

Effect of Lipogel Containing Extracts of *Eryngium campestre* L. and *Satureja hortensis* L. on Wound Healing in Male Wistar Rats

Fatemeh Royaniyan¹,
 Mohammad Azadbakht²,
 Fereshteh Talebpour Amiri^{3,4},
 Hosein Asgarirad⁵,
 Ali Davoodi⁶,
 Fatemeh Akbari⁷,
 Shervin Amir Khanloo⁸,
 Maryam Salmani Seraji⁹

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Anatomy, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ PhD Student in Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ Ph.D Student in Pharmaceutics, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁹ MSc in Biostatistics, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 15, 2021 ; Accepted November 16, 2021)

Abstract

Background and purpose: Wound is a type of injury with high prevalence in the society. The main requirement for wound management is rapid and complete wound healing without the spread of infection. Medicinal plants are affordable and accessible and suggested as one of the key treatment options. The aim of this study was to investigate the effect of lipogel formulations containing the extracts of *Eryngium campestre* L. and *Satureja hortensis* L. on wound healing in Wistar rats.

Materials and methods: In order to prepare the lipogel formula, several formulations were designed with different ratios of paraffin, polyethylene, and extracts which were all examined to find the best formulation. To this end, 20 rats were divided into four groups (n=5 per group), including normal saline, lipogel base, lipogel containing extracts, and active water. Full thickness wounds (2.5 * 2.5 cm) were made on the dorsal neck area. Wound size evaluation and histopathological study were done on days 3,5,7, and 12.

Results: The formulation containing 95% paraffin and 5% polyethylene was selected as the final lipogel formulation due to better skin coverage, good consistency, and better uniformity. In vivo results showed significant differences in wound size between treatment group and other groups (P<0.05). According to histological studies, the rates of collagen deposition in groups treated with lipogel containing extracts and lipogel base were higher than other groups. Furthermore, fibroblast maturity was found to be significantly different between the rats treated with lipogel containing extracts and normal saline group (P< 0.05).

Conclusion: This study showed that lipogel containing extracts of *Eryngium campestre* L. and *Satureja hortensis* L. was effective in full thickness wound healing.

Keywords: wound healing, traditional Iranian medicine, medicinal plants, lipogel

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (203): 152-162 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

اثر فرمولاسیون لیپوژل حاوی عصاره های گیاه زولنگ (*Eryngium campestre* L.) و مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر روی زخم در رت های نر نژاد ویستار

فاطمه رویانیان¹
محمد آزادبخت²
فرشته طالب پور امیری^{3,4}
حسین عسگری راد⁵
علی داوودی⁶
فاطمه اکبری⁷
شروین امیرخانلو⁸
مریم سلمانی سراجی⁹

چکیده

سابقه و هدف: زخم عارضه‌ای با شیوع بالا در جامعه است. نیازمندی اصلی برای مدیریت زخم، التیام سریع و کامل زخم، بدون پخش شدن عفونت می‌باشد. منابع طبیعی با دسترسی آسان و ارزان قیمت به عنوان یکی از کلیدی‌ترین گزینه‌های درمان پیشنهاد شده است، لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر فرمولاسیون لیپوژل حاوی عصاره‌های گیاه زولنگ (*Eryngium campestre* L.) و مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر بهبود زخم در رت‌های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: جهت تهیه فرمولاسیون لیپوژل، فرمولاسیون‌هایی با نسبت‌های مختلف پارافین، پلی اتیلن و عصاره تهیه و برای یافتن بهترین فرمولاسیون آزمایش شد. بدین منظور 20 رت به چهار گروه (n=5) نرمال سالین، پایه لیپوژل، لیپوژل عصاره‌ها و اکتیو و اثر تقسیم شدند. زخم با ضخامت کامل به مساحت 2/5 در 2/5 سانتی متر در پشت حیوان ایجاد شد. ابعاد زخم و مطالعات هیستوپاتولوژی در روزهای 5، 7، 12 بررسی شد.

یافته‌ها: فرمولاسیون حاوی 95 درصد پارافین و 5 درصد پلی اتیلن به دلیل پوشاندگی بهتر پوستی، قوام مناسب و یکنواختی بهتر، به عنوان فرمولاسیون نهایی لیپوژل انتخاب شد. نتایج مطالعات درون تنی نشان داد که ابعاد زخم در گروه درمان نسبت به بقیه گروه‌ها تفاوت معنی‌دار آماری دارد (P<0/05). نتایج حاصل از مطالعات بافت‌شناسی نشان داد، رسوب کلاژن در گروه‌های لیپوژل عصاره‌ها و پایه لیپوژل بالاتر از بقیه گروه‌ها بود. همچنین بلوغ فیبروبلاست گروه لیپوژل عصاره در مقایسه با گروه نرمال سالین تفاوت معنی‌دار داشت (P<0/05).

استنتاج: بر اساس یافته‌های این مطالعه لیپوژل حاوی عصاره مرزه و زولنگ در بهبود زخم با ضخامت کامل موثر است.

واژه های کلیدی: بهبود زخم، طب سنتی ایرانی، گیاهان دارویی، لیپوژل

مقدمه

زخم یک حالت پاتولوژیک است که به‌طور کلی به دو دسته داخلی و خارجی تقسیم می‌شود. زخم‌های خارجی عمدتاً به علت سوختگی، صدمات و بریدگی‌ها ایجاد می‌شوند و زخم‌های داخلی غالباً به علت حالات التهابی

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

E-mail: azadbakhtm@hotmail.com

1. دانشجو، داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. دانشیار، گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
6. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
7. دانشجوی Phd، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
8. دانشجوی Phd، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
9. کارشناس ارشد آمار زیستی، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/2/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/3/17 تاریخ تصویب: 1400/8/25

دهان و گلو، اسیدپته بالای مایعات معدی در مری، معده، دوازدهه، واکنش‌های ایمنی در روده و راست روده ایجاد می‌شوند. بهبود زخم، یک روند انرژی‌بر، پویا و چند وجهی است که در نهایت باعث ترمیم و تجدید تمامیت آناتومیکی با عملکرد مشابه می‌شود. نیازمندی اصلی برای مدیریت زخم، التیام سریع و کامل زخم، بدون پخش شدن عفونت و سپسیس می‌باشد. زخم‌ها با توجه به پتانسیل بهبودی خود، به دو گروه مزمن و حاد تقسیم می‌شوند. زخم‌های مزمن شامل آسیب‌های بافتی است که برای بهبودی، مراحل سازمان یافته ندارد و بهبود آن‌ها، بیش‌تر از 12 هفته طول می‌کشد. ولی زخم‌های حاد اکثراً به راحتی و بدون مشکل، التیام می‌یابند. چالش اصلی التیام زخم، مرتبط با تغییرات اعمال فیزیولوژیک نرمال، مانند گردش خون ناقص، چاقی، بیماری‌هایی همچون دیابت و شرایط استرس‌زای محیطی می‌باشد (1،2). به‌طور معمول روند التیام زخم با هموستاز، که میزان خون ازدست رفته و تهاجم میکروب‌ها به بخش آسیب دیده است، شروع شده و با فاز التهابی ادامه می‌یابد. در فاز التهابی، نوتروفیل‌ها در ابتدا زیاد می‌شوند و به همراه ماکروفاژها، قسمت‌های آسیب دیده، پاتوژن‌ها، سایر سایتوکاین‌ها و سلول‌ها را حذف می‌کنند. سپس در فاز تکثیر، آنژیوژنز، ساخت ماتریکس و به‌وجود آمدن بافت جدید انجام شده تا منطقه زخم را پر کند. در فاز انتهایی بازسازی، قدرت کششی ماتریکس خارج سلولی افزایش یافته و عرضه خون به قسمت آسیب دیده، کاهش می‌یابد (3،4). پوست انسان از لحاظ مورفولوژی و عملکرد شامل دو لایه اپیدرم و درم می‌باشد. اپیدرم، لایه ای‌اپی‌تلیال با منشأ اکتودرم است. سلول‌های کراتینوسیت درون آن قرار گرفته و حایلی بین بیرون و داخل بدن فراهم کرده است که باعث جلوگیری از هدر رفتن رطوبت بدن می‌شود و بدن را در مقابل خطرات محیطی مثل عفونت‌ها، مواد شیمیایی و اشعه فرابنفش حفظ می‌کند. درم یک بافت همبند با منشأ مزودرمی و غنی از کلاژن است که نقش آن تامین و تغذیه اپیدرم می‌باشد و همچنین مسوول

انعطاف‌پذیری و انسجام مکانیکی پوست است (5). اهمیت روند ترمیم زخم با توجه به این‌که عدم درمان زخم موجب عفونت موضعی و در نهایت عفونت سیستمیک و عوارض بعدی آن می‌شود، موجب شده است تا مطالعات فراوانی برای یافتن راهکار کارآمد و ارزان با عوارض جانبی کم‌تر انجام شود. منابع طبیعی با دسترسی آسان و ارزان قیمت باعث شده است به عنوان یکی از کلیدی‌ترین گزینه‌های درمان پیشنهاد گردد (6). لیپوژل، از اشکال دارویی نیمه جامد از خانواده پماد با پایه Plastibase است که Plastibase پایه پمادی هموزن، نرم، بدون بو و رنگ است که از پارافین و پلی‌اتیلن تشکیل شده است. به دلیل ویسکوزیته بهتر، تحمل دامنه دمایی وسیع‌تر، جذب، آزادسازی بهتر مواد دارویی و سبک‌تر بودن نسبت به وازلین ارجحیت دارد (7،8) و در این مطالعه به عنوان فرمولاسیون مورد نظر استفاده شده است.

گیاه مرزه یا *Satureja hortensis* L. که به Summer Savory نیز شناخته می‌شود، از خانواده Lamiaceae است، که به عنوان گیاه دارویی، ادویه‌ای و سبزی خوراکی کاربرد دارد. این گیاه دارای ساقه‌ای منشعب با ارتفاع 30-10 سانتی‌متر است. این گیاه به رنگ سبز مایل به خاکستری است و برگ آن باریک، بدون دم‌برگ و نوک تیز است. در رویشگاه‌های مختلف ایران و در ماه‌های تیر تا شهریور گل می‌دهد. گیاه مرزه دارای قندهای مختلف، تانن، مواد چرب، ترکیبات فنلی و معطر است. ترکیبات اصلی اسانس مرزه شامل تیمول، کارواکرول، پاراسیمن، آلفا و بتا پینن است، هر چند با توجه به شرایط آب، هوا و خاک محل رویش، می‌تواند متفاوت باشند. طبق تحقیقات ترکیباتی چون تیمول، کارواکرول و پاراسیمن موجود در اسانس مرزه دارای اثر هم‌افزایی است که سبب ممانعت از رشد میکروب می‌شود. از اثرات آن، می‌توان به اثر ضدالتهابی، آنتی‌باکتریال و آنتی‌فونگال، ضد اسپاسم، ضد التهاب، خلط‌آور، ضد اسهال، تقویت‌کننده معده و بهبوددهندگی زخم اشاره نمود، همچنین به‌علت خواص آنتی‌اکسیدانی

اسید و کوثرستین با روش اسپکتوفتومتری در طول موج 415 گزارش شد (13، 14).

فرمولاسیون

در این مرحله 2 فرمولاسیون لیپوژل دارو و لیپوژل پلاسبو تهیه گردید. همه مراحل تهیه دارو و پلاسبو یکسان بوده است، با این تفاوت که فرمولاسیون پلاسبو به گونه‌ای طراحی شده که حاوی همه ترکیبات بجز عصاره گیاهان باشد. جهت تعیین مناسب‌ترین فرمولاسیون، به کمک نسبت‌های مختلفی از پارافین و پلی‌اتیلن، چندین فرمولاسیون طراحی شد که در این بین بهترین فرمولاسیون از جهت کارایی نسبت 95 به 5 پارافین به پلی‌اتیلن انتخاب شد. 95 گرم پارافین مایع و 5 گرم پلی‌اتیلن را داخل بشر ریخته و روی هیتر استیر با دمای 120 درجه سانتی‌گراد و دور 300 و حداقل به مدت 4 ساعت گذاشته می‌شود. ژل پلاستی بیس با سرد و مخلوط کردن تهیه و از نظر خاصیت پوشاندگی، قابلیت شستشو، قوام و روان‌پذیری مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، عصاره‌ها به فرمولاسیون اضافه و در بخش حیوانی استفاده می‌شود. روند تهیه لیپوژل این گونه است که ابتدا برای تهیه 100 گرم لیپوژل حاوی 5 درصد عصاره (2/5 گرم زولنگ و 2/5 گرم مرزه) توزین کرده و به آن 5 سی‌سی آب اضافه کرده تا به صورت کامل باز شوند. سپس به حاوی 10 گرم اوسرین انتقال داده تا به صورت کامل در پایه جاذب پراکنده و جذب شوند. در مرحله بعد به صورت هندسی 80 گرم پایه لیپوژل را اضافه کرده و به خوبی همزده تا فراورده 5 درصد از عصاره مرزه و زولنگ تهیه شود. جهت پایداری میکروبی فرمول به آن متیل‌پارابن و پروپیل‌پارابن نیز اضافه می‌شود.

مطالعات حیوانی

20 رت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی 150-200 گرم از موسسه تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شد و تحت شرایط استاندارد

مصرف آن به عنوان یک افزودنی طبیعی افزایش پیدا کرده است (9، 10). گیاه زولنگ یا *Eryngium campestre* L. از خانواده Apiaceae می‌باشد. زولنگ گیاهی دو یا چند ساله است که دارای برگ‌هایی سبز رنگ متمایل به زرد می‌باشد و گل‌های ارغوانی به ارتفاع 40 الی 80 سانتی‌متر دارد. فاز رویشی گیاه، فصل پاییز تا ماه اردیبهشت است و برگ گیاه قابلیت خوراکی دارد. در فاز زایشی که در ماه خرداد و تیر است، گیاه به دلیل خاردار بودن خوراکی نیست. زولنگ از گیاهان خودرو و بومی استان مازندران می‌باشد که در این استان به عنوان سبزی محلی و معطر کاربرد فراوانی دارد. عصاره متانولی زولنگ حاوی مقدار فنل و فلاونوئید بالایی است که در برابر رادیکال‌های آزاد دارای اثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (11). امروزه در طب مدرن فرآورده‌های گیاهی به عنوان درمان کمکی در بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بهبود زخم با توجه به شرایط ایجاد شده می‌توان از گیاهان به عنوان منبع موثر و طبیعی درمان استفاده کرد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر گیاهان مرزه و زولنگ در بهبود زخم القا شده در رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و عصاره‌گیری از گیاه

گیاهان از جنگل‌های جنوبی شهرستان نکا در منطقه هزارجریب شناسایی و توسط افراد بومی جمع‌آوری شده است. سپس از آن‌ها نمونه‌های هرباریومی تهیه شد و توسط متخصص سیستماتیک گیاهی تایید گردید. اندام هوایی زولنگ و مرزه با اتانل 70 درصد در طی 36 ساعت به روش ماسرسیون تحت عصاره‌گیری قرار گرفت. در نهایت با دستگاه روتاری تغلیظ و با فریز-درایر خشک شد (12).

بررسی فیتوشیمیایی گیاهان

آنالیز فیتوشیمیایی گیاه مرزه و زولنگ با اندازه‌گیری فنول و فلاونوئید به ترتیب براساس استاندارد گالیک

12 ساعت چرخه تاریکی-روشنایی، دمای 24°C و دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد) قرار گرفتند. این مطالعه مطابق با اصول انجمن حمایت از حقوق حیوانات با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.7504 انجام شد.

ایجاد زخم

ابتدا با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین 0/15 ml به ازای 100 گرم وزن بدن، حیوانات بیهوش شدند، سپس موهای قسمت پشتی رت‌ها به اندازه 5 سانتی متر مربع برداشته شد و نواحی مورد نظر ضد عفونی شد و با کمک خط کش شابلون، زخم با ضخامت کامل (full thickness) به ابعاد $2/5\text{cm} \times 2/5\text{cm}$ و مساحت $6/25\text{ cm}^2$ ایجاد شد.

بررسی اثربخشی فرآورده در مدل حیوانی

20 رت نر نژاد ویستار به چهار گروه ($n=5$) به صورت تصادفی تقسیم شدند و به صورت موضعی و روزانه به مدت 12 روز تحت درمان با نرمال سالین (گروه 1)، پایه لیپوژل (گروه 2)، شست و شوی زخم با اکتیووتر (Active water) (گروه 3) و دریافت لیپوژل حاوی عصاره‌های مرزه و زولنگ (گروه 4) قرار گرفتند.

اندازه‌گیری ابعاد زخم

در روزهای 1، 3، 5، 7 و 12 ابعاد زخم به وسیله کاغذ میلی متری اندازه‌گیری شد.

ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی

نمونه‌های پوستی در ظروف نگهدارنده حاوی فرمالین 10 درصد قرار گرفت، برای دستیابی به بلوک‌های پاتولوژی، دستگاه microtome تکه‌های به اندازه 5 mm از بافت ایجاد کرد و این قسمت‌ها به وسیله رنگ اتوزین و همتاکسیلین و لایت گرین رنگ آمیزی شد. بلوک‌های تهیه شده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی $40\times$ به منظور بررسی تکثیر فیبروبلاست، بلوغ بافت

گرانوله، تشکیل عروق خونی، رسوب کلاژن و ارتشاح سلول‌های التهاب مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای هر کدام از ویژگی‌های مورد بررسی در ارزیابی هیستوپاتولوژی نمره‌ای بین 0 تا 3 به صورت قراردادی تعیین شد و سپس میانگین نمره‌های کرایتریای ترمیم زخم برای هر گروه مقایسه شدند.

آنالیز آماری

تمامی اطلاعات به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS و آنالیز اندازه‌های تکراری برای ابعاد زخم و آزمون کروسکال والیس برای ارزیابی هیستوپاتولوژی انجام شد و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی فیتوشیمیایی گیاهان

با بررسی، میزان فلاونوید گیاهان مرزه و زولنگ به ترتیب 2/312 و 2/584 میلی گرم در یک گرم پودر گیاه و میزان فنول تام آن‌ها به ترتیب 16/25 و 25/84 میلی گرم در یک گرم پودر گیاه بر اساس گالیک اسید به دست آمد.

خواص فیزیکیوشیمیایی لیپوژل

لیپوژل با درصدهای 80، 90 و 95 درصد پارافین به پلی اتیلن تهیه شد. به ترتیب هر چه درصد پارافین به پلی اتیلن بیش تر شد، پخش پذیری بیش تر و قوام مطلوب تر مشاهده شد و از نظر پایداری فیزیکی نیز هر سه فرمول بعد از 6 ماه پایدار بودند.

نتایج حاصل از مشاهدات ماکروسکوپی ترمیم زخم همه حیوانات مورد مطالعه در فرایند جراحی و ایجاد زخم و در طول دوره دوازده روزه مطالعه بدون هیچ عوارضی زنده ماندند. نشانه‌های عفونت ثانویه در هیچ زخمی مشاهده نشد. اپی تلیوم جدید به طور کلی در گروه‌های تحت درمان در لبه‌های زخم با یک رنگ

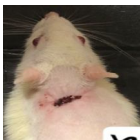
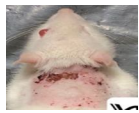
مایل به صورتی به راحتی قابل رویت بود. با توجه به نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی زخم، گروه درمان کاهش چشمگیر در کاهش ابعاد زخم را در مقایسه با سایر گروه‌های مورد بررسی نشان داد.

نتایج حاصل از بررسی ابعاد زخم

نتایج حاصل از بررسی ابعاد زخم (جدول شماره 2) نشان می‌دهد اثر زمان، اثر گروه و اثر متقابل زمان و گروه بر میزان ابعاد زخم معنی‌دار است ($P < 0/05$)، در هر 4 گروه در طول زمان (به خصوص بین روزهای 7 و 12) میزان ابعاد زخم کاهش داشته است. در تمام زمان‌ها نیز بین گروه‌ها (به خصوص بین گروه درمان با سایر گروه‌ها) تفاوت معنی‌دار آماری در ابعاد زخم وجود داشته است. حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار، حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

نتایج حاصل از ارزیابی شاخص‌های هیستوپاتولوژی نتایج بافت‌شناسی نشان داد که گروه درمان، بیش‌ترین تغییرات را نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. از تغییرات مهمی که می‌توان بیان داشت، تشکیل اپیدرم پس از درمان با لیپوژل حاوی عصاره مرزه و زولنگ، در مقایسه با گروه نرمال سالین بود. درمان با عصاره گیاهی، تکثیر سلول و رشد مجدد اپیدرم را افزایش داد. در این مطالعه لیپوژل حاوی عصاره گیاه، تکثیر فیبروبلاست در محل زخم را تحریک کرده است. میزان بافت گرانوله در روز دوازدهم پس از ایجاد زخم در همه گروه‌ها افزایش یافت. اما بلوغ بافت گرانوله در گروه درمان در مقایسه با سایر گروه‌ها مقدار بیش‌تری افزایش یافت و بافت گرانوله فضای زخم را پر کرد. بلوغ بافت گرانوله در روز دوازدهم در اکتیوواتر در مقایسه با گروه نرمال سالین و پایه لیپوژل افزایش یافته بود. تشکیل عروق خونی به وضوح در گروه درمان نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد، اما معنادار نبوده است. میزان

جدول شماره 1: بررسی ماکروسکوپی زخم و روند بهبود آن در ابتدا و انتهای مطالعه، به جهت مقایسه گروه‌های مختلف با هم در روزهای مشابه و همچنین مقایسه تغییرات بافتی در هر یک از گروه‌ها به صورت جداگانه در ابتدا و انتهای آزمایش

روز	گروه درمان	گروه اکتیوواتر	گروه پایه لیپوژل	گروه نرمال سالین
روز 1				
روز 12				

جدول شماره 2: ابعاد زخم در چهار گروه و در روزهای 3، 5، 7، 12

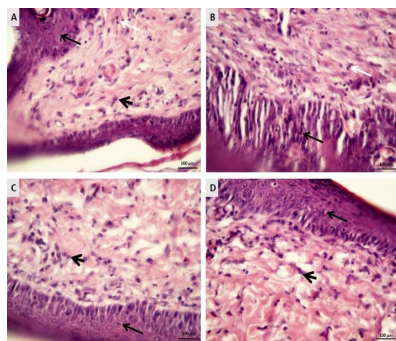
گروه	زمان	روز سوم	روز پنجم	روز هفتم	روز دوازدهم	منبع	F آماره (d.f)	سطح معنی داری
نرمال سالین		$315/50 \pm 3/16cd$	$275/60 \pm 3/05cC$	$213/80 \pm 8/07bB$	$38/30 \pm 1/20bA$	زمان * گروه	5,18 (106/818)	0/001
پایه ی لیپوژل		$334/00 \pm 4/85dD$	$294/00 \pm 2/92dC$	$182/90 \pm 2/01dB$	$17/030 \pm 0/57cA$	زمان	3 (358/574)	0/001
اکتیوواتر		$405/40 \pm 9/48bD$	$305/20 \pm 3/70bC$	$230/00 \pm 1/58cB$	$27/60 \pm 0/96dA$	گروه	1,73 (14415/543)	0/001
لیپوژل عصاره ها		$268/60 \pm 15/65aD$	$234/00 \pm 4/85aC$	$153/40 \pm 4/72aB$	$7/10 \pm 0/96aA$	زمان		

* $P < 0/05$ ، ** $P < 0/01$ ، *** $P < 0/001$

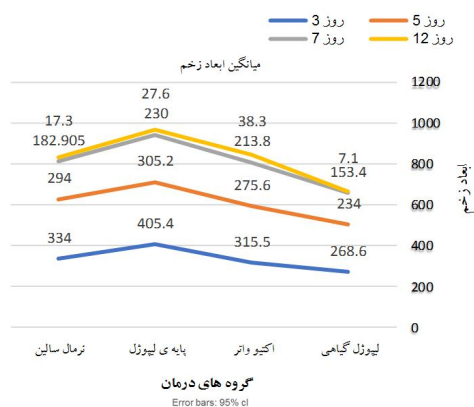
a: نسبت به نرمال سالین معنی دار است.

نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی

نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی زخم در روز دوازدهم آزمایش نشان‌دهنده یک لایه اپیدرم کامل‌تر در گروه درمان نسبت به گروه نرمال سالین بود. تشکیل بافت گرانوله در گروه درمان واضح بود. بلوغ فیروبلست نیز در گروه درمان و اکتیووتر به وضوح دیده شد (تصویر شماره 1). در نمودار شماره 2 می‌توان ارتشاح سلول‌های التهابی (پیکان سفید)، نواپیدرم (پیکان مشکی نازک)، فیروبلست بالغ (پیکان مشکی ضخیم) را مشاهده کرد. همچنین میزان رسوب کلاژن در بافت گرانوله در ناحیه زخم در گروه درمان نسبت به گروه‌های پایه لیپوژل و نرمال سالین افزایش قابل توجهی داشت. رنگ سبز نشان‌دهنده میزان رسوب کلاژن می‌باشد (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 1: فتومیکروگراف بیوپسی پوست (رنگ آمیزی هاتوکسلین و ائوزین با بزرگنمایی 40X): گروه نرمال سالین، B: گروه پایه لیپوژل، C: گروه اکتیووتر و D: گروه لیپوژل عصاره ها



نمودار شماره 2: منحنی خطی میانگین ابعاد زخم در طول زمان در 4 گروه

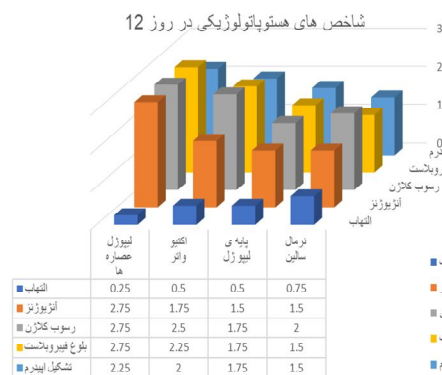
رسوب کلاژن در بافت گرانوله در ناحیه زخم در همه گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، اما در گروه درمان بیش‌تر از سایر گروه‌ها بودند. همچنین ارتشاح سلول‌های التهاب در گروه نرمال سالین نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌تر بود اما معنادار نبوده است. در نهایت با توجه به داده‌های آماری در نمودار شماره 1 و جدول شماره 3 نشان می‌دهد از میان شاخص‌های هیستوپاتولوژی تنها بلوغ فیروبلست در بین گروه‌های مطالعه تفاوت معنی‌داری دارد ($P < 0/05$) البته این تفاوت خیلی زیاد نیست.

جدول شماره 3: بررسی کمی شاخص‌های میکروسکوپی که دخیل در فرایند بهبود با آزمون کروسکال والیس جهت ارزیابی شاخص‌های هیستوپاتولوژی در 4 گروه (میانگین رتبه‌ها)

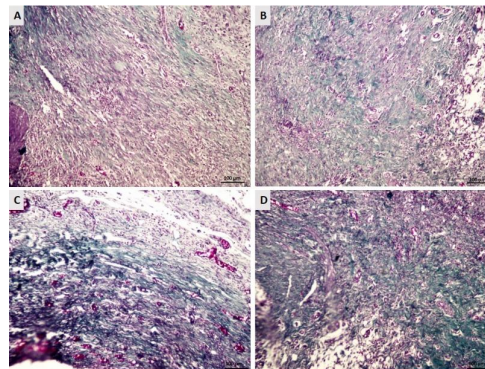
گروه	متغیر	رسوب کلاژن	نورگ زایی	بلوغ فیروبلست	تشکیل اپیدرم
لیپوژل عصاره ها	12/13	13/25	12/88	11/13	6/50
اکتیووتر	10/25	7/75	9/63	9/50	8/50
پایه لیپوژل	5/13	6/50	6/50	7/63	8/50
نرمال سالین	6/50	6/50	5/00	5/75	10/50
F (d.f) آماره	(3) 7/659	(3) 6/225	(3) 8/056	(3) 4/990	(3) 1/875
سطح معنی داری	0/054	0/101	0/045	0/173	0/599

انحراف معیار	لیپوژل عصاره ها	اکتیووتر	پایه لیپوژل	نرمال سالین
لیپوژل عصاره ها	200 ± 0/00	1/50 ± 0/58	1/50 ± 0/58	0/75 ± 0/50
پایه لیپوژل	1/75 ± 0/75	1/75 ± 0/58	1/75 ± 0/58	0/58 ± 0/50
اکتیووتر	2/50 ± 0/58	1/75 ± 0/96	2/25 ± 0/50	0/58 ± 0/50
لیپوژل عصاره ها	2/75 ± 0/50	2/75 ± 0/50	2/75 ± 0/50	0/50 ± 0/25
F آماره	4/000	3/091	4/538	2/000
سطح معنی داری	0/035	0/068	0/024	0/168

* $P < 0/05$ ، ** $P < 0/01$ ، *** $P < 0/001$ ، a: نسبت به نرمال سالین معنی دار است.



نمودار شماره 1: نمودار ستونی میانگین ± انحراف معیار شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی در گروه‌های مورد مطالعه در روز دوازدهم



تصویر شماره 2: هیستوپاتولوژی ترمیم زخم حاد و میزان رسوب کلاژن در روز دوازدهم (رنگ آمیزی لایت گرین، بزرگنمایی 10).

بحث

این مطالعه با هدف بررسی اثر درمانی فرمولاسیون لیپوزل گیاهان مرزه و زولنگ در زخم در مدل حیوانی در طول دوره 12 روزه درمانی انجام شد.

زخم و کاهش زمان بهبود آن یکی از موارد مورد توجه در علوم پزشکی است. با توجه به اهمیت پروسه ترمیم زخم و این که عدم درمان زخم موجب عفونت موضعی و در نهایت عفونت سیستمیک و عوارض بعدی آن می شود، در حال حاضر داروهای شیمیایی مختلفی برای ترمیم زخم تولید می شود که دارای عوارض جانبی متعددی می باشند. اما استفاده از مواد طبیعی برای ترمیم زخم به دلیل عوارض کم تر، دسترسی راحت و هزینه های کم تر همواره مورد توجه قرار گرفته است (6). در طب ایرانی و باقی فلسفه های طبی از مفردات و قراپادین مختلفی برای درمان انواع زخم ها و التهابات در گذشته استفاده می شده است. در طب ایرانی 2 گیاه قرصنه یا زولنگ و مرزه کاربرد فراوانی در درمان زخم ها داشتند که در کتب معتبری مانند فردوس الحکمه ابن الطبری، قانون بوعلی سینا، الجامع لمفردات الاودیه و الاغذیه ابن البیطار و مخزن الادویه عقیلی خراسانی از آن ها یاد شده است (15، 16). همچنین مطالعات مختلفی در مورد عملکردهای فارماکولوژیک این 2 گیاه و همچنین مطالعات مشابه در مورد درمان زخم دیابتی و غیر دیابتی انجام شده است.

در این مطالعه با بررسی فرمولاسیون های مختلف با نسبت های مختلف از مواد، فرمولاسیون با نسبت 95 به 5 پارافین به پلی اتیلن دارای کیفیت بهتر از نظر قوام و بخش پذیری بود که برای پایه لیپوزل انتخاب شد. زخم های تمام ضخامت یکی از موضوعات اصلی در علم پزشکی و علت عمده موربیدیتی و مورتالیتی است. گزارشات متعددی در مورد عوارض به تاخیر افتادن ترمیم زخم وجود دارد، بنابراین سرعت در ترمیم، یک فاکتور لازم برای ترمیم زخم و در نتیجه داروی مورد استفاده است (17). با توجه به نتایج ماکروسکوپی، بین ابعاد زخم ها در تمام روزهای اندازه گیری تفاوت های معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$). در این بین بیش ترین اختلاف ابعاد زخم بین گروه لیپوزل گیاهی با سایر گروه ها وجود دارد. با گذشت زمان، محدوده ابعاد زخم کاهش می یابد. بیش ترین اختلاف بین روز هفتم و دوازدهم است (جدول شماره 1 و 2). با توجه به بررسی فیتوشیمیایی عصاره های زولنگ و مرزه و حضور بالای فلاونوئید در عصاره های مورد بررسی و با توجه به اثرات فلاونوئیدها و تریتیرنوئیدها در بهبود ترمیم زخم با افزایش جمع شدن مساحت زخم و افزایش میزان اپی تلایلزاسیون و جلوگیری از عفونت ثانویه، گیاهان مرزه و زولنگ می توانند نقش بسزایی در بهبود زخم ایجاد کنند (18).

فیروبلاست ها و سلول های اندوتلیال به عنوان سلول های اصلی، نقش مهمی در تشکیل کلاژن و بافت گرانوله و رشد مویرگی در محل زخم پوست در حال ترمیم دارند، همچنین این سلول ها با رسوب کلاژن و جمع شدن سطح زخم نقش مهمی در روند ترمیم زخم ایفا می کند (19). فیروبلاست ها موجب تولید تعدادی از سیتوکین ها و فاکتورهای رشد می شوند که تکثیر و تمایز سلول ها در بستر زخم را تحریک می کنند (17). با توجه به نتایج آماری مطالعه در بلوغ فیروبلاست بین گروه لیپوزل گیاهی و سایر گروه ها تفاوت معنی دار آماری وجود دارد ($P < 0/05$) (جدول شماره 3 و تصویر شماره 1) و با توجه به نتایج بافت شناسی، گروه درمان در مقایسه با گروه

نرمال سالین یک لایه اپیدرم کامل تری دارد و تشکیل بافت گرانوله در گروه درمان واضح است. بلوغ فیروپلاست نیز در گروه درمان و اکتیواتر به وضوح دیده می شود. کلاژن به عنوان یک پروتئین کلیدی در ماتریکس خارج سلولی بافت گرانوله به طور قابل ملاحظه در استحکام زخم نقش دارد (20). فلاونوئیدها موجب افزایش ساخت و کراس لینک کلاژن می شوند و به عبارتی از تخریب و از هم پاشیدگی کلاژن محلول می کاهند (21). میزان رسوب کلاژن در بافت گرانوله در ناحیه زخم در گروه درمان نسبت به گروه های پایه لیپوزل و نرمال سالین افزایش قابل توجهی داشت. این یافته ها ممکن است وابسته به حضور فلاونوئیدها باشد که در مطالعه حاضر، آنالیز کمی عصاره ها، سطوح بالای عناصر فلاونوئید و فنول تام در عصاره گیاهان مرزه و زولنگ را نشان می دهد و همچنین مطالعات اخیر در زمینه بهبود ترمیم زخم نقش فلاونوئیدها را نشان داده است (22). این مشاهدات همسو با یافته های Küpeli و همکارانش در سال 2006 است که بر روی گونه های مختلف جنس *Eryngium* انجام دادند و اثرات ضد التهاب و ضد درد مناسب گزارش شده را به ترکیبات فلاونوئیدی و تربنوئیدهای آن ها ربط دادند. یافته های این مطالعه نشان داد که اثرات ضد التهابی و ضد درد این گونه ها با داروهای معمول ضد درد و ضد التهاب قابل مقایسه بوده و معنی دار می باشد (23). همچنین در پژوهشی که در سال 2005 Strzelecka و همکارانش بر روی اثرات ضد التهابی گیاه *Eryngium campestre* در مدل حیوانی انجام دادند، اثرات مناسبی را از عصاره این گیاه مشاهده کردند (24). در مطالعه Palá-Paúl و همکاران بیان شد که محتوای اسانسی گیاه زولنگ یا *Eryngium campestre* نیز دارای ترکیبات اسانسی بالقوه ضد درد و ضد التهابی می باشد (25). در مطالعه حاج هاشمی و همکارانش در سال 2002، عصاره هیدروالکلی گیاه *Satureja hortensis* در مدل حیوانی اثرات ضد درد و ضد التهاب مناسبی را از خود نشان داد. همچنین اسانس موجود در این گیاه نیز دارای

اثرات ضد درد خوبی بود. با توجه به این مطالعه، این اثرات فارماکولوژیک نسبت به داروهای معمول قابل مقایسه بوده و معنی داری قابل قبولی داشتند (26). در پژوهشی که شریفی و همکارانش در سال 2018 بر روی گیاه مرزه یا *Satureja hortensis* انجام دادند، اثرات آنتی میکروبیال اسانس این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از پایان مطالعه مشخص شد که این ترکیبات دارای اثرات قابل توجه آنتی باکتریالی و ضد تشکیل بیوفیلم توسط پاتوژن ها بوده است (27). حال با توجه به نتایج آماری مطالعه، ارتشاح سلول های التهاب در گروه نرمال سالین نسبت به سایر گروه ها بزرگ تر است اما معنادار نبوده است. اما التهاب در گروه درمان نسبت به سایر گروه ها کم تر بوده است، که نشان دهنده خواص ضد التهابی گیاهان مرزه و زولنگ می باشد. همچنین با توجه به حضور فلاونوئید در مرزه و زولنگ می توان گفت، فلاونوئیدها با فعالیت های ضد باکتریال و ضد ویروسی خود از عفونت ثانویه زخم جلوگیری کرده اند (18). تشکیل عروق خونی به وضوح در گروه درمان نسبت به سایر گروه ها مشاهده شده اما از نظر آماری معنی دار نبوده است. رگزایی موجب افزایش سطح اکسیژن می شود و تکثیر سلول و ساخت کلاژن را ارتقاء می بخشد (28). در این مطالعه اثر عصاره گیاهی بر رگزایی نسبت به گروه نرمال سالین به وضوح دیده می شود. در بررسی هیستوپاتولوژیکی، بخش هایی از گروه های درمان شده، رگزایی را در یک سطح تقریباً بالاتری در مقایسه با گروه نرمال سالین نشان داده است. در مجموع پیشنهاد می شود ارزیابی دقیق تری از نوع فلاونوئیدهای موجود در این گیاهان انجام شود و همچنین مطالعات بیش تری با درصدهای مختلف عصاره این دو گیاه توصیه می شوند. لیپوزل حاوی مرزه و زولنگ میزان کلاژن و اپی تلایزاسیون را افزایش دادند و همچنین شدت التهاب را کاهش دادند. عصاره این گیاهان می تواند در ترمیم زخم پوستی نقش موثری داشته باشد و به عنوان یک گزینه مناسب برای درمان زخم های حاد معرفی گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی افرادی که در این طرح کمک کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

این تحقیقات با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

References

1. Anisha BS, Biswas R, Chennazhi KP, Jayakumar R. Chitosan-hyaluronic acid/nano silver composite sponges for drug resistant bacteria infected diabetic wounds. *Int J Biol macromol* 2013; 62: 310-320.
2. Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, Jayakumar R. Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; 127: 105-113.
3. Komarcević A. The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 2000; 53(7): 363-368.
4. Singh MR, Saraf S, Vyas A, Jain V, Singh D. Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances. *Artif cells Nanomed Biotechnol* 2013; 41(3): 202-212.
5. Malekmohammadi M, Abdol Tehrani H, Aghdami N. Skin structure and wound healing phases. *JDC* 2011; 2(4): 229-244.
6. Alah gahi F, Shiravi A, Hojati V. Histomorphometric study effect of alcoholic extract of grape seed (*Vitis Vinifera*) on wound healing diabetic male Wistar rats. *Journal of Cell & Tissue (JCT)* 2017; 7(3): 293-300.
7. Revision USPCCo, editor United States Pharmacopeia, the National Formulary 2008: United States Pharmacopeial Convention, Incorporated.
8. Allen JR, Ansel HC. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems: Tenth edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2014; 794.
9. Mihajilov-Krstev T, Radnović D, Kitić D, Zlatković B, Ristić M, Branković S. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Central European Journal of Biology* 2009; 4(3): 411-416.
10. Izadi Z, AghaAlikhani M, Mirazi N. Identification of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil. *RJMS* 2020; 27(2): 35-48.
11. Hasheminya S-M, Dehghannya J. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Eryngium caucasicum* Trautv aqueous extracts and its antioxidant and antimicrobial properties. *Particulate Science and Technology* 2020; 38(8): 1019-1026 (Persian).
12. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 2005; 71(2): 214-222.
13. Mrowietz U, Wustlich S, Hoexter G, Graeber M, Bräutigam M, Luger T. An experimental ointment formulation of pimecrolimus is effective in psoriasis without occlusion. *Acta Derm Venereol* 2003; 83(5): 351-353.
14. Pourmorad FS, HosseiniMehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5(11): 1142-1145.

15. Nasser M, Tibi A, Savage-Smith E. Ibn Sina's Canon of Medicine: 11th century rules for assessing the effects of drugs. *J R Soc Med* 2009; 102(2): 78-80.
16. Aghili MH. *Makhzan-al-advia*. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2009; 328.
17. Tanideh N, Rokhsari P, Mehrabani D, Samani SM, Sarvestani FS, Ashraf MJ, et al. The healing effect of licorice on *Pseudomonas aeruginosa* infected burn wounds in experimental rat model. *World J Plast Surg* 2014; 3(2): 99-106.
18. Nagar HK, Srivastava AK, Srivastava R, Kurmi ML, Chandel HS, Ranawat MS. Pharmacological Investigation of the Wound Healing Activity of *Cestrum nocturnum* (L.) Ointment in Wistar Albino Rats. *J Pharm (Cairo)*. 2016; 2016: 9249040.
19. Ersel M, Uyanikgil Y, Akarca FK, Ozcete E, Altunci YA, Karabey F, et al. Effects of silk sericin on incision wound healing in a dorsal skin flap wound healing rat model. *Med Sci Monit* 2016; 22: 1064-1078.
20. Grillo HC. Derivation of fibroblasts in the healing wound. *Arch Surg* 1964; 88(2): 218-224.
21. Lodhi S, Jain A, Jain AP, Pawar RS, Singhai AK. Effects of flavonoids from *Martynia annua* and *Tephrosia purpurea* on cutaneous wound healing. *Avicenna J Phytomed* 2016; 6(5): 578-591.
22. Nayak S, Nalabothu P, Sandiford S, Bhogadi V, Adogwa A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica*. L. and *Laurus nobilis*. L. extracts on rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6(12): 1-6.
23. Küpeli E, Kartal M, Aslan S, Yesilada E. Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(1): 32-37.
24. Strzelecka M, Bzowska M, Koziel J, Szuba B, Dubiel O, Heinrich M, et al. Anti-inflammatory effects of extracts from some traditional Mediterranean diet plants. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56(Suppl1): 139-156.
25. Palá-Paúl J, Usano-Aleman J, Soria AC, Pérez-Alonso MJ, Brophy JJ. Essential oil composition of *Eryngium campestre* L. growing in different soil types. A preliminary study. *Natural Product Communications* 2008; 3(7): 1121-1126.
26. Hajhashemi V, Ghannadi A, Pezeshkian SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *J Ethnopharmacol* 2002; 82: 83-87.
27. Sharifi A, Mohammadzadeh A, Zahraei Salehi T, Mahmoodi P. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *J Appl Microbiol* 2018; 124(2): 379-388.
28. Cetin EO, Yesil-Celiktas O, Cavusoglu T, Demirel-Sezer E, Akdemir O, Uyanikgil Y. Incision wound healing activity of pine bark extract containing topical formulations: a study with histopathological and biochemical analyses in albino rats. *Pharmazie* 2013; 68(1): 75-80.