

## تأثیر موضعی یک ترکیب گیاهی بر فرآیند ترمیم زخم در موش‌های صحرایی نر دیابتی

زهرآ عباسی زاده<sup>\*</sup>، مهناز کسمتی<sup>۱</sup>، حمید گله داری<sup>۲</sup>، آناهیتا رضائی<sup>۳</sup>، سیدمنصور سیدنژاد<sup>۱</sup>

### چکیده

**مقدمه:** فرایند ترمیم زخم در بیماری دیابت دچار اختلال می‌گردد. جهت تسریع روند بهبود زخم تلاش‌های زیادی صورت گرفته است. از دیر باز اثر ترمیمی یک ترکیب گیاهی حاوی آلوئه‌ورا، مرمرکی، خون سیاوشان و حنا در ترمیم زخم مشاهده شده است، اما مستندات علمی کافی در زمینه چگونگی و سازوکار عمل چنین ترکیبی در زخم‌های دیابتی وجود ندارد و این در حالی است که اثرات هر یک از آن‌ها در مطالعات متعدد و مستقل بر انواع زخم‌ها مشاهده شده است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر موضعی ترکیب گیاهی فوق (که به اختصار هربالین نامیده شده است) بر روند ترمیم زخم در موش‌های صحرایی دیابتی می‌باشد.

**روش‌ها:** در این بررسی موش‌های صحرایی دیابتی در دو گروه اصلی کنترل (دریافت کننده وازلین به عنوان حامل) و تجربی (تیمار با مرهم گیاهی هربالین) قرار گرفتند. در کلیه گروه‌ها یک زخم مدور با قطر ۲ سانتی‌متر بر سطح پشتی موش‌های دیابتی ایجاد گردید. اندازه‌گیری سطح زخم و پارامترهای هیستوپاتولوژی از جمله تشکیل اپیتلیوم جدید، تشکیل بافت جوانه گوشتی و میانگین ضخامت اپیتلیوم در فواصل زمانی ۷، ۱۴، و ۲۱ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. کشیدگی اپیتلیوم در روز ۱۴ و طول زخم باقی‌مانده در فاز انتهایی ترمیم در روز ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در بررسی میکروسکوپی زخم‌های گروه دیابتی دریافت کننده ترکیب گیاهی هربالین در مقایسه با گروه کنترل ترمیم بیشتری داشتند و التیام زخم از روز ۱۴ به بعد تغییر چشم‌گیری داشته است ( $p < 0/05$ ). در بررسی میکروسکوپی شاخص تشکیل اپیتلیوم جدید، تشکیل بافت جوانه‌ای و ضخامت لایه اپیتلیوم در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان دادند. طول زخم باقیمانده در گروه تیمار در روز ۲۱ کاهش معنی‌دار داشته است ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج، ترکیب گیاهی فوق، احتمالاً با تسریع روند تشکیل اپیتلیوم و بافت جوانه‌ای و افزایش ضخامت اپیتلیوم نقش مؤثری بر روند ترمیم زخم‌های دیابتی دارد و مدت زمان لازم برای بهبودی زخم را کاهش می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** ترکیب گیاهی هربالین، ترمیم زخم، رت‌های دیابتی

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نشان: Email: Zahra.abbasizadeh@gmail.com شماره تماس: ۰۶۱۱۳۷۵۷۰۳۴ و ۰۹۱۶۶۴۰۹۰۳۹

## مقدمه

بیماری دیابت یک اختلال متابولیکی است که با هیپرگلیسمی خود را نشان می‌دهد [۱]. مشکلات دیابت منجر به خطرات جدی برای سلامت عمومی فرد می‌شود که یکی از این مشکلات اختلال در روند ترمیم زخم در افراد دیابتی می‌باشد [۲]. رابطه پاتوفیزیولوژیکی دیابت و ترمیم زخم پیچیده است. عوامل عروقی یا نورویاتی، عملکرد ایمنی و بیوشیمی همگی در ترمیم بافت مداخله دارند [۱]. ترمیم زخم پوستی رویداد فعالی است که شامل همکاری سلول‌های مختلف از جمله فیبروبلاست‌ها، لکوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های اپیدرمال می‌باشد [۳].

در مدل کلاسیک ترمیم زخم چهار فاز همپوشان هموستازی، التهاب، تکثیر و شکل‌گیری مجدد بافت زخم توصیف شده است [۴]. مرحله هموستازی شامل تجمع پلاکت‌ها و فعال شدن فرایند آبشاری انعقاد خون می‌باشد. تعداد زیادی از فاکتورهای رشد از پلاکت‌ها آزاد شده و از طریق فرآیند کموتاکسی باعث جذب نوتروفیل‌ها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال و کراتینوسیت‌ها به داخل زخم می‌شوند [۵، ۶]. مرحله التهاب شامل تغییر فعالیت نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و ماست سل‌هاست [۱] که منجر به مهاجرت نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به بافت می‌گردد. نوتروفیل‌ها، اولین سلول‌هایی هستند که ظاهر شده و باعث تمیز شدن زخم از آلودگی باکتریایی و بافت مرده اضافی موجود می‌شوند. حدود ۴۸ ساعت بعد از آسیب بافتی ماکروفاژهای بافتی می‌رسند و سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد را تولید می‌کنند [۵، ۶]. مرحله تکثیر شامل تولید کلاژن، پروتئوگلیکان و فیبرونکتین برای تشکیل ماتریکس خارج سلولی، تشکیل اپیتلیوم جدید و رگزایی است. فیبروبلاست‌ها که ماتریکس و کلاژن تولید می‌کنند سلول‌های غالب در این مرحله هستند. مرحله شکل‌گیری مجدد شامل سنتز، تجزیه و سازمان‌دهی مجدد کلاژن به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک تولید شده بوسیله فیبروبلاست‌ها، نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها صورت می‌گیرد [۶].

طب نوین و طب سنتی، هر دو در زمینه زخم دارای چالش و کمبودهایی می‌باشند. تحقیقات بر روی عوامل مؤثر بر روند ترمیم زخم یکی از زمینه‌های پیشرفته پزشکی می‌باشد. استفاده

از گیاهان و فرآورده‌های گیاهی جهت درمان زخم در بسیاری از کشورها سابقه دیرینه دارد [۱].

آلوئه‌ورا<sup>۱</sup> (Aloe barbaderies Miller یا *Aloe vera* linn. Burm.f) خانواده *Liliaceae* بومی آفریقای شمالی است و در ترکیه نیز کشت می‌شود [۷-۹]. آلوئه‌ورا در سراسر جهان برای اهداف پزشکی متنوعی به کار می‌رود و نشان داده شده که دارای خواص آنتی‌دیابتی و هیپوگلیسمی است، که به دلیل تحریک سنتز و یارهایی انسولین از سلول‌های - لانگرهانس پانکراس توسط آلوئه‌ورا می‌باشد [۷]. در یک مطالعه نشان داده شده که به کار بردن موضعی و دهانی آلوئه‌ورا در زخم‌های پوستی باعث افزایش حجم کلاژن در جوانه گوشتی می‌شود. این افزایش به این دلیل است که آلوئه‌ورا باعث تحریک سنتز کلاژن یا افزایش تکثیر فیبروبلاست‌ها که کلاژن را سنتز می‌کنند و یا هر دو می‌شود [۸].

مرمکی<sup>۲</sup> صمغی است از درخت *Commiphora molmo* از خانواده *Burseraceae* که بومی سومالی، شبه جزیره عربستان و اتیوپی است و در طب سنتی از این گیاه استفاده‌های زیادی می‌شود و دارای خواص ضد التهابی و فعالیت ترمیم دهنده زخم می‌باشد [۱۰]. روغن درخت مرمکی دارای اثرات ضدالتهابی و ضد میکروبی است و به منظور کنترل عفونت به کار می‌رود [۱۱]. در یک مطالعه اثر عصاره یک ترکیب از پنج گیاه بر روی سطوح پایین یافته گلوکز خون در رت‌های دیابتی بررسی شده و ملاحظه گردید که تنها عصاره‌های مرمکی و *Aleo gums* به‌طور مؤثری تحمل به گلوکز را در رت‌های سالم و دیابتی افزایش می‌دهند [۱۰].

خون سیاوشان<sup>۳</sup> (*Dracaena Cinnabari*) که به هندی هیرادوخی و به فرانسوی *Dragonier* گفته می‌شود، درختی است از خانواده *Liliaceae* که از ساقه‌های آن رزین گرفته می‌شود. این درخت بومی مناطق حاره شرق آفریقا هند و جنوب عربستان است [۱۲]. خون سیاوشان در طب سنتی استفاده زیادی دارد، چندین استفاده درمانی آن ضد میکروبی، ضد ویروسی، ترمیم زخم، آنتی تومور، ضد التهاب، آنتی اکسیدان می‌باشد [۱۳].

<sup>1</sup> Aloe vera

<sup>2</sup> Myrrh

<sup>3</sup> Dragon's blood

دانشگاه جندی شاپور اهواز به صورت تصادفی انتخاب شدند. حیوانات در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد، در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات به آب کافی و غذای فشرده خریداری شده از انستیتو پاستور تهران دسترسی داشتند.

### جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های گیاهی و نحوه تهیه مرهم گیاهی

گیاه آلونهورا از استان خوزستان، خون‌سیاوشان از استان لرستان، مرمکی از مکه در عربستان و حنا از کرمان جمع‌آوری و سپس توسط گیاه‌شناس هرباریوم گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران شناسایی و به آزمایشگاه منتقل شد. برگ گیاه آلونهورا، صمغ ساقه‌های درخت دراسیانا، صمغ گیاه مرمکی و برگ گیاه حنا به صورت جداگانه شسته و خشک کرده و با آسیاب برقی به صورت پودر درآمد و پس از الک کردن ۵۰ گرم از هر کدام به نسبت بهینه ۱:۱:۱ در پایه وازلین و گوگرد مخلوط گردیده و در این مطالعه با نام ترکیب گیاهی هربالین مورد استفاده قرار گرفت.

### روش القاء دیابت تجربی

۱۲ ساعت پس از برداشتن غذای حیوانات و شرایط ناشتایی، به نسبت وزن بدن حیوان، پودر استرپتوزوسین (STZ) در بافر سیترات سدیم استریل (۰/۱ مولار با  $\text{PH} = 4/5$ ) حل شد. محلول STZ تهیه شده با دوز ۵۵ mg/kg به صورت تک دوز درون صفاقی تزریق شد [۲، ۱۶، ۲۴]. بعد از ۷۲ ساعت خون‌گیری از ورید دمی انجام و قند خون توسط گلوکومتر ساخت آلمان اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که قند خونشان بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود و علائم دیابت از جمله کاهش وزن شدید، پر نوشی، پر ادراری و بی‌حالی را داشتند، به‌عنوان بیمار دیابتی انتخاب شدند [۲، ۱۶، ۲۴]. لازم به ذکر است علائم فوق که از شاخص‌های بیماری دیابت می‌باشند، در طول تیمار مورد توجه و ارزیابی قرار گرفتند.

(*Lawsonia inermis* (Linn.) که به‌طور عمومی حنا نامیده می‌شود به‌عنوان یک داروی سنتی شناخته شده است و حاوی ترکیبات مختلفی مانند فلاونوئیدها، کومارین‌ها، تری‌ترپنوئیدها، استروئیدها و گزانتون‌ها می‌باشد. چندین گزارش نشان داده که حنا دارای خواصی مثل کاهش دهنده قند خون ضد میکروبی، ضد باکتری، ترمیم دهنده زخم، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و ضد درد می‌باشد [۱۳].

با توجه به پتانسیل‌های وسیعی که گیاهان مذکور دارند، به‌نظر می‌رسد تهیه مرهم گیاهی که ترکیبی از گیاهان دارویی آلونهورا، مرمکی، خون‌سیاوشان و حنا می‌باشد، می‌تواند در ترمیم زخم‌ها به‌ویژه زخم‌هایی که در هنگام بیماری دیابت به‌وجود می‌آیند، مفید واقع شود. در این راستا جهت تهیه مرهم گیاهی از پودر آسیاب شده گیاهان مذکور در پایه وازلین و گوگرد استفاده شد. گوگرد نیز عنصری است که کاربرد درمانی و خاصیت بهبود دهنده آن بر انواع بیماری‌های پوستی و غیره مانند بثورات جلدی، تورم‌های پوستی شناخته شده می‌باشد. باید متذکر شد به‌طور سنتی از این مرهم گیاهی که در این تحقیق نام آن به اختصار هربالین<sup>۱</sup> گذاشته شده است برای مدت طولانی جهت درمان زخم‌های دیابتی استفاده شده، اما هیچ مدرک و سند علمی که بتواند سازوکار عمل آن را نشان دهد یافت نشده است. اگر چه برای هر کدام از گیاهان فوق به‌طور مستقل شواهدی دال بر اثرات نسبی و مفید آن‌ها بر انواع زخم‌ها وجود دارد.

در تحقیق حاضر سعی شده است که با بهینه کردن روش کاربرد مرهم گیاهی هربالین بر روی ترمیم زخم‌های پوستی موش صحرایی دیابتی، اثر آن از زوایای گوناگون به‌صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی (هیستوپاتولوژیک) بر فرآیند ترمیم زخم بررسی گردد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند بخشی از زوایای تاریک سازوکار اثر این ترکیب گیاهی را روشن نموده و دست‌یابی به بهبودی سریع‌تر زخم‌ها به‌ویژه زخم‌های دیابتی را محتمل‌تر سازد.

### روش‌ها

در این مطالعه، ۶۰ عدد موش صحرایی نر نژاد ویستار دارای وزن  $20 \pm 250$  گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی

<sup>1</sup>Herbalin

در مشاهدات میکروسکوپی مقاطع بافتی، پس از بررسی آسیب شناسی شاخص‌های مختلفی به صورت کمی و نیمه کمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور ارزیابی نیمه کمی تشکیل اپیتلیوم جدید، لبه‌های زخم مورد بررسی قرار گرفت و از لنز ۴ استفاده گردید. در مواردی که هیچ گونه آثاری از ضخیم شدن لبه‌های زخم و تکثیر سلول‌های خاردار مشاهده نشد، عدد صفر؛ در مواردی که سلول‌های خاردارا تکثیر یافته و بافت پوششی در لبه‌های زخم برجسته گردید، عدد ۱؛ در صورت مهاجرت سلول‌های خاردار بر روی زخم عدد ۲؛ همچنین پل زدن کامل سلول‌های خاردار بر روی زخم عدد ۳ و در نهایت مشاهده کراتین بر روی زخم عدد ۴ در نظر گرفته شد [۱۶]. به منظور بررسی میزان بافت جوانه‌ای پنج میدان میکروسکوپی با لنز ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند. در صورتی که ۷۰ درصد بافت موجود در قسمت زخم در فاز انتهایی قرار داشتند، عدد صفر؛ در مواردی که بیش از ۶۰ درصد بافت زخم در فرآیند انتهایی به همراه تشکیل بافت جوانه‌ای نازک مشاهده شد، عدد ۱؛ زمانی که بیش از ۴۰ درصد بافت زخم، بافت جوانه‌ای بود، عدد ۲؛ همچنین بافت جوانه‌ای ضخیم به همراه تشکیل رشته‌های کلاژن و عروق عمود بر رشته‌های کلاژن در ۶۰ درصد بافت، عدد ۳ و در نهایت وجود ساختار طبیعی در بیش از ۸۰ درصد زخم عدد ۴ در نظر گرفته شد [۱۶]. ضخامت اپیتلیوم جدید تشکیل شده نیز در لبه‌های زخم در پنج قسمت متفاوت از اپیتلیوم با لنز ۱۰ اندازه‌گیری و سپس میانگین گرفته شد. میزان مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت بر روی سطح زخم در روز ۱۴ با لنز ۱۰ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. طول زخم باقیمانده توسط لنز ۴ در روز ۲۱ اندازه‌گیری شد. جهت بررسی هر کدام از شاخص‌های فوق ابتدا تصاویر میکروسکوپی یک توسط دوربین اخذ شده و سپس توسط نرم‌افزار AxioVision مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

### تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های کمی به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون T برای مقایسه بین دو زیر گروه مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های نیمه کمی نیز توسط تست کروسکال والیس مورد آنالیز قرار گرفتند. یافته‌ها به صورت

### روش ایجاد زخم

به منظور ایجاد زخم پس از بیهوش کردن حیوان با داروی کتامین و زایلازین، موهای ناحیه پشت تراشیده و ضد عفونی شد، سپس با استفاده از نشانگر و خط کش شابلون، دایره‌ای به قطر تقریبی ۲ سانتی‌متر بر پشت حیوان ترسیم و با استفاده از تیغ بیستوری پوست آن ناحیه به طور کامل برداشته شد، به طوری که عمق زخم شامل درم و اپیدرم بود [۱۶].

### روش تیمار

گروه‌های کنترل با پماد وازلین و گروه تیمار با مرهم گیاهی هربالین روزانه ۲ بار در ساعات مشخصی (هر ۱۲ ساعت) به صورت موضعی برای بررسی در مدت زمان معین ۷ و ۱۴ و ۲۱ روز تیمار شدند.

### روش سنجش بهبودی زخم

برای بررسی ماکروسکوپی سطح زخم‌ها در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ اندازه‌گیری شدند [۱۶]. به این ترتیب که پس از بیهوشی ضعیف حیوان، با استفاده از دوربین دیجیتال که در فاصله مشخصی از زخم تعبیه شده بود، از زخم عکس برداری شد. به طوری که برای همه موش‌ها و همه عکس‌ها شرایط یکسانی از عکس برداری برقرار شد. محاسبه سطح زخم توسط نرم افزار Scion Image انجام شد. درصد بهبودی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۶].

$$\text{درصد سطح زخم در روز } X = \frac{100 \times \text{سطح زخم در روز } X}{\text{سطح زخم در روز صفر}}$$

درصد سطح زخم در روز  $X = 100 - X$  = درصد بهبودی روز

### نمونه برداری، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی اختصاصی

پس از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از زمان شروع تیمار، رت‌های گروه کنترل و تیمار با اتر بیهوش شده و بیوپسی گردیدند. در طی کار با حیوانات مورد آزمایش کلیه اصول اخلاقی رعایت گردید. نمونه‌های بافتی تهیه شده، به مدت ۴۸ ساعت در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت و پس از انجام پاساژ بافتی در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس از قالب‌ها توسط میکروتوم روتاری برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید و مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) قرار گرفتند [۱۶، ۱۷].

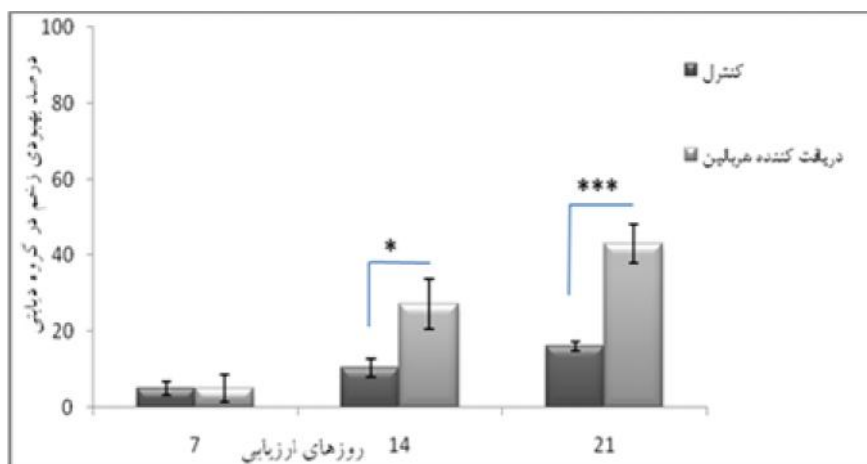
میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SEM) بوده و با در نظر گرفتن  $p < 0.05$  معنی داری گزارش شد.

### نتایج

نتایج به دست آمده از این تحقیق در دو بخش یافته‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی تنظیم شده است.

### نتایج ماکروسکوپی

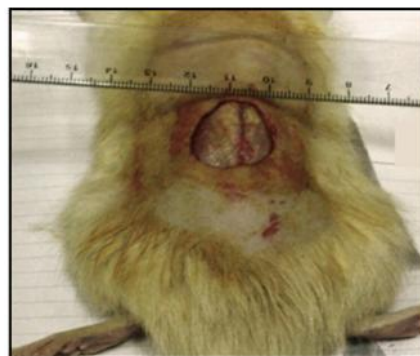
بررسی یافته‌های ماکروسکوپی به دست آمده از مقایسه درصد بهبودی زخم در رت‌های نر دیابتی دریافت کننده هربالین نسبت به گروه کنترل در روز ۱۴ و ۲۱ به ترتیب با  $p < 0.05$  و  $P < 0.001$  افزایش معنی داری نشان داد (نمودار ۱) (شکل ۱ و ۲)



نمودار ۱- مقایسه درصد بهبودی زخم در زیر گروه کنترل و دریافت کننده مرهم گیاهی در موش‌های صحرایی دیابتی گروه دریافت کننده هربالین نسبت به گروه کنترل در روزهای ۱۴ و ۲۱ به صورت معنی دار درصد بهبودی بیشتری داشته است ( $P < 0.05$  و  $p < 0.001$ \*\*\*).



شکل ۲- روز ۱۴ (بهبود زخم).



شکل ۱- روز صفر (بلافاصله بعد از ایجاد زخم).

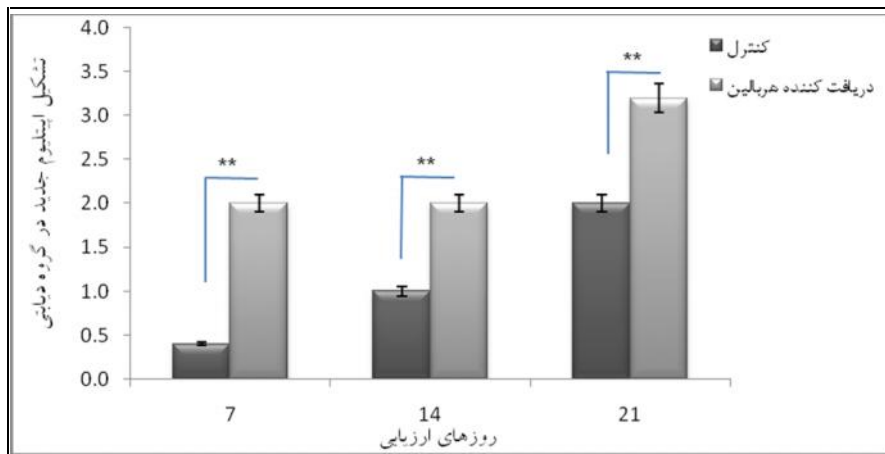
آماري تشکیل اپیتلیوم جدید در گروه دریافت کننده مرهم گیاهی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی دار ( $p < 0.01$ ) مشاهده شد (نمودار ۲).

همچنین ضخامت لایه اپیتلیوم در گروه دریافت کننده هربالین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری ( $p < 0.01$ ) مشاهده گردید (نمودار ۳). بافت جوانه‌ای در محل زخم که

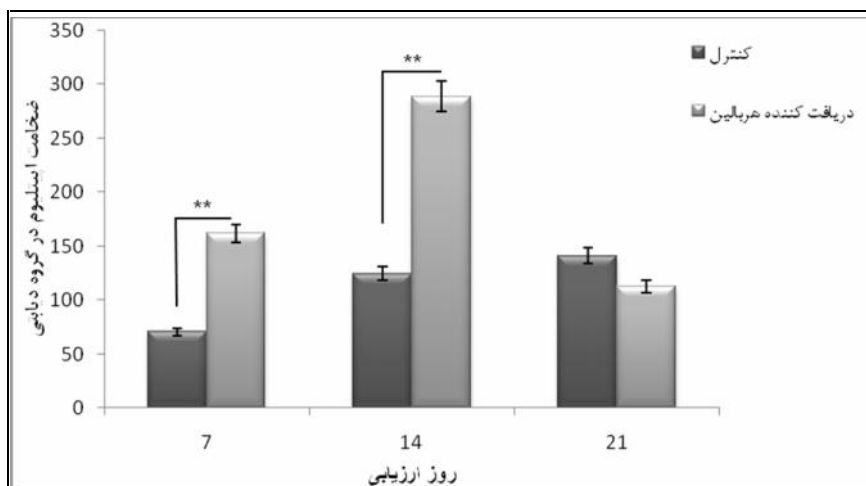
### نتایج میکروسکوپی

در بررسی میکروسکوپی پوست گروه دریافت کننده هربالین در روز ۷، سلول‌های کراتینوسیت تکثیر بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند و لبه‌های زخم ضخامت بیشتری داشته و تعداد کراتینوسیت بیشتری بر روی سطح زخم مهاجرت نمودند. به طوری که در آنالیز

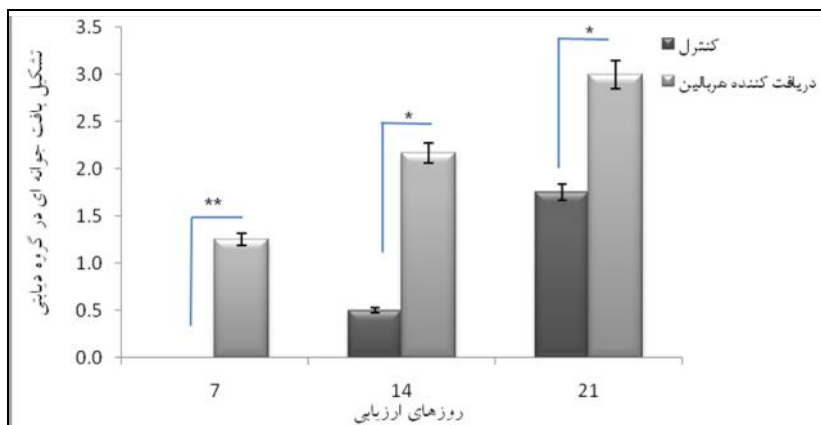
از فیبروبلاست‌های تکثیر یافته همراه با عروق خونی گیاهی و کنترل اختلاف معنی داری ( $p < 0.01$ ) را نشان داد تشکیل شده نیز در بین گروه‌های دریافت کننده مرهم (نمودار ۴) (شکل ۳).



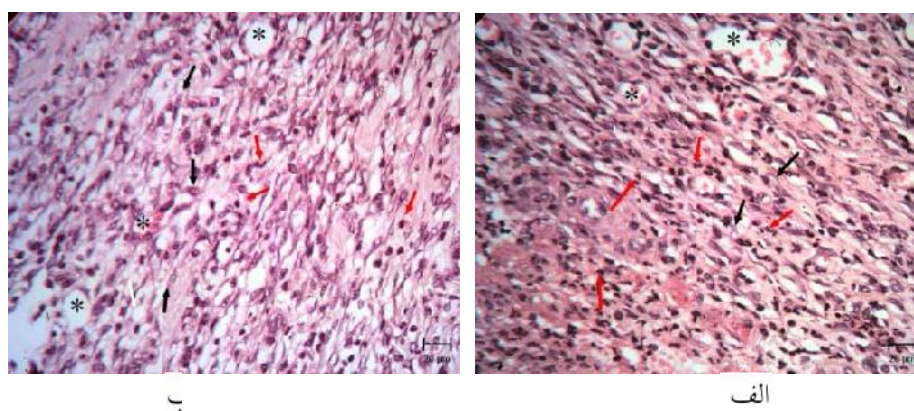
نمودار ۲- مقایسه تشکیل اپیتلیوم جدید در گروه‌های کنترل و دریافت کننده هربالین در موش‌های دیابتی گروه دریافت کننده هربالین نسبت به گروه کنترل در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ اختلاف معنی دار داشته است ( $P < 0.01$ ).



نمودار ۳- مقایسه ضخامت اپیتلیوم در گروه کنترل و دریافت کننده هربالین در موش‌های دیابتی گروه دریافت کننده هربالین نسبت به گروه کنترل در روزهای ۷ و ۱۴ اختلاف معنی دار داشته است ( $P < 0.01$  و  $P < 0.01$ ).



نمودار ۴- مقایسه تشکیل بافت جواره ای در گروه کنترل و دریافت کننده هربالین در موش های دیابتی. گروه دریافت کننده هربالین نسبت به گروه کنترل در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ اختلاف معنی دار داشته است ( $P < 0.01$ \*\*)،  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.05$  \*).

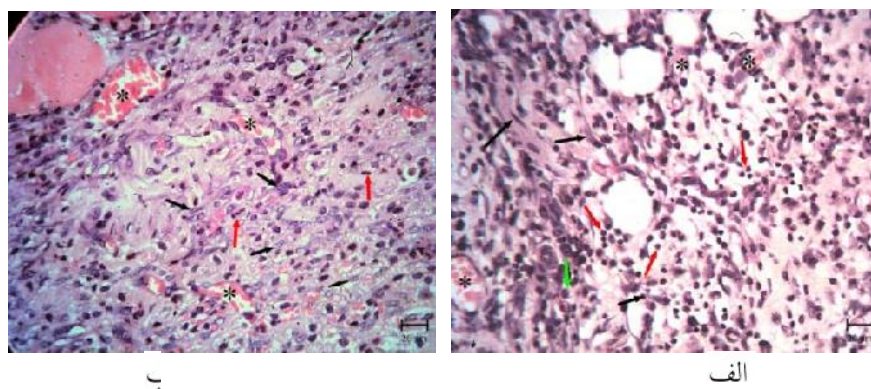


شکل ۳- مقطع عرضی پوست موش، بافت جواره ای در روز هفتم پس از ایجاد زخم (رنگ آمیزی H&E)

الف) گروه کنترل. ب) گروه تیمار با هربالین. به تعداد زیاد نوتروفیل ها (پیکان قرمز) در تصویر الف و تعداد بیشتر فیبروبلاست ها (پیکان سیاه) در تصویر ب و عروق خونی (ستاره) توجه شود

عروق بیشتری برخوردار بود. در آنالیز آماری نیز اختلاف معنی داری در بین دو گروه مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۴) (شکل ۴).

در روز ۱۴ زخم ها وارد فاز تکثیری شده و درصد زیادی از محل زخم توسط بافت جواره گوشتی پر شده بود. این بافت در موش های گروه تیمار با مرهم از فیبروبلاست و



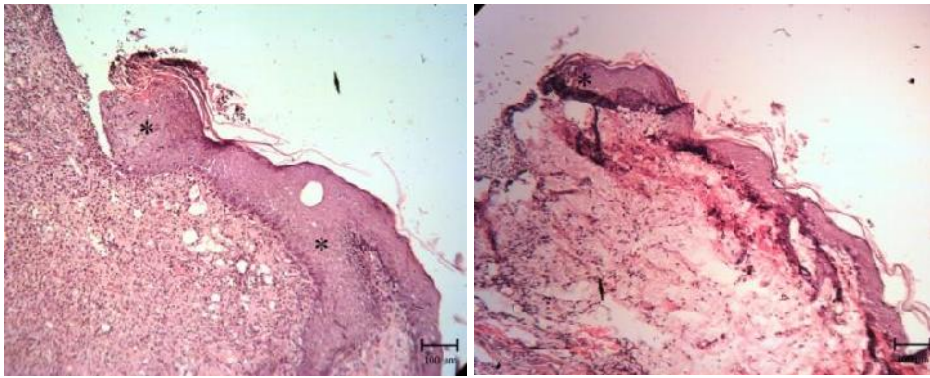
شکل ۴- مقطع عرضی پوست موش، بافت جواره ای در روز چهاردهم پس از ایجاد زخم (رنگ آمیزی H&E).

الف) گروه کنترل. ب) گروه تیمار با هربالین. به تعداد زیاد نوتروفیل ها (پیکان قرمز) در تصویر الف و تعداد بیشتر فیبروبلاست ها (پیکان سیاه) در تصویر ب و عروق خونی (ستاره) توجه شود.



دیده شد. گروه تیمار با هربالین، اپیتلیوم جدید میزان زیادتری از سطح زخم را پوشانده، به طوری که در مقایسه با گروه کنترل این اختلاف معنی‌دار بوده است ( $p < 0/01$ ) (نمودار ۲). ضخامت اپیتلیوم در روز ۲۱ در گروه تیمار با هربالین کمتر از گروه کنترل بود اما در آنالیز آماری معنی‌دار نشد (نمودار ۳). در بررسی طول زخم باقیمانده در گروه تیمار با مرهم گیاهی در روز ۲۱ کاهش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) مشاهده شد (نمودار ۶).

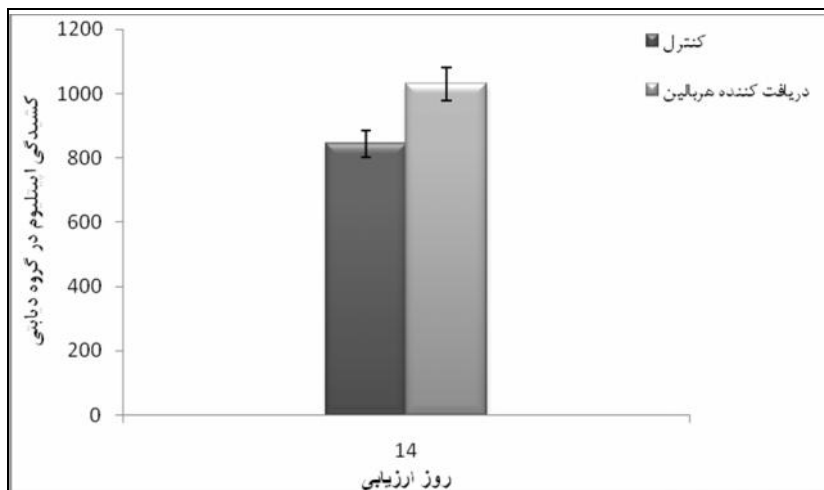
تشکیل اپیتلیوم جدید و افزایش ضخامت در روز ۱۴ در دو گروه کنترل و تیمار با مرهم اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ( $p < 0/01$ ) (نمودارهای ۳ و ۲) (شکل ۵). مهاجرت کراتینوسیت‌ها بر روی سطح زخم در روز ۱۴ در گروه تیمار با مرهم گیاهی نسبت به گروه کنترل گرچه افزایش یافته ولی اختلاف آن معنی‌دار نبود (نمودار ۵). بررسی میکروسکوپی زخم پوستی موش‌های صحرایی در روز ۲۱ مبین پیشرفت ترمیم بود. در بافت جوانه گوشتی بالغ، رشته‌های کلاژن فراوان همراه با تعداد کم فیروبلاست



ب

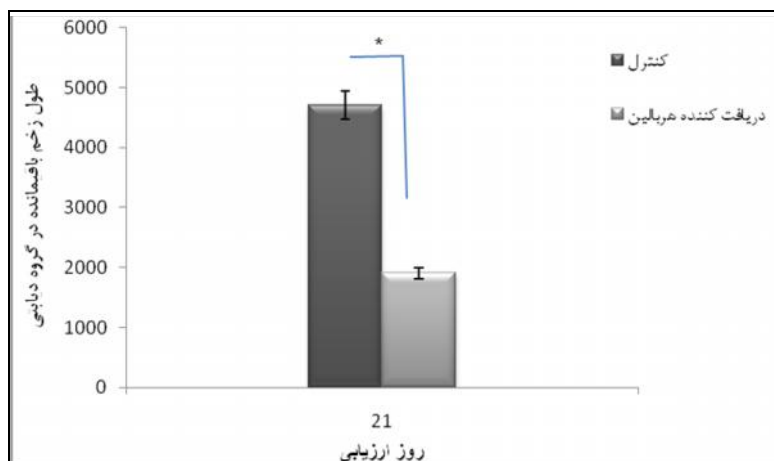
الف

شکل ۵- مقطع عرضی پوست موش، بافت جوانه‌ای در روز چهاردهم پس از ایجاد زخم (رنگ آمیزی H&E). الف) گروه کنترل. ب) گروه تیمار با هربالین. به افزایش ضخامت اپیتلیوم (ستاره) در تصویر ب در مقایسه با تصویر الف توجه شود.



نمودار ۵- مقایسه کسب‌دگی اپیتلیوم (میزان مهاجرت کراتینوسیت‌ها) در گروه کنترل و دریافت کننده هربالین در موش‌های دیابتی در روز ۱۴، بین دو گروه اختلاف معنی‌دار وجود نداشته است.





نمودار ۶- مقایسه طول زخم باقیمانده در گروه کنترل و دریافت کننده هربالین در موش‌های دیابتی در روز ۲۱، دو گروه اختلاف معنی‌دار داشته است ( $p < 0.05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون تلاش‌های بسیاری در راستای درمان زخم‌های دیابتی و شایع‌ترین نوع آن یعنی زخم پای دیابتی انجام شده است. در راستای چنین هدفی، پژوهش حاضر چگونگی اثربخشی مرهم گیاهی هربالین را بر روند بهبود زخم در موش‌های نر دیابتی بررسی نمود.

میزان کوچک شدن یک زخم معیار خوبی برای ارزیابی میزان بهبودی زخم است. سطح زخم هم‌زمان با التیام مساحت زخم کاهش می‌یابد. علت این کاهش وجود پدیده جمع شدن زخم و رسوب بافت پیوندی است. پدیده انقباض به سبب وجود برخی از سلول‌ها است که فیبروبلاست نام دارند و به واسطه خاصیت انقباضی خود لایه اپیدرم را کشیده و موجب کاهش ابعاد زخم می‌شوند [۱۸].

یافته‌های ماکروسکوپی در پژوهش کنونی نشان داده است که استفاده موضعی از این مرهم گیاهی در رت‌های دیابتی باعث تسریع در ترمیم زخم و افزایش جمع شدگی بر ترمیم زخم‌های عمیق پوستی در رت‌های دیابتی می‌شود. این یافته‌ها با پژوهش‌های Asheesh Gupta و همکاران در سال ۲۰۰۸ که از یک ترکیب گیاهی (PHF) که ترکیب غالب آن آلوئه‌ورا بوده با اثرات سودمند ترمیمی آن، مطابقت دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که درمان با این ترکیب گیاهی منجر به بهبود اندازه زخم در رت‌های دیابتی می‌شود. افزایش سرعت انقباض و بسته شدن سریع زخم

در زخم‌های درمان شده با PHF ممکن است مربوط به افزایش تکثیر کراتینوسیت‌ها و مهاجرت آن‌ها به سطح زخم شود [۱۹]. همچنین نتایج حاصل از مطالعه Yadav و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که در روز شانزدهم در رت‌های درمان شده با ژل ۵۰ درصد آلوئه‌ورا و ۹۶/۴ درصد آلوئه‌ورا زخم به‌طور کامل بسته می‌شود که این نتایج نشان می‌دهد که به‌طور واضح ژل آلوئه‌ورا در انقباض و جمع شدگی زخم به اندازه زیادی تأثیر دارد [۲۰].

Davis و همکاران گزارش کردند که ترکیب اساسی در آلوئه‌ورا گلوکز ۶- فسفات و منوز ۶- فسفات دو ترکیب ساختاری مهم‌اند که ترمیم زخم را پیش می‌برند و دارای فعالیت ضد التهابی هستند [۲۱]. همچنین اثر آلوئه‌ورا بر جمع شدگی و محصور شدن زخم به دلیل حضور ترکیبات فعال در آلوئه‌ورا و همچنین موادی مثل آنزیم‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، فاکتورهای رشد، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد [۲۱].

در مطالعه Sakarkar و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان شد که رت‌های درمان شده با عصاره الکلی حنا، ۷۱ درصد در مساحت زخم در مقایسه با گره کنترل که ۵۸ درصد بود، کاهش نشان دادند. این مطالعه نشان داد که عصاره برگ‌های حنا قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌هایی است که در عفونت زخم درگیر می‌باشند [۲۲].

زخم در این رت‌ها مربوط به افزایش تکثیر کراتینوسیت‌ها و مهاجرت آن‌ها به سطح زخم می‌باشد [۱۹].

مدارک موجود ثابت می‌کند که آلوئه ورا در اشکال مختلف ممکن است در کوتاه کردن زمان ترمیم زخم مؤثر باشد.

همچنین منجر به افزایش سرعت ترمیم و تشکیل اپیتلیوم می‌شود [۹].

این اثرات ممکن است از طریق چندین سازوکار شامل افزایش سنتز کلاژن و سرعت تشکیل

اپیتلیوم به وسیله اثر منور ۶ فسفات برای تحریک فیروبلاست‌ها و اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد

قارچی آلوئه‌ورا باشد [۹].

حنا نیز دارای ترکیبات مختلفی مانند فلاونوئیدها،

کومارین‌ها، تری ترپنوئیدها، استروئیدها و گزانتون‌ها است

که فعالیت ترمیم دهنده‌گی عصاره حنا می‌تواند ناشی از ترکیبات فلاونوئیدی آن باشد [۲۲].

Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که

فلاونوئیدها و تری ترپنوئیدها انقباض زخم و اپی

تلیزاسیون را افزایش می‌دهند [۲۳].

باتوجه به اینکه حنا در تحقیق حاضر نیز دارای این ترکیبات می‌باشد، مشاهده

نتایج تحقیق حاضر در زمینه اپیتلیوم جدید، هم راستا با یافته‌های فوق احتمالاً ناشی از حضور فلاونوئیدها یا تری

ترپنوئیدهاست [۲۳].

همچنین آنالیزهای فیتوشیمیایی نشان داد که حضور

آنتراکونین‌ها<sup>۵</sup> که به‌عنوان جزء اصلی برگ‌های این گیاه است، به‌طور عمومی دارای فعالیت آنتی میکروبی می‌باشد

[۱۴]. روغن درخت مرمکی دارای اثرات ضد التهابی و ضد میکروبی می‌باشد و به‌منظور کنترل عفونت به‌کار می‌رود.

این روغن باعث درمان زخم‌های پوستی و آثار به جا مانده زخم و آکنه می‌شود [۱۱].

رنجبر و همکاران در سال ۱۳۹۱ با مطالعه‌ای که بر روی زخم‌های رت‌های دیابتی انجام دادند، نشان دادند که

افزایش ضخامت لایه اپیدرم و افزایش مسافت طی شده توسط سلول‌های مهاجر اپیدرمی صورت می‌گیرد [۲۴].

آن‌جا که در مطالعه حاضر ضخامت اپیتلیوم در گروه تیمار با مرهم گیاهی هربالین در روز ۱۴ به‌طور کامل، سراسر زخم را پوشانده و بیشترین ضخامت را داشت. بنابراین

همچنین در مطالعه Alzahrani و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که تأثیر یک کمپلکس گیاهی شامل عسل، مرمکی و *Nigella Sativa* بر روی باکتری‌های زخم دیابتی مؤثر است [۱۱].

در مطالعه Kylenorton و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد التهابی و ترمیم دهنده‌گی مرمکی مورد بررسی قرار

گرفت و ملاحظه شد که درمان با مرمکی منجر به القا

افزایش سطوح WBC در طول دوره ترمیم پس از جراحی می‌شود، که به احتمال زیاد به‌دلیل این است که مرمکی

حاوی ترکیباتی است که می‌تواند یک پاسخ ایمنی را القا کند. مرمکی همچنین به حفظ سطح مرتفع شده WBC در

طول دوره ترمیم زخم کمک می‌کند و این اشاره بر این دارد

که مرمکی قادر به القا بلوغ، تمایز و فعالیت هر دو نوع سلول‌های لمفوئید و میلوئید در طول مراحل مؤثر پاسخ‌های

ایمنی درگیر در فرآیند ترمیم زخم می‌شود [۱۰].

Gupta و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که خون سیاوشان برای التیام زخم و بند آوردن خونریزی به‌کار

می‌رود. پاشیدن پودر آن بر روی زخم برای قطع خونریزی و چسباندن و به هم آوردن زخم تازه مفید است [۱۲].

یافته‌های حاصل از ارزیابی نیمه کمی شاخص‌های هیستوپاتولوژی در این تحقیق بیان‌گر افزایش فاکتور

تشکیل اپتلیوم جدید، بافت جوانه‌ای، میزان کشیدگی اپیتلیوم و کاهش گپ اپیتلیوم باقیمانده می‌باشد که با یافته

Yadav و همکاران هم‌خوانی دارد. در این تحقیق بیان شد

که دوره تشکیل اپیتلیوم جدید در رت‌های درمان شده با ژل آلوئه‌ورا کوتاه‌تر بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که

آلوئه‌ورا یک اثر غالبی بر روی سرعت جمع شدگی زخم دارد. همچنین مشخص شد که ژل برگ‌های آلوئه‌ورا

سازوکار ترمیم زخم را به‌دلیل داشتن خواص ضد میکروبی پیش می‌برد، که این باعث جمع شدگی زخم و افزایش

سرعت تشکیل اپیتلیوم می‌شود [۲۰].

در تحقیقات Gupta و همکاران بیان شد که استفاده از ترکیب گیاهی PHF منجر به تکثیر فیروبلاست‌ها و تشکیل

جدید اپیتلیوم در رت‌های درمان شده نرمال و دیابتی با PHF می‌شود. تشکیل سریع اپیتلیوم جدید و بسته شدن

طرح‌های آینده ضروری به‌نظر می‌رسد. در این صورت جهت استفاده‌های فارماکولوژیک و پزشکی اطلاعات دقیق‌تری به‌دست می‌آید.

با توجه به محدودیت‌های این تحقیق که در خصوص شیوه سخت‌نگهداری حیوانات دیابتی در شرایط بهداشتی مناسب و تیمار دقیق آنها در محل زخم‌هایی با التهاب بالا و بدون کاربرد داروهای ضد عفونی، در مجموع به‌نظر می‌رسد که ترکیب گیاهی هربالین احتمالاً به‌دلیل دارا بودن ترکیبات ضدالتهابی، ضد میکروبی و ترکیباتی با اثرات ترمیم‌دهندگی و بازسازی زخم‌های دیابتی از طریق کاهش التهاب و تکثیر سلولی بر ترمیم زخم‌های دیابتی دخالت دارد.

### سپاسگزاری

این تحقیق با همکاری و حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (گزارش سال ۹۲) انجام گرفته است. ضمن سپاس و قدردانی از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه، از همه افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری فرمودند نهایت سپاس را داریم.

نتایج تحقیق حاضر هم‌راستا با یافته‌های متعدد، تاثیر این ترکیب گیاهی را بر ازدیاد سرعت مهاجرت و تکثیر لایه‌های اپیدرمی به نمایش می‌گذارد که در نهایت منجر به تسریع بسته شدن زخم در گروه‌های تیمار دیابتی می‌شود. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که استعمال موضعی این ترکیب گیاهی از لحاظ ماکروسکوپیک موجب افزایش معنی‌دار در درصد بهبودی زخم در رت‌های دیابتی در نیمه دوم دوره ترمیم می‌شود. از لحاظ میکروسکوپیک، منجر به افزایش شاخص‌های مهم ترمیم زخم در رت‌های دیابتی شد، ولی روند ترمیم همچنان در روز ۲۱ ادامه داشت و این امر بیانگر نقش مثبت این ترکیب گیاهی بر فرایند ترمیم زخم در موش‌های دیابتی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که اثر التیام بخشی این ترکیب حاصل اثرات مثبت و متنوع ترکیبات آن باشد. از آن‌جا که خواص درمانی فراوان برای چهار گیاه موجود در هربالین گزارش شده است، لذا برای تعیین دقیق سهم هر کدام نسبت به کل و همچنین ماده موثره موجود در هر یک که باعث اثرات ترمیمی زخم شده است، تحقیقات مشابه پس از خالص سازی هر یک از ترکیبات متشکله موجود در مرهم به‌طور جداگانه پیشنهاد می‌شود. ضمن آنکه مقایسه میزان اثرات ترمیمی این ترکیب با داروهای رایج نیز در

1. Sandhya SS, kumar S, Vinod K R, Banji D, Kumar K. Plants as Potent antidiabetic and Wound healing agents-a Review. *Hygeia J. D. Med* 2011; 3 (11-19)
2. Babaei S, Bayat M, Nouruzian M. Pentoxifylline improve cutaneous wound healing in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 11:024.
3. Tomnilson A, Ferguson MW. Wound Healing: A Model of dermal Wound repair. *Methods Mol Biol* 2003; 225:249-60.
4. Kavta D, Monica C P, Mitchell E S, Ping J et al. Gene Expression profiling of Cutaneous Wound healing. *J Translational Med* 2007; 5:11-19.
5. Diegelmann R F, Evans M C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 9: 283-289.
6. Galiano RD, Tepper OM and et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am Journal Pathology* 2004; 164(6):1935-47.
7. Sema B, Nuriye A, Ay e C, Sehnaz B, Refiye Y. Immunohistochemical studies on the effect of Aloe vera on the pancreatic -cells in neonatal streptozotocin-induced type-II diabetic rats. *Egyptian Journal of Biology* 2005; 7: 14-19
8. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wound in rats. *Mol Cell Biochem* 1998; 181:71-76.
9. Ratre M, Nathorn C, Surachet N, Chuenjid K. The Efficacy of Aloe Vera used for Burn Wound Healing. A systematic review. *Burns* 2007; 33:713-718.
10. Norton KJ. The World Most Popular Herbs Myrrh Commiphora molmol) Health Benefits and Side Effects; 2012. Retrieve from: <http://kylenorton.healthblogs.org>
11. Alzahrani H, Bakhotmah B, Boukraâ L. In Vitro Susceptibility of Diabetic Wound Bacteria to Mixtures of Honey, Commiphora molmol and

- Nigella sativa. *The Open Nutraceuticals Journal* 2011; 04: 172-175.
12. Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. Dragon,s blood: Botany, Chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 115: 361-380
  13. Chen ZP, Cai Y, Philipson JD. Studies on the Anti-tumor, Anti-bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragons Blood. *Planta Med* 1994; 60(6):541-5.
  14. Amit S, Babasaheb N, Kale, Rajkumar. A phytopharmacological review on Lawsonia inermis. *Int. J. Of Pharm. & Life Sci* 2011; Vol. 2: 536-541.
  15. Wei W, Shaoqiang L, Yechen X, et al. Acceleration of Diabetic wound Healing with Chitosan-Crosslinked Collagen Sponge Containing Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor in Healing-Impaired STZ Diabetic Rats. *Life Sci* 2008; 82(3-4):190-204.
  16. Khaksar S, Kesmati M, Rezaie A, Rasekh A. Effects of Systemic and Topical Estrogen Application on the Healing of Full-thickness Skin Wounds in Diabetic Rats. *Comp Clin Pathol* 2012; 21:653-659.
  17. Rajabi MA, Rajabi F. The effect of Estrogen on Wound Healing in Rats. *Pakistan J Med Sci* 2007; 23: 394-52.
  ۱۸. توکلی، محمد الله؛ وزیرى نژاد، رضا؛ انصاری جابری، علی؛ نگاهبان، طیبه؛ مشایخی، حبیبه؛ نظری، مینا؛ و دیگران. اثر عصاره هیدروالکلی کلپوره بر ترمیم زخم پوستی موش صحرايي. *مجله پزشکی هرمزگان* ۱۳۹۱؛ سال شانزدهم (شماره ۱) ۱۷-۲۴.
  19. Gupta A, Nitin K. Apoly-herbal Formulation Accelerates Normal and Impaired Diabetic Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration* 2008; 16:784-790.
  20. Haritha C, Yadav J, Rvikumar S, Ilias Basha G, Deshmukh R, Ravi G, Santhamma B. Wound Healing Activity of Topical Application of Aloe Vera Gel in Experimental Animl Models. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2012; Vol 3/Issue 2.
  21. Davis RH, Didonato JJ, Hartman GM, Haas RC. Anti-inflammatory and Wound Healing Activity of a Growth Substance in Aloe Vera. *J. Amer. Podiatric. Med. Assoc* 1994; 84(2):77-81.
  22. Sakarkar D M, Sakarkar U M, et al. Wound Healing Properties of henna leaves. *Natural Product Radianc* 2004; 3(6):406-412.
  23. Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological Approaches to Wound Healing Exploring Medicinal Plant of India. *Journal Ethnopharmacol* 2007; 114(2):103-113.
  ۲۴. رنجبرحیدری، آزاده؛ خیاط زاده، جینا؛ کشته گر، مهدی. تأثیر عصاره آبی ریشه گیاه جفجغه (*Prosopis farcta*) بر التیام زخم های دیابتی در موش های صحرايي دیابتی. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند* ۱۳۹۱؛ (شماره ۳) ۲۴۵-۲۵۴.

## EFFECT OF TOPICAL APPLICATION OF AN HERBAL COMPLEX ON THE WOUND HEALING PROCESS IN DIABETIC RATS

Zahra Abbasi Zadeh<sup>1\*</sup>, Mahnaz Kesmati<sup>1</sup>, Hamid Galehdari<sup>2</sup>, Anahita Rezaie<sup>3</sup>, Seyed Mansor Seyednezhad<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

2. Department of Genetic, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

3. Department of Pathobiology, Faculty of ,Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

### ABSTRACT

**Background:** The process of wound healing is impaired in diabetes. Many efforts have been made to accelerate the wound healing process. Long time healing effect of a herbal complex containing Aloe vera, Myrrh, dragon's blood and henna has been observed in wound healing, But sufficient scientific evidence of how the mechanism of action of this compound is absent in diabetic wounds; Whereas the effect of each of them separately in several studies on ulcers observed. The purpose of this study was to evaluate the effect of topical herbal (briefly called Herbalin) on wound healing in diabetic rats.

**Methods:** The diabetic rats were divided into two groups: control (treated with Vaseline as a vehicle) and experimental (treatment with herbalin) were included. In each class, all wound round with a diameter of 2cm was made on the dorsal surface of diabetic rats. Wound measurement and histopathological parameters such as the formation of re-epithelization, granulation tissue formation and the average thickness of the epithelium at intervals of 7, 14 and 21 days were evaluated. Strain epithelium on day 14 and the wound length at day 21 was evaluated in the terminal phase.

**Results:** In macroscopic study, the Herbalin treated wounds were found to healing much faster and the day 14 has considerable change compared with control group ( $P < 0.05$ ). In microscopic study, in all cases of the Herbalin treatment groups showed a significantly increased as compared with controls ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** According to the results, the herbal complex, possibly by accelerating the formation of granulation tissue and epithelium and thickening of the epithelium has an important role in wound healing in diabetic and reduces the time required for healing.

**Keywords:** Wound Healing, Herbal, Diabetic Rat

---

\* Ahvaz, Golestan Avenue, Chamran University, Tell: 06113757034, Email: Zahra.abbasizadeh@gmail.com