریان ترمیم زخم بر جای می‌گذارد. لذا در این خصوص چنانچه بتوان از عصاره‌های مختلف گیاهی و جانوری مثل عصاره‌ی بدن کرم خاکی در تیمار و درمان موثر زخم در ماهیان خاویاری استفاده نمود، کمک زیادی به رونق اقتصادی آبی پروری خواهد شد. استفاده هم‌زمان از سه عصاره گیاهی در محل زخم‌های تجربی ایجاد شده توسط تزریق باکتری آئروموناس در پوست ماهی طلائی موجب کاهش جمعیت میکروبی و بهبود سریع‌تر زخم‌های ایجاد شده در پوست این ماهیان گردید (۸).

کرم‌های خاکی از جمله بی‌مهرگان خاکزی بوده که به جهت بارورسازی خاک مناطق مختلفی از کره زمین از اهمیت به‌سزایی برخوردارند. از میان ترکیبات مختلف بدن کرم‌های خاکی، نوعی کمپلکس گلیکولیپوپروتئینی که دارای خواص متفاوتی نظیر: اثرات آنتی‌اکسیدانتی، ضدباکتریایی و محرک رشد سلولی بوده، مدنظر محققین قرار گرفته است. میزان محتوی پروتئینی موجود در ساختار مستخرج از عصاره بدن نوعی کرم خاکی موسوم به *Eisenia foetida* در حدود ۴۰ میکروگرم در هر میلی‌گرم آن می‌باشد. در ساختار این کمپلکس گروه‌های آمینی به همراه با قندها و گلوکولیپیدها وجود دارند (۹). در همین ارتباط نتایج مطالعات سال‌های قبل در زمینه اثر عصاره بدن کرم‌های خاکی بر تسهیل روند ترمیم زخم در پوست موش نشان داده که این عصاره موجب افزایش بازسازی اپی‌تلیوم و افزایش سنتز برخی فاکتورهای رشد نظیر EGF در محل ضایعه پوستی شده است (۱۰).

داروی فنی توپین (Phenytoin) در اصل نوعی داروی ضد صرع بوده که اثرات التیام دهنده آن بر روی زخم‌های پوستی به اثبات رسیده است. فنی توپین در بسیاری از سیستم‌های فیزیولوژیکی اثرات مهمی را اعمال می‌کند. این دارو انتقال یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم، پتانسیل غشای سلول و غلظت اسیدهای آمینه

در انواع مدل‌های جانوری فرآیند ترمیم زخم بلافاصله پس از ایجاد آسیب در محل بافت شروع و به تدریج با مهاجرت‌های سلولی و سپس تولید و انباشت رشته‌های کلاژن در ناحیه درم، پیگیری شده و در نهایت زخم مورد نظر ترمیم و بهبود یابد. وسعت زخم ایجاد شده، محل ایجاد آن و تاثیر عوامل محیطی، همگی موجب تغییر در روند ترمیم زخم و زمان انجام کامل آن می‌شوند. هر قدر از میزان بار میکروبی محل زخم کاسته شود، به همان میزان روند ترمیم بهتر و سریع‌تر می‌شود. در این میان چنانچه عوامل کمکی نظیر انواع داروها، عصاره‌های گیاهی و یا جانوری در محل زخم مورد استفاده قرار گیرند، فرآیند ترمیم زخم با کیفیت بهتر و گاه سریع‌تر به انجام خواهد رسید (۱).

درمان به موقع و موثر زخم‌های عفونی پس از جراحی در بسیاری از ماهیان زینتی یا آکواریومی نظیر ماهی طلائی و دیگر ماهیان با ارزش نظیر انواع ماهیان خاویاری بسیار مورد توجه قرار داشته و به کاهش میزان مرگ و میر در این جانوران کمک زیادی نموده است. تومورهای خارجی در سطح بدن ماهیان نیز نیاز به جراحی و سپس ترمیم زخم موثر دارند (۲). گاه مشکلات شناوری و یا بیماری‌های شدید چشمی در ماهیان نیز نیازمند جراحی فوری و موثر بوده که در این میان ترمیم زخم‌های مربوطه از اهمیت خاصی برخوردار است (۳ و ۴). تغذیه و درجه حرارت مناسب بر روند ترمیم زخم در پوست ماهیان نقش موثری داشته به طوری که برخی ویتامین‌ها مثل C و A از اهمیت بسیاری در این روند برخوردارند (۵). استفاده غذایی از ترکیب آلفا- کیتوسان در ماهی کپور معمولی موجب افزایش سرعت مسدود شدن محل زخم و تسهیل روند ترمیم آن می‌شود (۶).

در دیگر تحقیقات نیز نشان داده شده که حتی نوع پانسمان و نیز نوع و تعداد بخیه‌ها در پوست ماهی موجب بروز تغییرات معنی‌دار در روند ترمیم زخم می‌شود. نعمت‌اللهی و همکاران (۷) نشان دادند که کاربرد الگوهای مختلف از بخیه موجب تغییر در روند کیفیت بهبود زخم و زمان کامل شدن آن شده به طوری که استفاده از بخیه زیر کوتیکولی، با کمترین میزان التهاب در برش‌های بافتی پوست ماهی طلائی همراه بوده، که در نهایت موجب تسریع روند ترمیم زخم و بهتر شدن شکل بیرونی آن می‌گردد.

زخم بخیه در ماهی طلایی *Carassius auratus* در پژوهش حاضر مورد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهیان طلایی *Carassius auratus* به دلیل مقاوم بودن و نگهداری آسان و شباهت آناتومیکی و فیزیولوژیکی با دیگر گونه‌های ماهیان کپور، به عنوان مدل جانوری در این پژوهش استفاده شدند. ماهیان مورد استفاده با اندازه 15 ± 2 سانتی‌متر و محدوده وزنی 40 ± 3 گرم انتخاب و در چهار گروه: کنترل منفی (پوست سالم)، کنترل مثبت (زخم و تیمار فنی تویین)، کنترل کاذب یا شم (زخم و تیمار وازلین و روغن زیتون) و تجربی (زخم با تیمار ۱۰ میلی‌گرم از پودر عصاره بدن کرم خاکی در یک گرم حلال چربی) تقسیم بندی شدند. در هر گروه حداقل ۸ قطعه ماهی طلایی قرار داده شد.

ماهی‌ها در آکواریوم‌های ۵۰ لیتری آب با ۰/۵ درصد NaCl به مدت یک روز نگهداری شده تا با شرایط آزمایشگاهی سازش پیدا کنند. پس از این مدت ماهی‌ها مورد جراحی و سپس بخیه زدن قرار گرفتند. ابتدا این جانوران توسط محلول ۱۰ درصد بنزوکائین بی‌هوش گردیدند. نحوه جراحی بدین صورت بود که ابتدا پس از برداشت فلس از سطح پوست توسط تیغه اسکالپل با قیچی جراحی یک برش به طول یک سانتی متر در راستای سر به دم در خط وسط شکمی و عمق ضخامت کامل بافت تا حفره شکمی ایجاد گردید. سپس دو بخیه از نوع تکی بر روی محل برش‌ها زده شد و پس از آن ماهی‌ها به داخل آکواریوم برگردانده شدند. دمای آب آکواریوم در این مدت ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد و pH آب حدود ۶/۵ تا ۸ بود. آب آکواریوم‌ها هر ۴ روز یکبار تعویض می‌شد.

عصاره بدن کرم‌های خاکی *Eisenia foetida* به صورت پودری سفید رنگ بوده که به کمک متانول و کلروفرم و در نهایت خشکی انجام دادی از آنان استخراج گردید. پس از مدت ۲۴ ساعت از زمان ایجاد زخم‌های برشی و سپس بخیه درمان با دارو آغاز گردید. تیمارها روزانه یکبار و به مدت ۱۴ روز متوالی صورت گرفتند. پس از این مدت، خون‌گیری از ناحیه سیاهرگ دمی گروه‌های مختلف انجام و برداشت بافت از محل جراحی‌ها صورت گرفت.

و ناقلین عصبی نور اپی‌نفرین و استیل‌کولین و گابا را دستخوش تغییر می‌کند. مکانیسم‌های احتمالی اثرات این دارو بر روی پوست در ماهی طلایی، ممانعت از فعالیت غیر طبیعی آنزیم کلاژناز و همچنین افزایش مقدار کلاژن، تکثیر فیبروبلاستی، تسریع در تشکیل بافت جوانه‌ای (گرانوله) جدید و تحریک روند رگ‌زایی جدید می‌باشد (۱۱).

پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) به دو صورت طبیعی و غیرطبیعی در سلول‌ها و بافت بدن تولید شده و قابلیت گسترش دارد. اثرات منفی LPO بر عمل‌کرد چربی‌ها و آنزیم‌های غشایی، آنزیم‌های زنجیره تنفسی در میتوکندری و حتی ژنوم به‌خوبی به اثبات رسیده است. LPO در تمامی سلول‌های غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه (PUFA) رخ داده و از مجموع واکنش‌هایی که شامل تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در اسیدهای چرب غیر اشباع لیپیدهای غشایی است، ناشی می‌شود. روی هم رفته LPO مجموعه واکنش‌هایی است که به موجب آن اکسیژن مولکولی به PUFA حمله ور شده و پراکسیدهای لیپیدی را تشکیل می‌دهد (۱۲). LPO، سیالیت غشاها را کاهش داده و در مقابل ویسکوزیته آنان را افزایش می‌دهد. به این ترتیب عمل‌کرد ساختار موزاییک سیال غشای مختل شده و یا از بین می‌رود. (۱۳). یکی از مکانیسم‌های اصلی در پیشبرد روند LPO اکسیژناسیون غیر آنزیمی PUFA یا اتواکسیداسیون بوده که توسط انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) و نیتروژنی (NOS) و نیز حضور یون‌های فلزی تحریک و با میانجی‌گری آنتی‌اکسیدانت‌ها مهار می‌شود. این رادیکال‌ها به غشای سلول حمله‌ور شده و موجب القا روند LPO می‌شوند. از جمله انواع ROS می‌توان به رادیکال هیدروکسیل (OH^{\bullet}) و آنیون سوپراکسید ($\text{O}_2^{\bullet-}$) اشاره نمود (۱۴). در طول روند LPO، متابولیت‌ها و محصولات بینابینی مختلفی آزاد شده که به جهت میل ترکیب زیاد با اسید باربیتوریک (TBA) در سنجش‌های آزمایشگاهی به آنان TBARS اطلاق می‌شود. در حدود ۵۰ درصد از TBARS را ترکیبی به نام مالون دی‌آلدیید (MDA) به خود اختصاص داده که میل ترکیب زیادی با چربی‌های سلولی و ژنوم داشته و موجب اختلال در عمل‌کرد آنان می‌شود (۱۵ و ۱۶).

از آنجایی که طراحی و اجرای این پژوهش در آریزان در نوع خود جدید و بدون تکرار بوده لذا ضرورت بررسی اثرات ترمیم‌کنندگی عصاره بدن کرم خاکی *Eisenia foetida* بر روند التیام

جهت مقایسه میانگین داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) و پس از آزمون Tukey's HSD در نرم افزار SPSS (ویراست ۱۶) استفاده گردید. سطح $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی (هیستوپاتولوژی) و ماکروسکوپی

در بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی نمونه‌های بافتی مشخص گردید که در تیمارهای با پماد حاوی عصاره بدن کرم خاکی (گروه تجربی) رگ زایی بهتر و باز سازی اپی‌تلیوم (شکل ۱)، افزایش میزان تکثیر فیبروبلاستی و آرایش منظم‌تر رشته‌های کلاژنی و کاهش تعداد سلول‌های آماسی نسبت به سایر گروه‌ها (شکل ۲)، و در مجموع پارامترهای بهتر و کامل‌تری در بهبود و ترمیم زخم بخیه‌ها مشاهده گردید (جدول ۱). در طول دوره ۱۴ روزه‌ی آزمایش هیچ‌گونه مرگ و میری در بین ماهیان طلائی مشاهده نشد. از سوی دیگر نیز بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که از دید خارجی و سطحی نیز ترمیم بهتر و کامل‌تری در زخم‌های بخیه‌دار گروه تجربی نسبت به سایر گروه‌ها صورت گرفته است (شکل ۳).

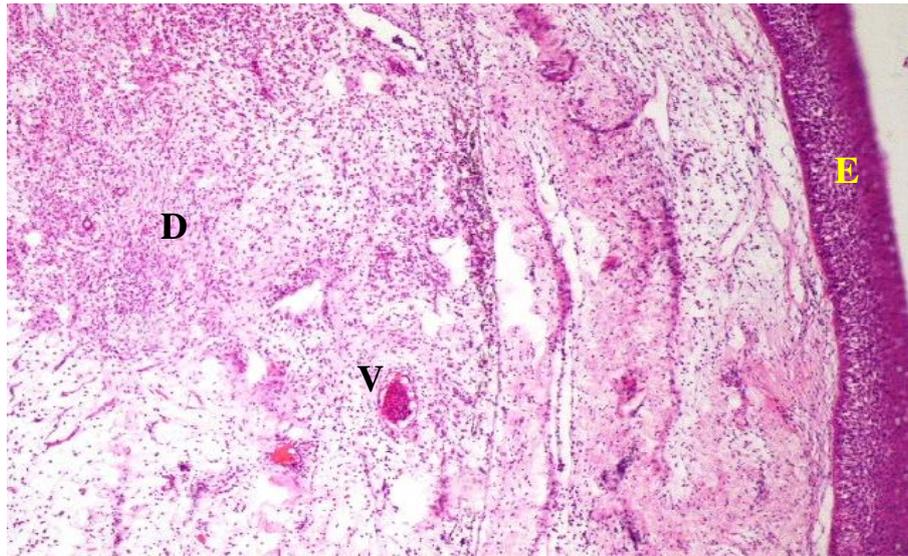
نمونه‌های بافتی در محلول ۱۰ درصد فرمالین به مدت ۱۰ روز فیکس شده و پس از برش‌گیری در انتها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-آنوزین اسلایدهای تهیه شده به کمک میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای مختلف ترمیم زخم ارزیابی و درجه بندی گردیدند. نمونه‌های خون مورد نیاز نیز از ناحیه سیاهرگ دمی گروه‌های مختلف برداشت و سرم‌های مربوطه جدا شدند.

در بررسی‌های تغییرات LPO، میزان MDA به روش اسپکتروفوتومتری در سرم خون ماهیان طلائی مورد سنجش قرار گرفت. در ابتدا سرم‌های خون موجود در لوله‌های آزمایش به کمک محلول ده درصد اسید تری کلرو استیک (TCA) سرد به نسبت یک به سه رقیق شدند. سپس این سرم‌ها مدت یک دقیقه با حداکثر دور $2500 \times g$ سانتریفیوژ گردیده تا مایع بالای (سوپرناتانت) حاصل گردد. سوپرناتانت را به نسبت ۱:۱ با محلول یک درصد اسید تیوباریتوریک (TBA) رقیق شد. سپس مجموعه‌های به دست آمده را در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج سازی و سرد نمودن لوله‌ها در دمای اتاق، محتوی هر لوله به یک کووت منتقل و در طول موج ۵۳۲ نانومتر به کمک اسپکتروفوتومتر (دستگاه Herolab مدل UVT-20 M/L ساخت آلمان)، میزان جذب نوری نمونه‌ها اندازه گیری شد (۱۷).

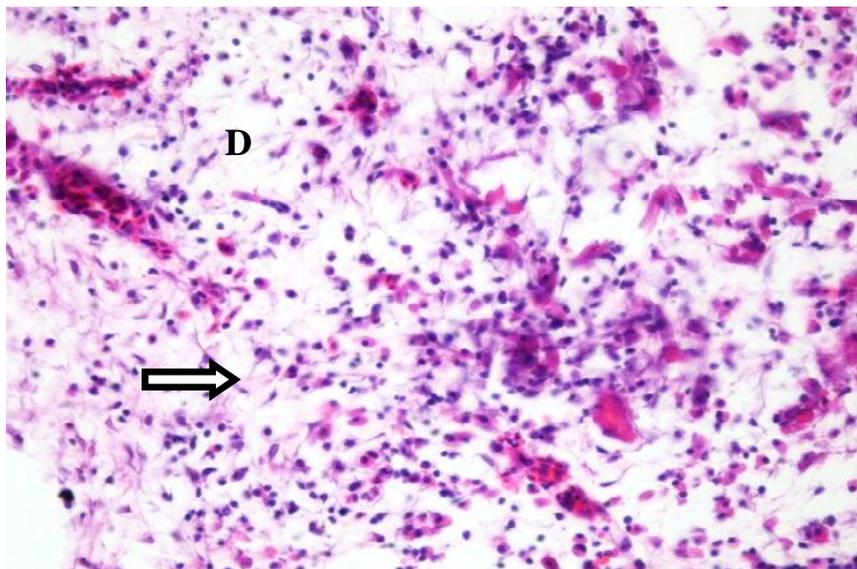
آنالیز آماری: در این پژوهش تمامی داده‌ها به صورت Means \pm Standard Deviation (SD) نمایش داده شده اند.

جدول ۱: نتایج بررسی‌های هیستوپاتولوژی و درجه بندی پارامترهای ترمیم زخم بخیه‌ها پس از یک دوره ۱۴ روزه در تیمارهای مختلف.

تیمارها			پارامتر مورد بررسی
گروه تجربی (عصاره کرم خاکی)	کنترل مثبت (پماد فنی تویین)	کنترل کاذب (شم)	
-	+	++	حضور سلول‌های آماسی
+++	++	+	بلوغ فیبروبلاستی
++	+	-	رگ‌زایی جدید
++	+	+	بازسازی اپی‌تلیوم
+	+	-	میزان گرانوله شدن



شکل ۱: بازسازی کامل اپی تلیوم همراه با انباشت کامل فضای زخم در درم توسط بافت پیوندی و تشکیل رگ های خونی جدید در گروه تجربی. E: اپیدرم، D: درم، V: رگ خونی (بزرگنمایی ۴۰۰×)



شکل ۲: وجود رشته های فراوان کلاژن و کاهش تعداد سلول های آماسی در فضای زخم در گروه تجربی. D: درم، فلش: پراکندگی، سلول های آماسی (بزرگنمایی ۴۰۰×)

نتایج حاصل ارزیابی تغییرات LPO

نتایج موجود در جدول ۲ نشان می دهند که در گروه شم میزان MDA سرم خون (محتوی LPO) درمقایسه با گروه کنترل (بدون زخم) در انتهای دوره ۱۴ روزه به صورت معنی داری افزایش یافته، به طوری که این میزان تغییر در سطح معنی داری $p < 0.05$ برابر با $134/78$ درصد می باشد. دو تیمار عصاره کرم خاکی و پماد فنی توپین موجب کاهش میزان LPO سرم خون گردیده؛ با این تفاوت که این کاهش درمقایسه ی تیمار عصاره

کرم خاکی با کنترل کاذب یا شم معنی دار بوده ($p < 0.05$)، اما در مقایسه با پماد فنی توپین با گروه شم علی رغم کاهش معنی دار نمی باشد. چنانچه دو گروه تیمار با عصاره کرم خاکی و پماد فنی توپین با گروه کنترل مقایسه گردند، میزان کاهش LPO و نزدیکی مقدار آن به گروه کنترل، در گروه تیمار با عصاره کرم خاکی معنی دار نبوده اما در گروه تیمار با گروه فنی توپین اختلاف معنی دار است (جدول ۲).



شکل ۳: زخم بخیه دار تیمار شده با عصاره کرم خاکی. فلش نشان دهنده لایه شیرین رنگ بر روی محل زخم بخیه بوده که نسبت به سایر تیمارها شکل کامل تری به خود گرفته است.

جدول ۲: بررسی تغییرات پراکسیداسیون لیپیدها در سرم ماهیان طلایی در تیمارهای مختلف. واحد اندازه گیری $\mu\text{M MDA}/\text{mg protein}$ می باشد، داده ها به صورت $\text{Means} \pm \text{SD}$ آورده شده اند. اختلاف آماری بین گروه هایی که حروف غیر همنام دارند در سطح $p < 0.05$ معنی دار است.

پراکسیداسیون لیپیدها (LPO)	گروه
$0.92 \pm 0.02a$	کنترل منفی
$1.85 \pm 0.04bcd$	تیمار فنی توپین
$1.41 \pm 0.03ad$	تیمار عصاره کرم خاکی
$2.16 \pm 0.01cb$	کنترل کاذب (شم)

انتخاب درمان های مناسب تر و در عین حال موثرتر، مورد توجه محافل علمی قرار گرفته است (۱۸).

تاکنون هیچ اطلاعاتی در زمینه ترمیم زخم بخیه ها به کمک عصاره بدن کرم های خاکی در ماهی ها در منابع معتبر علمی دنیا در دسترس نبوده و این تحقیق برای اولین بار بوده که به انجام رسیده است.

در سال ۲۰۰۱ نیز مشخص گردید که عصاره بدن کرم های خاکی واجد خاصیت های آنتی اکسیدانتی و ضد باکتریایی بوده و بدین ترتیب می توان آن را به عنوان یک کاندید مناسب در فرآیند ترمیم زخم در جانوران مد نظر قرار داد (۱۹). همچنین در این ارتباط مشخص شده که این عصاره در پوست موش ها موجب افزایش بازسازی مشهود اپی تلیوم و افزایش سنتز برخی فاکتورهای رشد نظیر EGF و FGF در محل ضایعه پوستی شده

بحث

روند ترمیم زخم یکی از پیچیده ترین فرآیندهای فیزیولوژیکی بوده که در طی آن سلول ها و ترشحات مختلف سلولی به ویژه فاکتورهای رشد و بسیاری از سیتوکین ها وارد عمل می شوند. به دنبال بروز آسیب در پوست، وقایع مولکولی و فعالیت های سلولی شامل التهاب، شکل گیری بافت جدید و باز آرایه های بافتی به صورت پشت سرهم رخ داده و در نهایت منجر به ترمیم جزیی و یا کلی بافت آسیب دیده می شوند. این روند از اهمیت فراوانی در پزشکی (درمان زخم های دیابتی و جراحی) و دامپزشکی (درمان زخم در سطح بدن ماهیان زینتی اکواریومی و نیز ماهیان خاویاری) برخوردار است. علاقه و توجه به درمان هر چه بهتر زخم در ماهیان زینتی که از ارزش اقتصادی قابل توجه ای نیز برخوردار هستند، رو به افزایش بوده، لذا در این میان

در برخی از مطالعات نیز افزایش فاکتورهای رشد نظیر EGF در محل زخم‌ها موجب فروکش نمودن و مهار روند تولید LPO در آن ناحیه شده که نتیجه آن ترمیم سریع‌تر و بهتر زخم خواهد بود. نتایج حاصله از یک کار گروهی در سال ۲۰۰۷ نشان داد که چنانچه EGF در محل زخم‌های دهان خرگوش‌ها تزریق و وارد گردد، به‌طور معنی‌داری از میزان LPO در ضایعه‌ی بافتی کاسته شده و ترمیم بهتر صورت می‌گیرد. در همین گزارش پیشنهاد گردیده که EGF به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانسی در محل زخم عمل نموده و موجب خنثی سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژنی شده است (۲۲).

از آنجایی‌که عصاره بدن کرم‌های خاکی در پوست موش‌ها موجب افزایش EGF گردیده (۱۹) و با توجه به موارد ذکر شده در بالا و همچنین نتایج این تحقیق، می‌توان عنوان نمود که استفاده از عصاره بدن کرم‌های خاکی موجب افزایش تولید EGF در بافت‌های مختلف بدن ماهی طلائی شده و به این ترتیب با کاهش محصولات نهایی LPO از آسیب‌های بافتی جدید و بیشتر در طی روند ترمیم زخم کاسته می‌شود. از سوی دیگر چنانچه تحت اثر عوامل مشخص نظیر EGF مهار LPO در محل زخم به انجام رسد، اتفاقات مثبتی نظیر رگ‌زایی جدید در محل ضایعه روی داده که منجر به بهبود بهتر و سریع‌تر زخم خواهد شد (۲۳).

نتیجه گیری

از آنجایی‌که عصاره بدن کرم‌های خاکی قابلیت حل شدن در پایه چربی را داراست لذا در محیط‌های آبی جهت ترمیم زخم‌های آبزیان مورد کاربرد فراوان داشته به‌طوری‌که در پژوهش حاضر در ماهیان طلائی موجب ترمیم و بهبود کامل‌تر زخم‌های پوستی به‌ویژه انواع بخیه‌دار شده است. لذا می‌توان اظهار نمود که عصاره بدن کرم‌های خاکی که منبع سرشاری از ماکرومولکول‌های مختلف است، می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسب در روند ترمیم زخم‌ها در جانوران به‌ویژه آبزیان در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

است (۱۰). نتایج این دو پژوهش در تایید نتایج پژوهش حاضر بوده که در طی آن عصاره بدن کرم‌های خاکی قابلیت ترمیم هر چه بهتر زخم‌های پوستی ماهیان را در مقایسه با داروی متداول نظیر فنی توپین دارا می‌باشد.

در پژوهش حاضر از بخیه زیر کوتیکولی جهت بهره‌گیری مناسب از جفت شدن دو سر محل برش استفاده بهینه گردید. نعمت الهی و همکاران (۲۰) نشان دادند که نوع بخیه در بهبود بهتر و موثرتر محل زخم در جراحی‌های ماهی طلائی نقشی اساسی را ایفا نموده و در این میان بخیه‌ی نوع زیر کوتیکولی بهترین نتیجه را به‌دنبال داشته است. این نتیجه بیانگر این مطلب است که علاوه بر کاربرد ترمیم‌کننده‌های مناسب استفاده درست از نوع بخیه زدن نیز در اجرای بهتر روند ترمیم و بهبود زخم‌ها موثر خواهد بود.

از سوی دیگر نتایج برخی تحقیقات نشان داده که به‌دنبال ایجاد زخم در بدن جانوران به‌ویژه در موش‌ها میزان MDA و LPO در بافت‌های پوست و خون دچار تغییرات مثبت شده و عدم کنترل میزان LPO در محل زخم‌ها به کاهش وسعت ترمیم زخم منجر خواهد شد. در همین رابطه نیز مشخص شده که کاربرد عصاره‌ی گیاهان دارویی نیز به‌طور معنی‌داری از مقدار MDA سروم خون موش‌ها کاسته و بدین‌ترتیب شرایط جهت افزایش سرعت ترمیم زخم‌ها فراهم خواهد گردید (۲۱).

در تحقیق حاضر نیز مشخص گردید که کاربرد عصاره کرم‌های خاکی به‌طور معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها به‌ویژه گروه شم و سپس گروه تیمار شده با فنی توپین، موجب کاهش میزان MDA سرم خون ماهیان با زخم بخیه‌دار شده است. از آنجایی‌که هیچ اطلاع دیگری از نتایج مشابه با این مبحث در مجلات و مجامع علمی مختلف در دسترس نمی‌باشد، چنین می‌توان تصور نمود که اجزا و یا کمپلکس‌های کوچکی از عصاره بدن کرم خاکی پس از ورود به محل زخم قدرت مهاجرت به‌جریان خون را کسب نموده و در آنجا در نهایت موجب افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانسی و غیرآنزیمی در سرم خون ماهیان با زخم بخیه‌دار شده که نتیجه آن مهار القا تولید LPO خواهد بود. به‌دنبال این اثر و مهار سنتز محصولات بینابینی و نهایی LPO در بافت‌های بدن، به‌ویژه بافت واجد زخم بخیه‌دار، امکان بروز آسیب‌های سلولی کاهش یافته و به این ترتیب عصاره بدن کرم خاکی توانسته در ترمیم سریع‌تر و کامل‌تر زخم‌ها به‌طور موثر وارد عمل گردد.

cutaneous lesions]. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran 2002; 57(1): 43-46. Persian.

12. Meizel S, Turner KO. Stimulation of an exocytotic event, the hamster acrosome reaction by cis-unsaturated fatty acid. FEBS Lett. 1983; 161(2): 315-318.

13. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. Fertil. Steril. 1999; 72(3): 484-495.

14. Rabbani M, Jafari A. Dose and time dependent effect of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. Toxicology 2000; 149(2-3): 101-108.

15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 1984; 219(1): 1-14.

16. Griveau JF, Le lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. Int. J. Androl. 1997; 20(2): 61-69.

17. Buege J.A, Aust S.D. Microsomal Lipid peroxidation In: Methods in enzymology (Colowick SP, Kalpan NO, (eds). Acad. Press; 1978; 52: 302-310.

18. Gilliland ER. Comparison of absorbable suture used in large mouth bass liver biopsy surgery. Pesp. Fish Culturist. 1994; 56: 60-61.

19. Grdisa M, Popovic M, Hrzenjak T. Glycolipoprotein extract G-90 from earthworm Eisenia foetida exerts some antioxidative activity. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2001; 128: 821-825.

20. Nematollahi A, Bigham AS, Karimi I, Abbasi F. Reactions of goldfish (*Carassius auratus*) to three suture patterns following full thickness skin incisions. Vet. Sci. 2010; 89(3): 451-454.

21. Rasal VP, Sinn AA, Ashok P, Yeshmatna S. Wound healing and antioxidant activities of *Morinda citrifolia* leaf extract in rat. Iranian J pharmacol. Therapeut. 2008; 7: 49-52.

22. Co kun S, Güleç EG, Balabanli B, Acartürk F. Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time-course study. Surg. Today 2007; 37(7): 570-574.

23. Altavilla D, Galeano M, Bitto A, Minutoli L, et al. Lipid peroxidation inhibition by raxofelast improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. Shock 2005; 24(1): 85-91.

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدت‌ها و پشتیبانی‌های به‌عمل آمده توسط مسئولین تحصیلات تکمیلی و امور پژوهشی دانشگاه شهردارکورد اعلام می‌نمایند.

منابع

1. Krafts KP. Tissue repair: the hidden drama. Organogenesis. 2010; 6(4): 225-233.

2. Probasco D, Noga EJ, Marcellin D, Khoo L. Dermal fibrosarcoma in a goldfish; case report. J. Small Exotic. Anim. Med. 1994; 2(4): 173-175.

3. Clark G. Oral obstruction in a goldfish. Vet. Record. 1988; 122(13): 311.

4. Lewbart GA, Spodnik G, Barlow N, Love NE, et al. Surgical removal of an undifferentiated abdominal sarcoma from a koi carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Record. 1998; 143: 556-558.

5. Hasanabadizadeh Z, Moradlou AMH, Rasoul G, Rostami HAK, et al. The effects of vitamins injection (A, C, A+C and AD3E) on wound healing process and some hematological response in common carp, *Cyprinus carpio*. J. Agri. Sci. Natural Reso. 2008; 15(6): 117-124.

6. Ramesh U, Maridass M. Wound healing effect of chitosan in fresh water fish *Cyprinus carpio* L. Int. J. Biol. Technol. 2010; 1(1): 99-102.

7. Nematollahi A, Bigham-Sadegh A, Karimi I, Abbasi F. Reactions of goldfish (*Carassius auratus*) to three suture patterns following full thickness skin incisions. Vet. Sci. 2010; 89: 451-454.

8. Harikrishnan R, Balasundaram C, Moon Y, Kim M, et al. Phytotherapy of ulcerative dermatitis induced by *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). Acata veterinaria 2010; 58(1): 29-37.

9. Hrzenjak M, Kobrehel DG, Levanat S, Jurin M, et al. Mitogenicity of the earthworm's *Eisenia foetida* insulin-like proteins. Comp. Biochem. Physiol. 1993; 104(4) B: 723-729.

10. Grdisa M, Popovic M, Hrzenjak T. Stimulation of growth factor synthesis in skin wounds using tissue extract (G-90) from the earthworm *Eisenia foetida*, Cell Biochem. Funct. 2004, 22(6): 373-378.

11. Shahsavani D, Movassaghi AR, Sahebi GH. [Comparative histological survey of the healing effects of two drugs vitamin A and phenytoin sodium ointment on the goldfish (*Carassius auratus*)

Comparative Effects of Earthworm Extract and Phenytoin Sodium on Suture Wound Healing in Goldfish (*Carassius auratus*)

Heydari S, M.Sc.¹, Arabi M, Ph.D.^{*1}, Nematollahi A, Ph.D.², Karimi I, Ph.D.², Bigham Sadegh A, Ph.D.²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord University, POB 115, Shahrekord, Iran

2. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, POB 115, Shahrekord, Iran

* Email corresponding author: mehranarabi@hotmail.com

Received: 28 Sep. 2013

Accepted: 30 Sep. 2014

Abstract

Aim: In this study, the extract of earthworm (*Eisenia foetida*) (in solvent: olive oil and vaselline) was applied as a novel healing stimulator on suture wound in goldfish (*Carassius auratus*).

Material and Methods: Groups were: negative control (Intact skin), positive control (suture wound with phenytoin), pseudo-control (sham: suture wound with solvent), and experimental (suture wound with 10 mg earthworm extract). A 2 cm longitudinal cut was made from head to tail, and then suture was applied followed by daily treatments. After 14 days, blood samples were collected. Macroscopic and microscopic observations were also done. Meanwhile, the content of lipid peroxidation (LPO/MDA) was measured in fish blood sera.

Results: surface and microscopic observations of wounds revealed a better result for earthworm extract treatment in suture wound healing when compared with phenytoin. MDA level in goldfish blood sera was lesser in earthworm extract-treated groups compared to other groups.

Conclusion: Earthworm extract is a new candidate in aquatic wound healing. Some factors of the extract may enter the blood and ultimately activate the antioxidant systems leading to decrease the content of LPO in fish blood sera.

Keywords: Healing of Suture wound, Goldfish, Earthworm body extract, Phenytoin, LPO