

Effects of Azulene on Granulation Tissue Formation and Epithelialization during Skin Wound Healing in BALB/c Mice

Mohammad Afshar^{1,2},
Mohammad mehdi Hassanzadeh-Taheri^{1,3},
Mahmood Zardast⁴,
Faezeh Vahdati^{1,5}

¹ Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

² Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Birjand Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Pathology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

⁵ MSc in Anatomy, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received July 30, 2018 ; Accepted September 3, 2018)

Abstract

Background and purpose: Azulene is a non-alternating hydrocarbon with various biological activities including anti-inflammatory activity. This study investigated the effects of azulene on granulation tissue formation and epithelialization in skin wound healing in mice.

Materials and methods: In this experimental study, 60 adult male BALB/c mice were divided into 5 groups (n=12): experimental groups I and II were treated with 1% and 2% azulene, respectively and groups III and IV were treated with nitrofurazone and ucerin cream, respectively. Group V did not receive any treatment. After deep anesthesia, a linear wound (2 cm length) was made on dorsal thoracic skin of the mice. Then, wound samples were taken at days 4, 7, 10, and 14 after treatments and processed for histological and microscopic examinations using Hematoxyline-Eosin (H&E) and Masson Trichrome staining methods. Data analysis was done in SPSS V24 applying One-way ANOVA and Tukey test.

Results: The means of granulation formation, angiogenesis, fibroblast cells, and collagen formation increased significantly in groups I and II at days 7, 10, and 14 compared to those of the negative control and sham groups ($P<0.01$). Also, the rate of epithelialization was higher in these groups compared with that of other groups ($P<0.05$).

Conclusion: In current study, azulene could accelerate skin wound healing in BALB/c mice.

Keywords: azulene, granulation tissue, wound healing, mouse

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (170): 1-10 (Persian).

* **Corresponding Author:** Faezeh Vahdati- Faculty of Medicine, Birjand university of medical sciences, Birjand, Iran
(E-mail: F.vahdati110@gmail.com)

اثرات آزولن بر تشکیل بافت گرانوله و اپی تلیالیزاسیون در طی التیام زخم پوستی موش های نژاد BALB/c

محمد افشار^۱محمد مهدی حسن زاده طاهری^۳محمود زردست^۴فائزه وحدتی^۵

چکیده

سابقه و هدف: آزولن یک هیدرو کربن غیر متناوب است و دارای فعالیت های بیولوژیکی مختلفی از جمله اثرات ضد التهابی می باشد. هدف این مطالعه تأثیر این ماده بر روند تشکیل بافت گرانوله و اپی تلیالیزاسیون در روند ترمیم زخم پوستی موش بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، ۶۰ سر موش سوری نر بالغ BALB/c به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه های تجربی ۱ و ۲ تحت درمان با غلظت های ۱ و ۲ درصد آزولن و گروه های ۳، ۴ و ۵ به ترتیب با نیترو فورازون، پایه کرم اوسرین و بدون هیچ درمان تیمار شدند. پس از ایجاد بیهوشی، یک زخم خطی (۲ سانتی متر) در سطح پشتی ناحیه توراسیک بدن موش ها ایجاد گردید. در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴، نمونه برداری از محل زخم صورت گرفت و بعد از طی کردن مراحل پاساژ بافتی، جهت بررسی های میکروسکوپی و ارزیابی متغیرهای مورد مطالعه از روش های رنگ آمیزی هماتو کسپلین-آئوزین و رنگ آمیزی تری کروم ماسون استفاده شد. داده ها با استفاده از آزمون های ANOVA و Tukey با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴) مورد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: میانگین وسعت بافت گرانوله، رگ زایی، تعداد سلول های فیبروبلاست و کلاژن سازی در روزهای ۷، ۱۰ و ۱۴ در گروه های درمان شده با آزولن ۱ و ۲ درصد نسبت به گروه های کنترل منفی و شم افزایش معنی داری داشت ($p < 0/01$). همچنین میزان اپی تلیالیزاسیون در گروه های تحت درمان با آزولن ۱ و ۲ درصد افزایش معنی داری نسبت به گروه های کنترل و شم نشان دادند ($p < 0/05$).

استنتاج: آزولن می تواند روند ترمیم زخم های پوستی را در موش های نژاد BALB/c تسریع کند.

واژه های کلیدی: آزولن، بافت گرانوله، التیام زخم، موش

مقدمه

وظایف متعددی دارد. پوست، مانند یک سد فیزیکی در برابر محیط اطراف عمل می کند، محافظ بدن در برابر

پوست به عنوان بزرگترین عضو بدن ۱۶ درصد از وزن و ۱/۸ مترمربع از سطح آن را تشکیل می دهد. پوست

E-mail: F.vahdati110@gmail.com

مؤلف مسئول: فائزه وحدتی- بیرجند: دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

۱. استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۲. مرکز تحقیقات سم شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۴. دانشیار، گروه آسیب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۵. کارشناسی ارشد آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۴/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۱۲

اشعه ماوراء بنفش است، محافظت در برابر ورود میکروارگانسیم ها و عوامل سمی است و همچنین تولید ویتامین D را در بدن به عهده دارد (۲۰۱). دو لایه ساختاری پوست شامل، اپی درم و درم می باشد (۳). ترمیم یا بازسازی زخم یک فرآیند پیچیده است که نتیجه آن بازگشت ساختار آناتومیکی و عملکردی بافت بوده و شامل ۴ مرحله هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی می باشد (۴). گذر از مراحل پیچیده روند ترمیم زخم بسیار حساس و دقیق می باشد و عوامل زیادی ممکن است موجب اختلال در مسیر این روند طبیعی گردند. تشکیل بافت گرانوله و وسعت آن یکی از بحرانی ترین فرآیندهای ایجاد شده در مسیر ترمیم زخم می باشد. تاثیر عوامل مخرب باعث طولانی شدن ترمیم، تشکیل نسج جوشگاهی بد شکل و در مواردی منجر به از کار افتادگی یا حتی مرگ فرد نیز می گردد. از طرفی هزینه های درمانی زخم های مزمن می تواند مشکلات جدی در بخش درمان کشورهای مختلف ایجاد کند، برای مثال هزینه سالانه مرتبط با درمان این زخم ها در آمریکا در حدود ۱ بلیون دلار برآورد شده است (۶،۵). در طب سنتی استفاده از روغن های حیوانی و گیاهان دارویی برای درمان زخم از سابقه طولانی برخوردار است و امروزه رویکرد استفاده از این گیاهان با توجه به مقرون به صرفه بودن و عوارض جانبی کم تر، نسبت به داروهای شیمیایی افزایش پیدا کرده است (۷-۹). گزارشات نشان می دهند که بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی به صورت بالقوه برای بهبود زخم استفاده می شود (۱۰). از جمله یکی از این گیاهان می توان بابونه را نام برد که یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی در جهان است و در طب سنتی به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱). از مهم ترین اجزای اصلی اسانس استخراج شده از بابونه آلمانی می توان از آلفا ترپنئید، بیسابلول، آزولن و مشتقات استیلن نام برد (۱۲). آزولن به میزان فراوان در اسانس گیاه بابونه و همین طور بومادران یافت می شود. این ماده دارای یک هیدروکربن غیر متناوب شامل یک حلقه هفت شاخه و یک حلقه پنج شاخه اشباع است و

به دلیل جذب نور بالا به رنگ آبی می باشد (۱۳). آزولن مهارکننده مهم فاکتورهای التهابی می باشد. از جمله مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است بررسی اثر آزولن در مهار پروستاگلاندین E2 می باشد که بر روی سلول های RAW26417 حاصل از مایع صفاقی موش های نژاد BALB/c انجام شده است. این مطالعه نشان داده است که این ماده اثر مهاری در تولید پروستاگلاندین E2، (یکی از مهم ترین میانجی های التهابی) دارد (۱۴). همچنین در بررسی انجام گرفته بر روی فیروبلست های لثه، مشخص گردیده است که آزولن مهارکننده اینترلوکین ۸ (IL-8) می باشد که یک سیتوکین مهم التهابی است (۱۵). در مطالعه دیگری که اثر آزولن بر رشد سلول های نرمال و تومورال مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که آزولن باعث تحریک رشد سلول های نرمال شده ولی بر سلول های تومورال اثر ندارد. در بررسی های انجام شده، با توجه به این که در منابع الکترونیکی تاکنون مطالعه ای در رابطه با اثرات ترمیمی این ماده بر روی ترمیم زخم وجود نداشته است و محدود مطالعات انجام گرفته در مورد آزولن عمدتاً مربوط به اثرات ضد اشعه ماوراء بنفش (Anti UV) و ضد التهابی این ماده می باشد، از این رو در مطالعه حاضر به بررسی اثرات این ماده در تشکیل بافت گرانوله و اپی تلیالیزاسیون در طی ترمیم زخم های ایجاد شده بر روی پوست موش های نژاد BALB/c پرداخته شد (۱۶، ۱۷).

مواد و روش ها

آماده کردن حیوان

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، از ۶۰ سر موش سوری نر بالغ (۲/۵ ماهه) نژاد BALB/c به وزن 25 ± 5 گرم، تهیه شده از مرکز تحقیقات طب تجربی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، استفاده شد. موش ها در قفس های انفرادی تمیز نگهداری شدند به طوری که دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، و درجه حرارت محیط ۲۳-۲۲ درجه

بافت شناسی

نمونه‌های برداشته شده از محل زخم در روزهای مختلف مورد مطالعه، با استفاده از فرمالین تثبیت و پس از انجام مراحل پاساژ بافتی شامل، آب گیری با استفاده از درجات صعودی الکل، شفاف‌سازی توسط گزریل و آغشتگی با پارافین و سپس قالب‌گیری شدند. سپس برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر به صورت سریال سکشن توسط میکروتوم تهیه گردید. پس از پارافین‌زدایی، رنگ‌آمیزی با همتوکسیلین و ائوزین به منظور ارزیابی‌های سلولی، رنگ‌زایی، اپی تلیالیزاسیون و تری کروم ماسون به منظور مشخص شدن وسعت ناحیه بافت گرانوله زخم و دانسته رشته‌های کلاژن انجام شد. تعدادی از برش‌های رنگ‌آمیزی شده با مضرری مشخص، به طوری که تمام زخم را در بر گیرد جهت بررسی انتخاب شدند. از هر لام انتخابی به صورت تصادفی تعدادی عکس توسط میکروسکوپ تحقیقاتی BNM (Euromex-CMEX-10) از ناحیه زخم گرفته شد. نهایتاً شمارش سلول‌ها، تراکم رشته‌های کلاژن، اپی تلیالیزاسیون و اندازه‌گیری وسعت بافت گرانوله توسط نرم‌افزار image انجام گردید (۱۸). تمامی داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری (ANOVA)، تست تعقیبی Tukey و توسط نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۴) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. معیار معنی‌دار بودن تفاوت آماری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه پارامترهای مختلفی مانند میزان تشکیل بافت گرانوله، تعداد فیروبلاست‌ها، میزان رگ‌زایی، تراکم رشته‌های کلاژن ساخته شده و هم‌چنین میزان اپی تلیالیزاسیون در روزهای مختلف مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصله به ترتیب در جداول شماره ۱ تا ۵ آورده شده است.

سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۵۰ درصد در نظر گرفته شد. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد تصویب شده ۴۵۵۱۶۰ و کد اخلاق ir.bums.REC.1396.43 اجرا گردید.

روش ایجاد زخم پوستی

حیوانات با استفاده از کتامین ۷۰ mg/kg و زایلازین ۱۳/۴ mg/kg به صورت تزریق درون صفاقی بیهوش شدند و موهای قسمت پشت ناحیه توراسیک حیوان با استفاده از تیغ تراشیده شد. با استفاده از تیغ جراحی و در شرایط استریل زخمی خطی به طول ۲ سانتی‌متر تا لایه هیپودرم در پوست این ناحیه ایجاد گردید. تصویر برداری از موضع زخم با استفاده از دوربین دیجیتال (Mavica FD91, Sony) به منظور مقایسه ماکروسکوپی وسعت ناحیه زخم در روزهای مختلف انجام گرفت. سپس زخم‌های هر گروه به صورت موضعی با استفاده از کرم تهیه شده دو بار در روز با فاصله زمانی ۱۲ ساعت به مدت ۱۴ روز متوالی از روز ایجاد زخم (روز صفر) پانسمان شدند. در هر یک از روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ تعداد ۳ موش از هر گروه انتخاب و از محل زخم نمونه‌برداری انجام شد (۱۸). موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند، دو گروه درمان، گروه اول کرم حاوی آزولن ۱ درصد و گروه دوم کرم حاوی آزولن ۲ درصد را دریافت نمودند. گروه سوم به عنوان کنترل منفی با پایه کرم (اسرین) و گروه چهارم به عنوان کنترل مثبت با نیترو فورازون ۰/۰۲ درصد درمان شدند. گروه پنجم، شم‌هیچ درمانی دریافت نکردند. تهیه ماده واکنش دهنده برای انجام این مطالعه پودر آزولن (کد: ۸۲۰۱۱۹) از شرکت سیگما خریداری شد و کرم‌ها به صورت روزانه تهیه و در شرایط استریل درون محفظه‌های جداگانه و تاریک نگهداری گردید. کرم‌های حاوی آزولن ۱ و ۲ درصد به ترتیب از ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم آزولن به صورت محلول در اسرین تشکیل شدند (۱۹).

جدول شماره ۱: تأثیر استعمال موضعی پماد آژولن بر روند گرانولیشن در گروه های مورد مطالعه

پارامتر	روز های مورد مطالعه	تجربی ۱ (آژولن ۱ درصد)	تجربی ۲ (آژولن ۲ درصد)	کنترل مثبت (نیتروفرزولان)	کنترل منفی (اسرین)	شم
		(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)
گرانولیشن	۷	* $1315/3 \pm 354/5$	* $1491/5 \pm 256/3$	$1222 \pm 255/2$	$1118/2 \pm 305/1$	$1164/6 \pm 254/8$
	۱۰	* $1683/3 \pm 325$	* $1814/1 \pm 328$	* $1443/3 \pm 224/9$	$1370/7 \pm 184/6$	$1158/8 \pm 367$
	۱۴	* $1476/6 \pm 243/5$	* $1643/1 \pm 185/9$	* 1341 ± 186	$1266/5 \pm 186$	$1097/6 \pm 221/5$

*: نشان دهنده افزایش معنی دار در وسعت بافت گرانوله (mm2) در گروه تیمار نسبت به گروه شم (بدون درمان) می باشد ($p < 0/05$).

جدول شماره ۲: تأثیر استعمال موضعی پماد آژولن بر تکثیر سلول های فیروبلست در گروه های مورد مطالعه

پارامتر	روز	آژولن ۱ درصد	آژولن ۲ درصد	نیتروفرزولان	اسرین	شم
		(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)
سلول های فیروبلست	۷	$11/90 \pm 2/42^*$	$12/30 \pm 2/26^*$	$11/90 \pm 1/91^*$	$9/20 \pm 1/08$	$8/20 \pm 2/14$
	۱۰	$30/30 \pm 5/77^*$	$34/50 \pm 7/13^*$	$27/10 \pm 5/59$	$19/20 \pm 3/88$	$13/10 \pm 3/66$
	۱۴	$18/60 \pm 3/53^*$	$19/60 \pm 3/59^*$	$15/90 \pm 3/47^*$	$12/10 \pm 1/44$	$11/60 \pm 2/63$

*: نشان دهنده افزایش معنی دار سلول های فیروبلست (تعداد بر μm^2) در گروه تیمار نسبت به گروه شم (بدون درمان) می باشد ($p < 0/05$).

جدول شماره ۳: تأثیر استعمال موضعی پماد آژولن بر میزان رگ زایی در گروه های مورد مطالعه

پارامتر	روز	آژولن ۱ درصد	آژولن ۲ درصد	نیتروفرزولان	اسرین	شم
		(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)
رگ زایی	۷	$11/90 \pm 1/88^*$	$14/10 \pm 1/79^*$	$11/30 \pm 2/58^*$	$9/20 \pm 1/54$	$8/10 \pm 1/66$
	۱۰	$9 \pm 2/35^*$	$10/40 \pm 1/71^*$	$8 \pm 2/4$	$5/90 \pm 2/07$	$4/50 \pm 1/77$
	۱۴	$6/90 \pm 2/13^*$	$7/40 \pm 2/01^*$	$5/80 \pm 1/13^*$	$4 \pm 1/24$	$3/30 \pm 1/63$

*: نشان دهنده افزایش معنی دار میزان رگ زایی (تعداد بر μm^2) در گروه تیمار نسبت به گروه شم (بدون درمان) می باشد ($p < 0/05$).

جدول شماره ۴: تأثیر استعمال موضعی پماد آژولن بر سنتز رشته های کلاژن در گروه های مورد مطالعه

پارامتر	روز	آژولن ۱ درصد	آژولن ۲ درصد	نیتروفرزولان	اسرین	شم
		(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)
دانشیه رشته های کلاژن	۱۰	* $0/308 \pm 0/022$	* $0/330 \pm 0/016$	* $0/294 \pm 0/014$	* $0/255 \pm 0/012$	* $0/244 \pm 0/015$
	۱۴	* $0/543 \pm 0/036$	* $0/566 \pm 0/022$	* $0/538 \pm 0/033$	* $0/495 \pm 0/029$	* $0/465 \pm 0/021$

*: نشان دهنده افزایش معنی دار کلاژن سازی در گروه تیمار نسبت به گروه شم (بدون درمان) می باشد ($p < 0/05$).

جدول شماره ۵: تأثیر استعمال موضعی پماد آژولن بر روند اپی تلایزاسیون در گروه های مورد مطالعه

پارامتر	روز	آژولن ۱ درصد	آژولن ۲ درصد	نیتروفرزولان	اسرین	شم
		(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)	(انحراف معیار $\pm$ میانگین)
اپی تلایزاسیون	۱۰	$118/69 \pm 20/29^*$	$124/93 \pm 18/55^*$	$105/77 \pm 22/91^*$	$84/08 \pm 20/01$	$78/23 \pm 12/41$
	۱۴	$149/19 \pm 47/46^*$	$169/73 \pm 29/49^*$	$147/80 \pm 40/45^*$	$90/17 \pm 20/04$	$81/49 \pm 22/59$

*: نشان دهنده افزایش معنی دار میزان اپی تلایزاسیون (μm) در گروه تیمار نسبت به گروه شم (بدون درمان) می باشد ($p < 0/05$).

بررسی پارامترها در روز ۴

در روز چهارم مطالعه بافت گرانوله در هیچ کدام از گروه ها تشکیل نشده و سایر پارامترهای مورد نظر نیز قابل بررسی نبودند. پوشش اپی تلایال در دو طرف زخم بیش تر از اندازه معمول، از یکدیگر فاصله داشتند و سطح زخم پوشیده از فیبرین بود.

بررسی پارامترها در روز ۷

میزان بافت گرانوله در گروه های تجربی ۱ و ۲ (تحت درمان با کرم حاوی آژولن ۱ درصد و ۲ درصد) نسبت به گروه های کنترل منفی ($p < 0/05$) و شم ($p < 0/01$)، تعداد فیروبلست ها به ترتیب در سطح ($p < 0/05$) و $p < 0/01$ و میانگین میزان رگ زایی در سطح ($p < 0/05$)

بحث

استفاده موضعی آزولن می تواند اثرات مثبتی بر ترمیم زخم های پوستی داشته باشد. این یافته ها نشان دادند که آزولن می تواند باعث افزایش میزان تشکیل بافت گرانوله در روزهای ۷، ۱۰ و ۱۴ در گروه های تحت درمان نسبت به گروه های کنترل منفی و شم گردد و همچنین میزان اپی تللیالیزاسیون را وسعت بخشیده و از این رو سرعت ترمیم را تسریع نماید. التیام زخم پدیده ای پویا و پیچیده است و حاصل تعامل بین انواع مختلف سلول ها، مولکول ها و ماتریکس خارج سلولی می باشد. فرایند ترمیم زخم مجموعه ای از واکنش های متوالی است که در زمان های مشخصی با یکدیگر همپوشانی دارند. بهبود زخم یک پاسخ دینامیک به آسیب بوده که تقریباً بلافاصله پس از آسیب پوست آغاز شده و ممکن است تا مدت ها ادامه یابد (۲۰). یکی از مهم ترین فرایندهای مهم در روند ترمیم زخم، تشکیل بافت گرانوله است. بافت گرانوله ۳ که در تولید پروتئوگلیکان و کلاژن تیپ ۳ دخالت تا ۵ روز بعد از ایجاد زخم تشکیل می شود و شامل یک بافت همبند پر عروق به همراه فیروبلاست هایی است می کنند (۲۱). هر ماده ای که بتواند در سرعت و وسعت تشکیل این بافت تاثیر بگذارد، می تواند بر سرعت ترمیم زخم نیز اثر بگذارد. آزولن ماده ای است که در چندین گیاه مختلف به خصوص در بابونه آلمانی و بومادران وجود دارد (۲۲، ۱۳). مطالعات مختلف نشان داده اند که آزولن و مشتقات آن خواص مهمی در اقدامات دارویی و درمانی، از جمله، جلوگیری از زخم دئودنوم، داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی، مهارکننده TXA2 (ترومبوکسان A2)، ضد اسپاسم و ضد التهاب را دارند (۲۴، ۲۳، ۱۳). اکثر مطالعات به اثرات ضد التهابی این ماده و ترکیبات مشتق شده از آن متمرکز شده اند (۱۴). در مطالعه ای که به روی ۶ نفر افراد سالم و داوطلب در رابطه با مقایسه اثرات ضد التهابی آزولن و کرم هیدروکورتیزون صورت گرفت، مشخص گردید که اثرات ضد التهابی آزولن را می توان در حد هیدروکورتیزون

افزایش معنی داری نشان داد. اختلاف میانگین وسعت بافت گرانوله، تعداد سلول های فیروبلاست و میزان آنژیوژنز در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به هم و همچنین نسبت به گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نیتروفرورازون) افزایش معنی داری نشان ندادند.

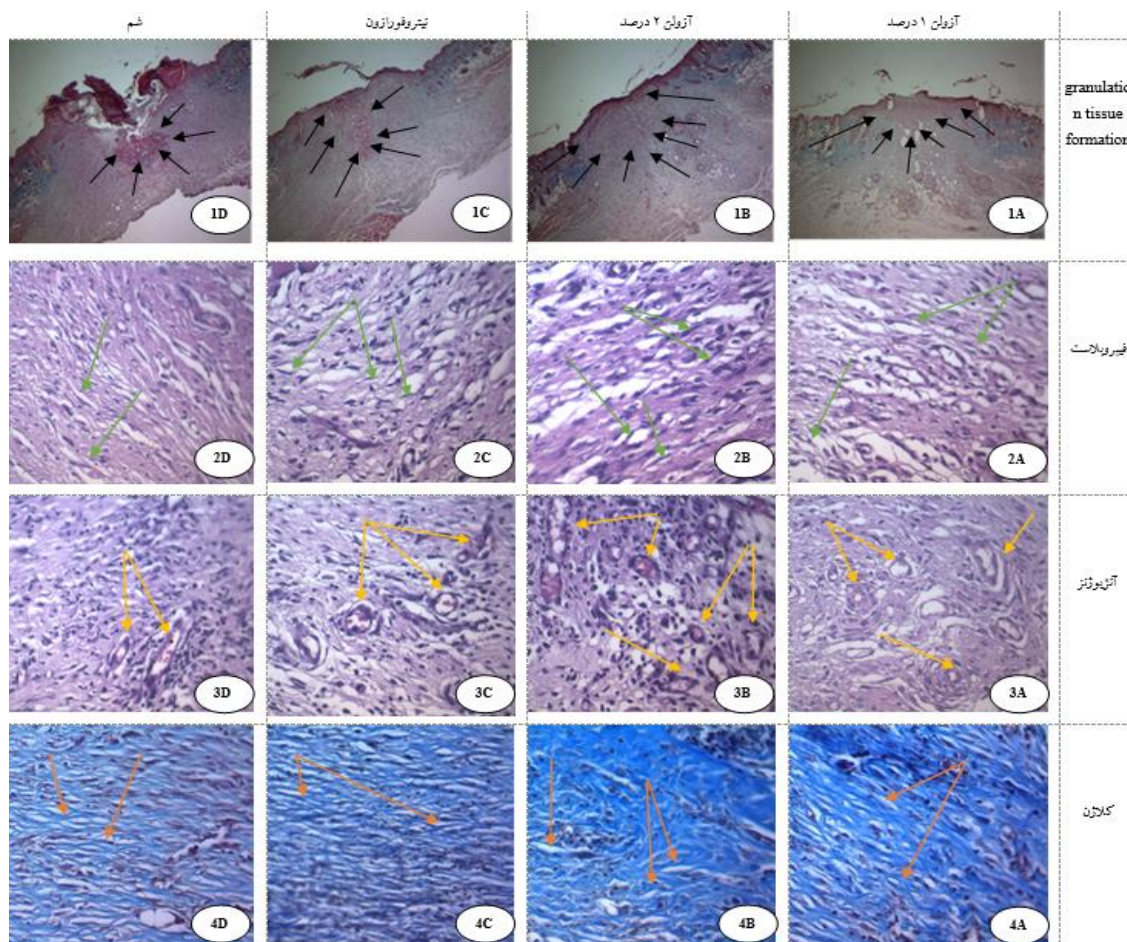
بررسی شاخص ها در روز ۱۰

وسعت بافت گرانوله در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به هر سه گروه کنترل، منفی، مثبت و شم در سطح ($p < 0/05$) افزایش معنی داری نشان داد. بعلاوه تعداد فیروبلاست ها، میانگین میزان رگزایی و دانسیته کل رشته های کلاژن نیز در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه های کنترل منفی و شم ($p < 0/05$) افزایش معنی داری داشتند.

تعداد فیرو بلاست ها و میزان آنژیوژنز در هر دو گروه تجربی نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش معنی داری نشان نداد، در حالی که مقایسه میانگین دانسیته رشته های کلاژن در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش معنی داری مشاهده شد ($p < 0/05$). اما مقایسه این پارامتر در گروه تجربی ۱ نسبت به کنترل مثبت افزایش معنی داری نداشت ($p = 0/62$). در این روز میانگین اپی تللیالیزاسیون در گروه های تجربی ۱ و ۲ در مقایسه با گروه های کنترل منفی، شم و کنترل مثبت افزایش معنی داری نشان داد ($p < 0/05$) (تصویر شماره ۱).

بررسی شاخص ها در روز ۱۴

میانگین وسعت بافت گرانوله، تعداد فیروبلاست ها، میزان رگزایی و میانگین دانسیته رشته های کلاژن در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه های کنترل منفی و شم در سطح ($p > 0/05$) افزایش معنی داری نشان دادند در حالی که تمام این پارامترها نسبت به گروه کنترل مثبت معنی دار نبودند. میزان اپی تللیالیزاسیون نیز در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به تمام گروه های کنترل افزایش معنی داری ($p < 0/05$) نشان داد.



تصویر شماره ۱: 1A (آزولن ۱ درصد)، 1B (آزولن ۲ درصد)، 1C (گروه نیتروفورازون)، 1D (گروه شم)، وسعت بافت گرانوله ($3/20.4 \pm 2/4 \text{ mm}^2$) در روز ۱۰ با بزرگنمایی $40 \times$ و رنگ آمیزی تری کروم ماسون (فلش های مشکی رنگ)
 2A (آزولن ۱ درصد)، 2B (آزولن ۲ درصد)، 2C (گروه نیتروفورازون)، 2D (گروه شم)، تعداد سلول های فیبروبلاست در روز ۱۰ با بزرگنمایی $400 \times$ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین وائوزین (فلش های سبز رنگ)
 3A (آزولن ۱ درصد)، 3B (آزولن ۲ درصد)، 3C (گروه نیتروفورازون)، 3D (گروه شم)، میزان آنژیوژنز در روز ۱۰ با بزرگنمایی $400 \times$ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین وائوزین (فلش های زرد رنگ)
 4A (آزولن ۱ درصد)، 4B (آزولن ۲ درصد)، 4C (گروه نیتروفورازون)، 4D (گروه شم)، دانسیته رشته های کلاژن در روز ۱۰ با بزرگنمایی $400 \times$ و رنگ آمیزی تری کروم ماسون (فلش های نارنجی رنگ)

در نظر گرفت (۱۶). در مطالعه حاضر مشخص گردید که آزولن می تواند با تاثیر بر گسترش بافت گرانوله روند التیام زخم را تسریع نماید.

مطالعاتی در این رابطه وجود دارند که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارند. در مطالعه shivananda و همکاران در سال ۲۰۰۷، در رابطه با اثرات عصاره بابونه در ترمیم زخم پوستی رت ها مشخص گردید که اضافه کردن عصاره آبی گیاه بابونه به آب آشامیدنی رت ها می تواند با

افزایش میزان بافت گرانوله و تسریع روند اپی تلیالیزاسیون سرعت ترمیم زخم را تسریع نماید (۲۵). در یک گزارش موردی که توسط karokawa و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام پذیرفت، اثر مثبت آزولن بر روی یک زخم عمیق پای چپ یک بیمار که در طی مسیر درمان از یک پماد موضعی آزولن و بتامتازون استفاده گردید، گزارش شد (۲۶). در یک بررسی کلی انجام شده در سال ۲۰۱۱ توسط Atodiresei مشخص گردید که بابونه و ترکیبات اصلی

آن یعنی آژولن و کامازولن متابولیسم پوست را نرمال نموده و باعث فعال شدن تشکیل بافت گرانوله و اپی تلیالیزاسیون بعد از زخم سوختگی می شوند (۲۷).

در مطالعه Longo R و همکاران در سال ۲۰۱۱، که به بررسی اثر بابونه بر ترمیم زخم دهانی رت‌ها پرداختند، نتایج در روز ۱۰ نشان داد میزان اپی تلیالیزاسیون در گروه دریافت کننده عصاره بابونه نسبت به گروه کنترل بیش تر بوده است (۲۸).

در یک مطالعه مروری که در سال ۲۰۱۰ توسط Vikas gupta انجام شد، پتانسیل فارماکولوژیک عصاره بابونه از جهت درمان سوختگی بررسی گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که آژولن و کامازولن دو ترکیب اصلی عصاره بابونه هستند. در این مطالعه گزارش گردید که عصاره بابونه به شکل روغن، پتانسیل خوبی جهت تسریع درمان زخم سوختگی در رت‌ها دارد و به صورت موضعی نیز در بهبود زخم خطی در موش‌های صحرایی نسبت به کورتیکواستروئیدها مؤثرتر می باشد (۲۹).

تمامی این تحقیقات و نتایج مطالعه حاضر نشان از این دارد که ماده آژولن به عنوان یک ترکیب مؤثر در عصاره بابونه می تواند اثرات درمانی بسیار خوبی بر روند گرانولاسیون ترمیم زخم داشته باشد. با توجه به این که تشکیل بافت گرانوله یک پدیده بسیار مهم و کلیدی در روند ترمیم زخم می باشد و تغییرات ایجاد شده روی این بافت سرنوشت ترمیم زخم را تعیین می کند، ما در بخشی از مطالعه حاضر به یکی از مهمترین اجزاء سازنده بافت گرانوله یعنی فیبرو بلاست‌ها پرداختیم. فیبرو بلاست‌ها یکی از مهم ترین سلول‌های دخیل در تشکیل بافت گرانوله می باشند و در تولید ماده خارج سلولی (Extra Cellular Matix) بافت گرانوله نقش اساسی بر عهده دارند. یکی از مهم ترین یافته‌های مطالعه حاضر اثر افزایشی تعداد سلول‌های فیبروبلاست و به دنبال آن سنتز رشته‌های کلاژن در گروه‌های درمانی آژولن نسبت به گروه‌های کنترل بوده است. بررسی مقالات در این رابطه نشان می دهد که مطالعاتی محدود در این رابطه

وجود دارد که با مطالعه ما همخوانی داشته و این تأثیر را تایید می نمایند.

مطالعه‌ای توسط Manomion و همکاران در سال ۲۰۱۱ در رابطه با اثرات ضد التهابی ترکیبات مختلف آژولن بر روی فیبروبلاست‌های لثه انسان (Human Gingival Fibroblast) انجام شده است. نتایج این مطالعه نشان می دهد که ترکیبات مربوط به آژولن با تحریک تولید فیبروبلاست‌های لثه باعث کاهش تولید عوامل التهابی ($IL-1\beta$) می شوند (۱۵).

در مطالعه‌ای که Jun-Ichiueki و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر آنتی UV و تسکین دهنده ترکیبات مشتق شده از آژولن را مورد بررسی قرار دادند، ترکیبات مربوط به آژولن شامل، Benzo[b]cyclohepta[e][1,4]thiazine، 6,8-dibromobenzo[b]cyclohepta[e][1,4]thiazine، benzo[b]cyclohept[e][1,4]oxazin-6(11H)-one، 3-ethyl-1-، 3-methyl-1-trichloroacetylazulene trichloroacetylazulene بوده است. نتایج این مطالعه نشان داد ترکیبات مربوط به آژولن، فیبروبلاست‌های لثه و دندان را تحریک می کنند اما بر روی سلول‌های تومورال استخراج شده از دهان و دندان اثری ندارند (۳۰).

در مطالعه ای دیگر، اثر سمیت سلولی برخی ترکیبات آژولن از جمله guaiazulene بر روی فاکتور رشد هپاتوسیتی (Hepatocyte growth factor = HGF) و تأثیر پرتو نور UV بر این سمیت را بررسی نمودند. این مطالعه نشان داد، ترکیب guaiazulene guaiazulene در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول روی بقای فیبروبلاست‌ها در محیط کشت اثر گذاشته و با افزایش دوز باعث کاهش آن‌ها می شود. در این بررسی که توسط Fiori و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت، مشخص گردید که تابش پرتو UV به محیط کشت می تواند سمیت سلولی این ماده را کم نماید و در نتیجه تحت تأثیر پرتو UV می توان اثرات سمی guaiazulene بر روی سلول‌های HGF را کنترل نمود (۳۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آژولن اثرات بسیار

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل برخی یافته‌های مربوط به پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد تشریح می‌باشد و بدین وسیله از مساعدت معاونت پژوهشی به خاطر تامین هزینه مطالعه و پرسنل مرکز تحقیقات طب تجربی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند که در اجرای این طرح پژوهشی همکاری لازم را داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

مثبتی در مسیر ترمیم زخم‌های پوستی از طریق افزایش شکل‌گیری بافت گرانوله دارد. آزولن می‌تواند بر تکثیر سلول‌های فیبرو بلاست تشکیل‌دهنده بافت گرانوله و به دنبال آن سنتز رشته‌های کلاژن و همین‌طور بازسازی اپی‌تلیوم تاثیر بگذارد. مطالعات دقیق تری در رابطه با شناخت مکانیزم‌های احتمالی و همین‌طور استفاده از آزولن در آزمایشات تجربی مداخله‌ای بر روی انسان می‌تواند در راستای دست‌آوردهای این مطالعه شکل بگیرد.

References

1. Stenn KS, Goldenhersh MA, Trepeta RW. Structure and functions of the skin. *The Skin* 1992; 9(1): 1-14.
2. Afshar M, Vafaei-Nezhad S, Shadi M, Ghaderi R. The important herbal plants of Iranian flora on burn healing. *J Gorgan Univ Med Sci* 2017; 19(3): 1-14 (Persian).
3. Zaidi Z, Lanigan SW. *Dermatology in Clinical Practice*. London: Springer; 2010.
4. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25(1): 9-18.
5. Young A, McNaught C-E. *The physiology of wound healing*. Surgery (Oxford) 2011; 29(10): 475-479.
6. Hanafi N, Shahani S, Enayatifard R, Talebpour Amiri F, Ghasemi M, Karimpour AA. Licorice cream promotes full-thickness wound healing in Guinea pigs. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2018; 22(3): 411-421.
7. Afshar M, Ravarian B, Zardast M, Moallem SA, Fard MH, Valavi M. Evaluation of cutaneous wound healing activity of *Malva sylvestris* aqueous extract in BALB/c mice. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(6): 616-622 (Persian).
8. Afshar M, Ghaderi R, Zardast M, Delshad P. Effects of topical emu oil on burn wounds in the skin of Balb/c mice. *Dermatol Res Pract* 2016; 2016.
9. Nasiry Zarrin Ghabaee D, Ebrahimzadeh MA, Akbari J, Talebpour Amiri F. Wound healing activity of *Sambucus ebulus*. *Int J Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2017; 8(1): 132-135.
10. Ghosh PK, Gaba A. Phyto-extracts in wound healing. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2013; 16(5): 760-820.
11. Astin JA, Pelletier KR, Marie A, Haskell WL. Complementary and alternative medicine use among elderly persons: one-year analysis of a Blue Shield Medicare supplement. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000; 55(1): M4-M9.
12. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: a herbal medicine of the past with a bright future. *Mol Med Rep* 2010; 3(6): 895-901.
13. Wang L, Yan J, Fu PP, Parekh KA, Yu H. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2003; 530(1-2): 19-26.
14. Ogata J, Minami K, Horishita T, Shiraishi M, Okamoto T, Terada T, et al. Gargling with sodium azulene sulfonate reduces the

- postoperative sore throat after intubation of the trachea. *Anesth Analg* 2005; 101(1): 290-293.
15. Ono M, Kantoh K, Ueki J, Shimada A, Wakabayashi H, Matsuta T, et al. Quest for anti-inflammatory substances using IL-1 β -stimulated gingival fibroblasts. *In Vivo* 2011; 25(5): 763-768.
 16. Guarrera M, Turbino L, Rebora A. The anti inflammatory activity of azulene. *J EADV* 2001; 15(5): 486-487.
 17. Ueki J-I, Sakagami H, Wakabayashi H. Anti-UV activity of newly-synthesized water-soluble azulenes. *In Vivo* 2013; 27(1): 119-126.
 18. Afshar M, Hassanzadeh-Taheri M, Zardast M, Ayati S, Shadi M. Effect of topical application of *Plantago Major* alcoholic extract on excisional wound healing in BABL/c mice. *Pharmacophore* 2017; 8(6S): 1733-1741.
 19. Andersen FA. Final report on the safety assessment of azulene. *Int J Toxicol* 1999; 18(suppl:3): 27-32.
 20. Kaplan B, Gönül B, Dinçer S, Kaya FN, Babül A. Relationships between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline, and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing. *Surg Today* 2004; 34(9):747-451.
 21. Jones K. Fibrotic Response to Biomaterials and all Associated Sequence of Fibrosis. *Host Response to Biomaterials: Elsevier*; 2015; 189-237.
 22. Sizova NV. Composition and antioxidant activity of essential oils containing azulene derivatives. *Pharm Chem J* 2012; 46(6): 369-371.
 23. Ikegai K, Imamura M, Suzuki T, Nakanishi K, Murakami T, Kurosaki E, et al. Synthesis and biological evaluation of C-glucosides with azulene rings as selective SGLT2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus: discovery of YM543. *Bioorg Med Chem* 2013; 21(13): 3934-3948.
 24. Tomiyama T, Yokota M, Wakabayashi S, Kosakai K, Yanagisawa T. Design, synthesis, and pharmacology of 3-substituted sodium azulene-1-sulfonates and related compounds: non-prostanoid thromboxane A2 receptor antagonists. *J Med Chem* 1993; 36(7): 791-800.
 25. Nayak BS, Raju SS, Rao AV. Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. *J Wound Care* 2007; 16(7): 298-302.
 26. Kurokawa I, Hayami J, Kita Y. A therapy-Resistant chronic leg ulcer treated successfully with topical basic fibroblast growth factor. *J Int Med Res* 2003; 31(2): 149-151.
 27. Atodiresei GV. Botanical resources of spontaneous and cultivated flora, with applications in the cosmetics industry. *Agronomy Series of Scientific Research/ Lucrari Stiintifice Seria Agronomie* 2011; 54(1): 94-97.
 28. Duarte CM, Quirino MR, Patrocínio MC, Anbinder AL. Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16(6): 716-721.
 29. Gupta V, Mittal P, Bansal P, Khokra SL, Kaushik D. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *Int J Pharm Sci Drug Res* 2010; 2(1): 12-16.
 30. Ueki J, Shimada A, Sakagami H, Wakabayashi H. Hormetic and UV-protective effects of azulene-related compounds. *In Vivo* 2011; 25(1): 41-48.
 31. Fiori J, Teti G, Gotti R, Mazzotti G, Falconi M. Cytotoxic activity of guaiazulene on gingival fibroblasts and the influence of light exposure on guaiazulene-induced cell death. *Toxicol In Vitro* 2011; 25(1): 64-72.