

Stereological and Molecular Studies on the Effects of Echinopsis chamaecereus Extract on Wound Healing in Rats

Faezeh Modanloo¹,
Fatemeh Modanloo¹,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh²,
Davood Nasiry³

¹ BSc Student in Nursing, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Amol Faculty of Paramedicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 28, 2022 ; Accepted August 20, 2022)

Abstract

Background and purpose: Effective medicines, especially herbal products, have received a lot of interest in recent years. The purpose of this study was to investigate the wound healing effect of *Echinopsis chamaecereus* extract ointment that has high antioxidant power in the healing of full-thickness skin wounds in rats.

Materials and methods: In this experimental study, 50 male rats were randomly divided into 5 groups, including control, Vaseline, *E. chamaecereus* 2% ointment, *E. chamaecereus* 5% ointment, and Madecassol ointment. There were full-thickness skin wounds in all groups. Percentage of wound closure, collagen density, tissue volume, number of cells, expression of proliferative and inflammatory genes, and cell proliferation were investigated in all groups.

Results: The wound closure rate, new epidermis and dermis volume, total density of fibroblast and epidermal basal cells, collagen deposition, cell proliferation, and expression of TGF- β gene significantly increased in the extract treated groups, especially in the group treated with *E. chamaecereus* 5% ointment compared with the control group and Vaseline group ($P < 0.05$). Furthermore, a significant decrease was seen in the expression of inflammatory genes (TNF- α and IL-1 β) in the extract treated groups, especially in *E. chamaecereus* 5% ointment group compared with the control group and Vaseline group ($P < 0.05$).

Conclusion: The extract of *Echinopsis chamaecereus*, especially at 5%, had a greater effect on the healing process of acute wounds than other groups examined in this study.

Keywords: acute wound, wound healing, *Echinopsis chamaecereus*

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (213): 1-14 (Persian).

Corresponding Author: Davood Nasiry - Amol Faculty of Paramedicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: davood1990nasiry@gmail.com)

ارزیابی استریولوژیکی و مولکولی پماد عصاره کاکتوس بند انگشتی (*Echinopsis chamaecereus*) بر ترمیم زخم تمام ضخامت پوستی در موش صحرایی

فائزه مدانلو¹فاطمه مدانلو¹محمدعلی ابراهیم زاده²داود نصیری³

چکیده

سابقه و هدف: شناخت داروهای ارزان و موثر به خصوص فرآورده‌های گیاهی در سال‌های اخیر با اقبال بسیاری در حوزه پزشکی همراه بوده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ترمیم زخم پماد عصاره کاکتوس بند انگشتی، به عنوان ترکیبی با توان آنتی اکسیدانتی بالا، در ترمیم زخم تمام ضخامت پوستی در موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر 50 سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به 5 گروه بدون درمان (کنترل)، تیمار شده با وازلین، تیمار شده با پماد 2 درصد، تیمار شده با پماد 5 درصد و تیمار شده با پماد Madecassol تقسیم شدند. زخم در تمامی گروه‌ها تمام ضخامت پوستی بود. ارزیابی‌ها شامل درصد جمع شدن وسعت زخم، میزان تراکم کلاژن، حجم بافت، تعیین تعداد سلول‌ها، میزان بیان ژن‌های تکثیری و التهابی و نیز بررسی تکثیر سلولی بود.

یافته‌ها: سرعت ترمیم، حجم اپیدرم و درم، تراکم کلاژن، تراکم عروق خونی، تراکم سلول‌ها، تکثیر سلولی و نیز بیان ژن تکثیری TGF- β در گروه‌های دریافت کننده عصاره به خصوص گروه پماد 5 درصد افزایش معنی داری در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین داشت ($P<0/05$). در خصوص التهاب، کاهش معنی داری در میزان بیان ژن‌های التهابی (TNF- α و IL-1 β) در گروه‌های دریافت کننده عصاره به خصوص گروه پماد 5 درصد نسبت به گروه‌های کنترل و وازلین مشاهده شد ($P<0/05$).

استنتاج: عصاره کاکتوس بند انگشتی به خصوص در غلظت 5 درصد اثر بهتری در روند بهبودی زخم حاد نسبت به سایر گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه داشته است.

واژه های کلیدی: زخم حاد، ترمیم زخم، کاکتوس بند انگشتی

مقدمه

سلول‌ها، تشکیل بافت گرانوله و انقباض زخم می‌باشد (1). این فرآیندها نیازمند یک تعامل هماهنگ بین سلول‌های التهابی، فیبروبلاست، کراتینوسیت‌ها، واسطه‌های

ترمیم زخم توالی فرآیندهای بیولوژیکی تنظیم شده شامل: التهاب، فیبروبلازی، آنژیوژنز، تشکیل رشته‌های جدید کلاژن، اپی تلیالیزاسیون، مهاجرت انواع مختلف

E-mail: davood1990nasiry@gmail.com

مؤلف مسئول: داود نصیری - آمل: دانشکده پیراپزشکی

1. دانشجوی کارشناسی پرستاری، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استادیار علوم تشریح، دانشکده پیراپزشکی آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1401/4/7 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/4/26 تاریخ تصویب: 1401/5/29

ضخامت در موش صحرایی استفاده شد تا با ارائه نتایج آن به مراکز دارویی معتبر، زمینه مطالعات وسیع تر این گیاه فراهم شده و نهایتاً فرم دارویی موثر آن در دسترس عموم قرار بگیرد.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه

گیاه کاکتوس بند انگشتی (*Echinopsis chamaecereus*) از منطقه جویبار توسط دکترای سیستماتیک گیاهی (دکتر بهمن اسلامی) جمع آوری و تایید شد. نمونه هرباریومی در دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر (به شماره هرباریومی 1481) نگهداری می شود.

تهیه عصاره به روش خیساندن

در این روش 50 گرم از پودر اندام هوایی گیاه با 120 میلی لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت 24 ساعت رها شد. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً متانول جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز سوم، مجموعه حلال ها توسط دستگاه روتاری (تبخیرکننده چرخان) در دمای 36 درجه حذف شد. سپس عصاره به دست آمده به روش انجمادی خشک شد تا کاملاً به پودر تبدیل شود. عصاره با رانداکمان 10/5 درصد به دست آمد.

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد. غلظت 1 mg/ml از عصاره تهیه شد. مقدار 0/5 میلی لیتر از عصاره با 2/5 میلی لیتر واکنشگر 0/2 نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و به مدت 5 دقیقه هم زده شد. سپس 2 میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت 75 گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه ها پس از 2 ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در 760 نانومتر اندازه گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید

بیوشیمیایی و مولکول های ماتریکس خارج سلولی می باشد (2). درمان زخم و مراقبت از آن جهت افزایش سرعت بهبود و هم چنین جلوگیری از مزمن شدن و عفونت آن همواره مدنظر انسان بوده است (3). امروزه کاهش عوارض ترمیم زخم و افزایش سرعت بهبود آن، نظر محققان زیادی را به خود جلب کرده است. در این میان داروهای ارزان قیمت که در دسترس باشند به خصوص فرآورده های گیاهی با اقبال عمومی بیش تری مواجه شده اند (4-6). در کشورهای مانند هندوستان و چین که طب سنتی از سابقه ای دیرینه برخوردار است، اطلاعات مهمی در زمینه استفاده از بسیاری از گیاهان ناشناخته در درمان زخم ها وجود دارد (7). بنابراین رویکرد بر مواد طبیعی برای تولید داروهای جدید که موثرتر، قوی تر و سازگارتر با بدن موجودات زنده است و عوارض کم تری دارد، در دستور کار محققین علوم دارویی و طب انسانی قرار گرفته است (8-10). یکی از این ترکیبات، کاکتوس بند انگشتی با نام علمی *Echinopsis chamaecereus* می باشد که در اکثر مناطق کشور بخصوص استان های شمالی یافت می شود (11، 12). ترکیبات شیمیایی این گیاه شناسایی نشده اما مردم ساکن استان مازندران، سال هاست که به صورت تجربی از این گیاه به صورت مختلف از قبیل جوشانده، خوراکی، بخور و ضماد در درمان بیماری های مختلف از جمله التهاب، رفع نفخ، درمان دیابت و ترمیم زخم و... استفاده می کنند (12). با توجه به جستجوهای انجام شده، تا کنون مطالعه ای که به بررسی خواص متعدد این گیاه در قالب فرآیند علمی بپردازد، یافت نشد، بنابراین به نظر می رسد عمده خاصیت های آن به صورت ناشناخته باقی مانده است. در غربالگری در مطالعات گیاهی به دنبال یافتن و کشف یک فرآورده گیاهی با قابلیت التیام بخشی هستیم. در این مسیر گیاهانی که هیچ یافته ای ندارند را در غربالگری خود استفاده می کنیم. بنابراین در مطالعه حاضر برای نخستین بار از این گیاه به منظور بررسی اثر خاصیت ضد التهابی و تاثیر آن در ترمیم زخم تمام

گالیک بیان شد. میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت 1 میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد. مقدار 0/5 میلی لیتر از نمونه در 1/5 میلی لیتر متانول حل شد. مقدار 0/1 میلی لیتر آلومینیوم کلراید در صد 10 به آن اضافه شد، سپس 0/1 میلی لیتر از محلول پتاسیم استات 1 مولار و در نهایت 2/8 میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و در نهایت جذب مخلوط حاصل در طول موج 415 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی - ماوراءبنفش اندازه گیری شد. کوثرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوثرستین در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات 3 بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش شد (14، 13).

تهیه پماد و تجویز آن

به منظور تهیه پماد، از پایه دارویی وازلین در دو غلظت 2 و 5 درصد استفاده شد. روش تیمار در گروه‌های دریافت کننده پماد نیز به صورت روزانه یک مرتبه به مدت 17 روز (بازه مطالعه) پس از ایجاد زخم بود که در محل زخم تجویز پماد صورت می گرفت.

روش مطالعه و حیوانات مورد استفاده

در مطالعه تجربی حاضر از 50 سر موش صحرایی نر بالغ، نژاد ویستار با سن حدود 8 هفته و با میانگین وزنی 250 گرم استفاده شد. همه موش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در تمامی موش‌ها زخم ایجاد شد و در 5 گروه 10 عددی تقسیم شدند که شامل زخم بدون درمان (گروه کنترل)، زخم تیمار شده با ترکیب پایه دارویی (گروه وازلین)، زخم تیمار شده با پماد 2 درصد کاکتوس بند انگشتی (گروه پماد 2 درصد)، زخم تیمار شده با پماد 5 درصد کاکتوس

بند انگشتی (گروه پماد 5 درصد) و زخم تیمار شده با پماد Madecassol (گروه Madecassol) بودند. در دو بازه زمانی روزهای 7 و 17 تعداد 5 موش از هر گروه به ترتیب جهت ارزیابی‌های مولکولی و ایمونوهیستوشیمیایی و نیز بافتی نمونه گیری شدند (15).

روش ایجاد زخم

پس از القاء بیهوشی بوسیله کتامین به میزان mg/kg 50 و زایلازین به میزان mg/kg 5، موی پوست قسمت پشت گردن موش‌ها تراشیده و ضد عفونی شدند. در تمامی موش‌های مورد مطالعه، از پانچ استاندارد با قطر داخلی 15 mm استفاده شد که در محل زخم قرار داده و پوست ناحیه با ضخامت کامل که شامل اپیدرم و درم بود به نحوی که عضلات زیرین و فاسیای روی آن مشخص بود، برداشته شد (16).

ارزیابی ماکروسکوپی بهبود زخم

اندازه گیری درصد جمع شدگی زخم (Wound closure rate) در روزهای صفر، 7، 10 و 17 پس از ایجاد زخم با تصویربرداری از موضع زخم و محاسبه مساحت آن انجام شد. درصد بهبودی زخم با فرمول زیر محاسبه شد (6):

$$\text{درصد جمع شدگی زخم} = \frac{A_0 - A_n}{A_0} \times 100$$

A_0 : مساحت زخم در روز صفر؛

A_n : مساحت زخم در روزهای مورد بررسی

ارزیابی‌های بافت زخم

در این مرحله آزمون‌های بافت شناسی و مولکولی جهت بررسی پوست ناحیه ترمیم در دو بازه زمانی روزهای 7 و 17 انجام شد (15، 17). در مطالعه حاضر از هر گروه 10 عددی، در روز هفتم، تعداد 5 موش به منظور بررسی‌های مولکولی و ایمونوهیستوشیمیایی و در روز 17، پنج موش دیگر جهت بررسی بافتی (استریولوژیکی و تراکم کلاژن) نمونه گیری شدند.

ارزیابی بافت شناسی

t: ضخامت حقیقی سکشن های اندازه گیری شده در هر فیلد توسط میکروکتور

جهت ارزیابی های بافت شناسی، نمونه های پوستی جدا شده به مدت 72 ساعت در فرمالین 10 درصد فیکس شدند. در ادامه پس از پردازش بافتی، در پارافین قالب گیری و با استفاده از دستگاه میکروتوم به صورت سریالی، با ضخامت 5 میکرومتر برش داده شدند. تعداد 10 برش با فواصل مشخص از یکدیگر جهت ارزیابی های استریولوژیکی و تراکم کلاژن، انتخاب شد.

ارزیابی استریولوژیکی حجم اپیدرم و درم

در مطالعه حاضر از روش Cavalier به منظور ارزیابی استریولوژیکی حجم اپیدرم و درم تازه تشکیل شده استفاده شد (تصویر شماره 1-الف). حجم اپیدرم و درم در نمونه های مورد بررسی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (18):

$$V_{total} = \sum P \times \frac{a}{p} \times t$$

$\sum P$: مجموع نقاط شمارش شده در 10 سکشن مربوط به هر نمونه موش؛

a/p : مساحت فریم مورد بررسی؛

t: فاصله بین سکشن های بافتی مورد بررسی

برآورد تراکم سلول های فیبروبلاست و قاعده ای اپیدرم به منظور برآورد تراکم سلول های فیبروبلاست و قاعده ای اپیدرم در موضع زخم از روش Optical Dissector استفاده شد (تصویر شماره 1-ب). فرمول محاسبه تراکم کمی (N_v) سلول های مورد بررسی به شرح زیر می باشد (19):

$$N_v = \frac{\sum Q}{\sum P \times h \times \frac{a}{f} \times BA}$$

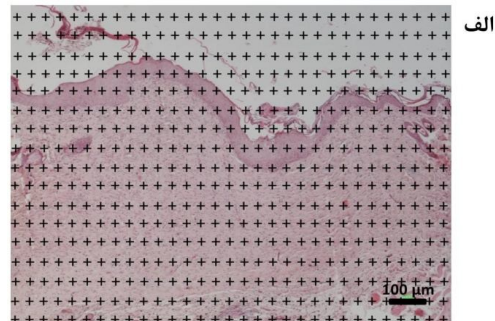
$\sum Q$: تعداد سلول های شمارش شده -

h: ارتفاع دایسکتور -

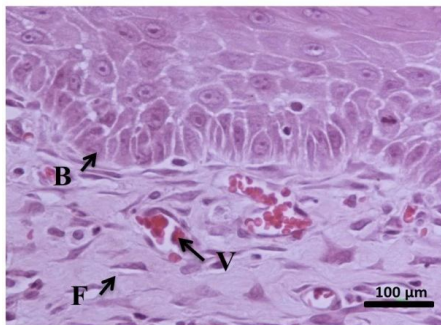
a/f : مساحت فریم مورد بررسی -

$\sum p$: تعداد کلی فریم های شمارش شده در همه فیلدها -

BA: عدد ثابت مربوط به میکروتوم که $20 \mu m$ می باشد -



الف



ب

تصویر شماره 1: برآورد حجم اپیدرم و درم جدید و تراکم سلول های فیبروبلاست، قاعده ای اپیدرم و عروق خونی درم مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با H&E به روش استریولوژیکی. الف: برآورد حجم اپیدرم و درم جدید. در این روش در بزرگنمایی $\times 40$ مقاطع در دستگاه پروژکتور قرار داده شد و تصویر نمونه ها بر روی کاغذ Grid Points تابانده و نقاط قرار گرفته بر روی اپیدرم و درم جدید شمارش و حجم محاسبه شد. ب: برآورد تراکم سلول های فیبروبلاست (F)، قاعده ای اپیدرم (B) و عروق خونی (V). در این روش، در هر مقطع بافتی، 5 ناحیه توسط یک پروب استاندارد استریولوژی با ابعاد $0/01$ میلی متر مربع متصل به مانیتور میکروسکوپ انتخاب و در بزرگنمایی $\times 100$ مورد بررسی قرار گرفت و سلول ها شمارش شدند.

برآورد تراکم طول عروق خونی

جهت محاسبه تراکم طول عروق در درم بافت های مورد مطالعه از فرمول زیر استفاده شد (20):

$$LV = \frac{2 \sum Q}{\sum P \times \frac{a}{f}}$$

$\sum Q$: تعداد کلی پروفایل های عروقی شمارش شده به ازای هر پوست -

Σp : تعداد کلی فریم‌های شمارش شده در همه فیلدها -
a/f: مساحت فریم مورد بررسی

ارزیابی تراکم کلاژن

تراکم کلاژن در درم ترمیم یافته در پایان مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی تعداد 10 مقطع بافتی از هر موش، 5 قسمت از هر مقطع با بزرگنمایی 40 عکس‌برداری شد. سپس هر کدام از تصاویر به کمک نرم‌افزار Image J نسخه شماره 5 مورد تجزیه و تحلیل دانسیتومتری قرار گرفت و میانگین 50 تصویر، به عنوان دانسیته کلاژن موش مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (16,6,5).

ارزیابی بیان ژن به روش qRT-PCR

در پایان روز هفتم، نمونه‌های بافتی 5 موش از هر گروه (نصف پوست ناحیه زخم) به منظور ارزیابی بیان ژن‌های موثر در تکثیر و بازسازی ($\text{TGF-}\beta$) و التهاب ($\text{TNF-}\alpha$ و $\text{IL-1}\beta$) تهیه شدند. کل mRNA بافت موضع زخم و حاشیه یک میلی‌متری اطراف آن با استفاده از High Pure RNA Isolation Kit استخراج و cDNA ساخته شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار StepOne (Applied Biosystems; version 2.1) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نهایی با استفاده از روش مقایسه‌ای $CT (2^{-\Delta\Delta Ct})$ انجام شد. در جدول شماره 1 پرایمرهای مورد استفاده قابل مشاهده می‌باشد.

جدول شماره 1: نام و توالی پرایمر ژن‌های مورد مطالعه

ژن	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
TGF- β	GGCTGAACCAAGGAGACGGA	CCATGAGGAGCAGGAAGGGT
TNF- α	AGCCCTCTCTCATCTCTGCTC	GTTTGCTACGACGTGGGCTAC
IL-1 β	GACAAGCAACGACAAAATCCC	TGGGTATGTGTTGGGATCCAC
β -actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTTC

ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی تکثیر سلولی

در پایان روز هفتم، نصف دیگر بافت زخم به منظور ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی تکثیر سلولی (پروتئین ki67)

جداسازی شد. مقاطع بافتی پس از پارافین زدایی، تحت احیای آنتی ژن به روش حرارت دادن قرار گرفتند. برش‌های بافتی ابتدا با آنتی‌بادی اولیه به مدت یک شب در دمای یخچال قرار گرفته و روز بعد با آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و در پایان جهت مشخص‌سازی وجود واکنش، از کروم‌موژن DAB (3,3'-Diaminobenzidine; DAB) استفاده شد. مشابه آن‌چه در روش استریولوژیکی تراکم سلول‌ها گفته شد، تصاویر بافتی تهیه و تراکم سلول‌های در حال تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفت (21).

بررسی آماری

تمامی داده‌های کمی توسط نرم‌افزار SPSS نسخه 16 آنالیز شد. داده‌ها توسط آزمون One way ANOVA و تست تعقیبی Dunn's با یکدیگر مقایسه و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد و $P < 0/05$ از نظر آماری به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. به منظور ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار Prism نسخه 6 استفاده شد.

یافته‌ها

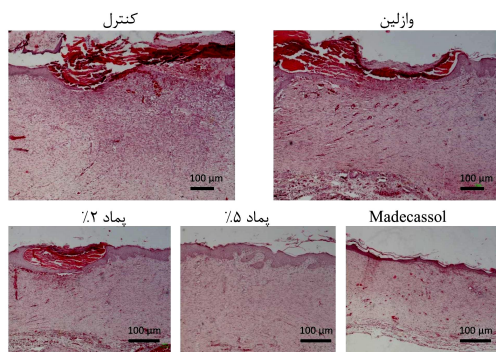
محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی

محتوای تام فنولی در گیاه $55/470 \pm 3/156$ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. محتوای تام فلاونوئیدی در گیاه $47/581 \pm 2/381$ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد.

ارزیابی تغییرات ماکروسکوپیکی ترمیم زخم

نتایج حاصل از اندازه‌گیری و مقایسه درصد ترمیم زخم در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در جدول شماره 2 گزارش شده است.

مقایسه نتایج بین گروه‌های درمانی در روز 7 نشان داد ترمیم در گروه‌های پماد 5 درصد و 2 درصد نسبت به گروه‌های کنترل و وازلین بیش تر بود (به ترتیب $P < 0/001$).



تصویر شماره 2: تصاویر بافتی گروه های مورد مطالعه در روز 17. رنگ آمیزی شده با H&E (بزرگنمایی 40x).

یافته‌های استریولوژیکی حجم اپیدرم و درم

نتایج حاصل از ارزیابی حجم اپیدرم و درم جدید در تصویر شماره 3 گزارش شده است. مقایسه حجم اپیدرم نشان داد گروه‌های پماد 5 درصد و Madecassol در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین به‌طور معنی‌داری دارای حجم بیش‌تری بودند (همه موارد، $P < 0/001$). حجم اپیدرم در گروه پماد 2 درصد نیز در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین بیش‌تر بود ولی اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > 0/05$) (تصویر شماره 3- الف).

مقایسه حجم درم نیز حاکی از آن بود که گروه‌های پماد 5 درصد و Madecassol در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین به‌طور معناداری دارای حجم بیش‌تری بودند (به ترتیب؛ $P < 0/001$ ، $P < 0/01$). هم‌چنین مقایسه حجم درم بین دو گروه دریافت‌کننده عصاره نشان داد گروه پماد 5 درصد در مقایسه با گروه پماد 2 درصد دارای حجم بیش‌تری بود ($P > 0/05$). حجم درم در گروه پماد 2 درصد نیز در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین بیشتر بود ولی اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > 0/05$) (تصویر شماره 3- ب).

یافته‌های استریولوژیکی تراکم سلول‌های فیبروبلاست و قاعده‌ای اپیدرم

نتایج حاصل از شمارش تعداد سلول‌های فیبروبلاست، قاعده‌ای اپیدرم و طول عروق خونی در تصویر شماره

نتایج حاصل از ترمیم در روز 10 نیز نشان داد گروه پماد 5 درصد در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین (به ترتیب $P < 0/001$ ، $P < 0/01$) و گروه پماد 2 درصد نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$) به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بودند. در نهایت مقایسه مساحت ترمیم در روز 17 حاکی از سطح معنی‌داری در سرعت ترمیم در پماد 5 درصد در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین (هر دو؛ $P < 0/05$) بود. مقایسه بین گروه‌های عصاره در هر سه بازه زمانی حاکی از درصد ترمیم بیش‌تر در پماد 5 درصد نسبت به پماد 2 درصد بود (همه موارد؛ $P < 0/05$). علاوه بر این در هیچ بازه زمانی بین گروه‌های کنترل و وازلین اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (همه موارد؛ $P < 0/05$).

جدول شماره 2: درصد جمع شدن و سرعت زخم در روز های 7، 10 و 17 با توجه به سطح زخم اولیه

گروه	درصد جمع شدن و سرعت زخم		
	روز 7	روز 10	روز 17
کنترل	38 ± 2/9	52/6 ± 5/2	77/8 ± 3/1
وازلین	39/3 ± 4/6	60/5 ± 8/6	79 ± 3/8
پماد 2٪	51/5 ± 2/6 #	73/8 ± 3/3 @	84 ± 6
پماد 5٪	64 ± 3/4 * / &	84 ± 3/4 \$ / &	96/3 ± 2/8 %
Madecassol	74 ± 1/8	93/8 ± 2/6	97/8 ± 2/6

داده ها به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است،

* : $P < 0/001$ در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین،
 # : $P < 0/01$ در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین،
 & : $P < 0/05$ در مقایسه با گروه پماد 2درصد،
 \$: $P < 0/01$ در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین،
 @ : $P < 0/05$ در مقایسه با گروه های کنترل،
 % : $P < 0/05$ در مقایسه با گروه های پماد 2درصد، کنترل و وازلین.

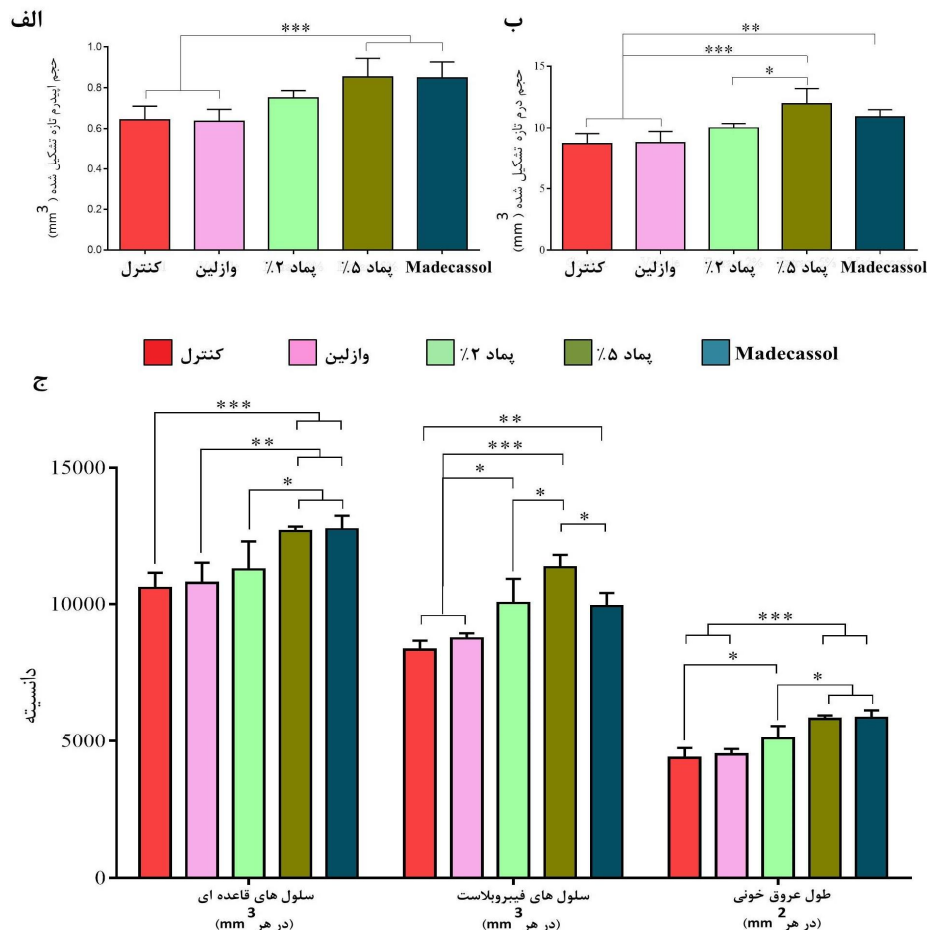
یافته های بافت شناسی

تصاویر بافتی حاصل از رنگ آمیزی H&E در گروه‌های مورد مطالعه در روز 17 در تصویر شماره 2 نشان داده شده است. همان‌گونه که در تصاویر نیز مشاهده می‌شود، در گروه‌های دریافت‌کننده پماد 5 درصد و Madecassol زخم به‌طور کامل ترمیم یافته و لایه اپیدرم و درم تشکیل شده است در حالی که در سایر گروه‌ها (پماد 2درصد، کنترل و وازلین) این میزان کامل نمی‌باشد.

3-ج نشان داده شده است. مقایسه آماری بین گروه های مورد مطالعه نشان داد گروه های پماد 5 درصد و Madecassol در مقایسه با گروه های کنترل (هر دو؛ $P<0/05$) و گروه Madecassol در مقایسه با گروه کنترل ($P<0/01$) و پماد 2 درصد (هر دو؛ $P<0/05$) تعداد سلول های فیبروبلاست بیش تری داشتند. هم چنین نتایج نشان داد گروه پماد 2 درصد در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین دارای سلول های فیبروبلاست بیش تری بود ولی اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0/05$).

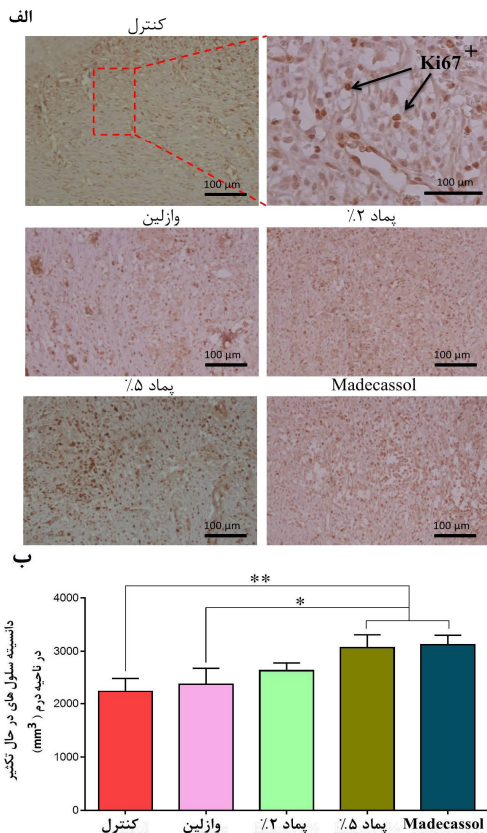
نتایج حاصل از شمارش سلول های قاعده ای اپیدرم نیز نشان داد گروه پماد 5 درصد در مقایسه با گروه های کنترل، وازلین، پماد 2 درصد و Madecassol دارای تعداد سلول های بیش تری بود (به ترتیب؛

هم چنین نتایج نشان داد گروه پماد 2 درصد در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین (هر دو؛ $P<0/05$) و گروه Madecassol در مقایسه با گروه های کنترل ($P<0/001$) و پماد 2 درصد (هر دو؛ $P<0/05$) تراکم عروق خونی بیش تری داشتند. هم چنین تراکم عروق در دو گروه پماد 5 درصد و Madecassol در مقایسه با گروه پماد 2 درصد (هر دو؛ $P<0/05$) بیش تر بودند. علاوه بر این تراکم عروق خونی در گروه پماد 2 درصد در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری بیش تر بود ($P<0/05$).



تصویر شماره 3: یافته های استریولوژیکی. الف: حجم اپیدرم؛ ب: حجم درم؛ ج: تراکم سلول های فیبروبلاست، سلول های قاعده ای اپیدرم و عروق خونی در زخم های ترمیم شده در روز 17. (داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. در نمودارها: **** $P<0/001$ ، *** $P<0/01$ ، ** $P<0/05$)

نشان داده شده است. نتایج حاصل از شمارش سلول های واکنش مثبت در ناحیه درم نشان داد گروه های پماد 5 درصد و Madecassol در مقایسه با گروه های کنترل (هر دو؛ $P < 0/01$) و وازلین (هر دو؛ $P < 0/05$) دارای تعداد سلول های بیش تری بودند.

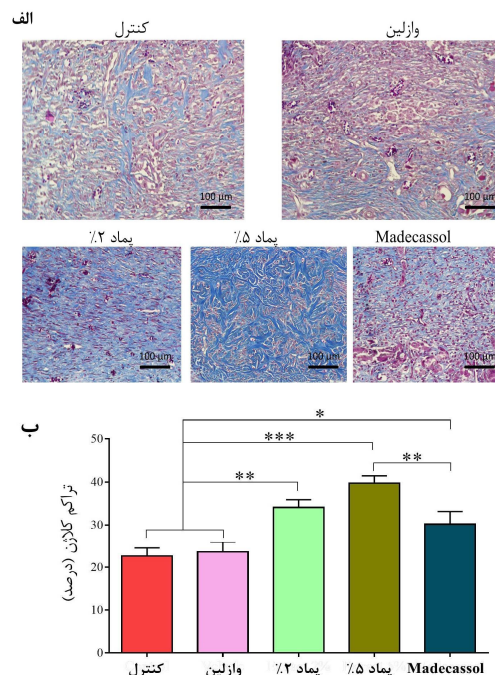


تصویر شماره 5: تکثیر سلولی در درم ترمیم یافته. الف: تصاویر مربوط به رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی برای پروتئین Ki67 است که سلول های در حال تکثیر (با هسته های قهوه ای رنگ) را نشان می دهد. ب: تجزیه و تحلیل دانسته سلول های واکنش مثبت برای پروتئین Ki67 در درم ترمیم یافته. داده ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شده است. در نمودار: $**P < 0/01$ ، $*P < 0/05$

یافته های بیان ژن های موثر در ترمیم موضع زخم
نمودار حاصل از مقایسه بیان ژن ها در تصویر شماره 6 نشان داده شده است. مقایسه آماری بین گروه ها نشان داد سطح بیان ژن $TGF-\beta$ در گروه های پماد 5 درصد و Madecassol در مقایسه با گروه های

یافته های تراکم کلاژن در درم ترمیم یافته

تصاویر مربوط به رنگ آمیزی تری کروم ماسون و ارزیابی کمی آنها در تصویر شماره 4 نشان داده شده است. تحلیل آماری بین گروه های مورد مطالعه نشان داد در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین، گروه های پماد 2 درصد (هر دو؛ $P < 0/01$)، پماد 5 درصد (هر دو؛ $P < 0/001$) و Madecassol (هر دو؛ $P < 0/05$) میزان تراکم کلاژن بیش تری داشتند. علاوه بر این گروه پماد 5 درصد در مقایسه با گروه Madecassol دارای تراکم کلاژن بیش تری بود ($P < 0/01$) (تصویر شماره 4-ب).

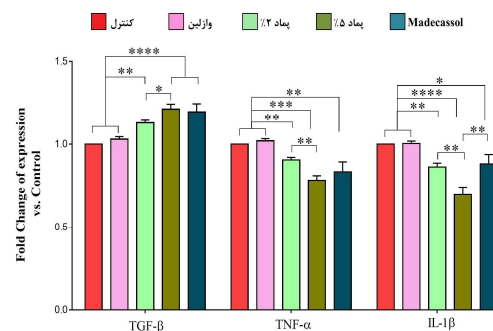


تصویر شماره 4: تراکم کلاژن در درم ترمیم یافته. الف: تصاویر نشان دهنده ایاف کلاژن رنگ آمیزی شده با تری کروم ماسون در ناحیه درمی می باشند (کلاژن به رنگ آبی نشان داده شده است) (بزرگنمایی 40×). ب: تجزیه و تحلیل کمی از میزان تراکم کلاژن در درم زخم های بهبود یافته.

داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. در نمودار: $***P < 0/0001$ ، $**P < 0/01$ ، $*P < 0/05$

یافته های ایمونوهیستوشیمیایی تکثیر سلولی
تصاویر مربوط به رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین ki67 و ارزیابی کمی آنها در تصویر شماره 5

کنترل و وازلین به طور معناداری بیش تر بود (همه موارد؛ $P<0/0001$). مقایسه سطح بیان این ژن در بین دو گروه تحت تیمار با عصاره نشان داد که در گروه پماد 5درصد به صورت معنی داری بیش تر بود ($P<0/05$). همچنین سطح بیان ژن $TGF-\beta$ در گروه پماد 2درصد در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین نیز به طور معنی داری بیش تر بود (همه موارد؛ $P<0/01$).



تصویر شماره 6: مقایسه بیان ژن ها در موضع زخم های ترمیم یافته. نمودار میزان بیان نسبی ژن موثر در ترمیم و بازسازی ($TGF-\beta$) و نیز ژن های التهابی ($TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$) در گروه های مورد مطالعه در روز 7 توسط تکنیک qRT-PCR. برای رسم نمودارها، مقادیر بیان ژن مربوط به گروه کنترل، یک در نظر گرفته شده و بیان ژنی نسبی سایر گروه ها نسبت به آن گزارش شده است. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. در نمودارها: **** $P<0/0001$, *** $P<0/001$, ** $P<0/01$, * $P<0/05$

همچنین نتایج حاصل از بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه های دریافت کننده تیمار نسبت به گروه های کنترل و وازلین به طور معنی داری کم تر بود به گونه ای که این اختلاف در گروه های پماد 2درصد (هر دو مورد؛ $P<0/01$)، پماد 5درصد (هر دو مورد؛ $P<0/001$) و Madecassol (هر دو مورد؛ $P<0/01$) برآورد شد. همچنین سطح بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه پماد 5درصد در مقایسه با گروه پماد 2درصد به طور معنی داری کم تر بود ($P<0/01$). در نهایت مقایسه سطح بیان ژن $IL-1\beta$ در بین گروه ها نشان داد پماد 2درصد، پماد 5درصد و Madecassol در مقایسه با گروه های کنترل و وازلین میزان بیان پایین تری داشتند به گونه ای که از لحاظ

آماري در خصوص گروه های پماد 2درصد (هر دو مورد؛ $P<0/01$)، پماد 5درصد (هر دو مورد؛ $P<0/0001$) و Madecassol (هر دو مورد؛ $P<0/05$) معنی دار بودند. همچنین مقایسه آماری بین گروه های تحت تیمار نشان داد سطح بیان ژن $IL-1\beta$ در گروه پماد 5درصد در مقایسه با گروه پماد 2درصد و Madecassol به طور معنی داری کم تر بود (هر دو؛ $P<0/01$).

بحث

گیاهان به طور سنتی در درمان و پیشگیری اختلالات گوناگون به کار می روند (22). فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می توان به طور عمده به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد. ترکیبات فنولی تقریباً در تمام بخش های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند (22).

فلاونوئیدها با ساختار اصلی دی فنیل پروپان با تفاوت هایی در حلقه پیران مرکزی، به طور گسترده در گیاهان توزیع داشته و تقریباً نیمی از حدود 8000 فنول های شناسایی شده را تشکیل می دهند (23). فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان پیشگیری کننده در پیشرفت سرطان و بیماری های قلبی شناخته شده اند (23). در مطالعه حاضر اثرات التیام بخشی عصاره الکلی کاکتوس بند انگشتی (*Echinopsis chamaecereus*) در قالب پمادهای 2درصد و 5درصد بر زخم حاد پوستی تمام ضخامت در مدل حیوانی موش های صحرایی بررسی شد.

مطالعات نشان داده اند در زخم های حاد، روز 7 به دلیل همپوشانی بین فازهای التهابی و تکثیری و روز 17 به دلیل همپوشانی بین فازهای تکثیری و بازسازی (15، 17)، مناسب ترین زمان در بررسی های اثرات ترمیمی ترکیبات مورد استفاده در ترمیم زخم می باشند (24).

در مطالعه حاضر به منظور درک بهتر ترکیب درمانی مورد استفاده، نتایج در دو مقطع روز 7 برای همپوشانی بین فاز التهابی و فاز تکثیری و روز 17 برای

همپوشانی بین فازهای تکثیری، بازسازی و بلوغ بافت زخم در نظر گرفته شد (16، 17).

التهاب یکی از دلایل اصلی اختلال در ترمیم بهینه زخم‌های پوستی است (25). در مراحل ترمیم زخم، به دنبال ایجاد لخته هموستاتیک، از برخی سلول‌های موضعی هم‌چون ماکروفاژها، سیتوکین‌های ضد التهابی مانند $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ ترشح می‌شود که باعث تحریک نفوذ سایر سلول‌های ایمنی همچون نوتروفیل‌ها به محل و آغاز واکنش التهابی می‌شوند (16، 26). ترشح طولانی مدت سیتوکین‌های التهابی باعث اختلال در شروع فاز تکثیری و به دنبال آن تبدیل شدن زخم به نوع مزمن ترمیم نیافته می‌شود (27). مطالعات نشان داده‌اند کنترل بیان ژن‌های التهابی سبب کاهش آپوپتوز و افزایش تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و متعاقباً تسریع در بهبودی زخم می‌شود (16، 28). نتایج ما نشان داد که کاهش قابل توجهی در مقادیر بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ در گروه‌های تحت درمان با عصاره کاکتوس بند انگشتی (پماد 2 درصد و 5 درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین روی داد که این میزان در گروه دریافت‌کننده پماد 5 درصد بیشتر بود. در این راستا Dweck و همکاران در مطالعه خود با بررسی اثرات داروهای گیاهی بر پوست نشان دادند که گیاهانی با خصوصیات ضد التهابی، دارای سطح بالایی از فلاونوئیدها هستند (29). علاوه بر این، همزمان با تشکیل لخته هموستاتیک و التهاب، سلول‌های محل زخم برخی از فاکتورهای رشد (مانند $TGF-\beta$ ، EGF، FGF، ...) را سنتز می‌کنند که مهاجرت سلولی، تکثیر و بهبود سنتز ماتریکس خارج سلولی موقت را تحریک نموده و منجر به تشکیل عروق جدید در بافت گرانولاسیون، رسوب کلاژن و بازسازی ماتریکس خارج سلولی دائمی می‌شود (5، 6، 30).

در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی فاز تکثیری در گروه‌های مورد مطالعه، بیان $TGF-\beta$ و نیز تکثیر سلول‌های موضع درم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نشان

داده شده است بیان $TGF-\beta$ می‌تواند باعث تجمع پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (Extracellular Matrix (ECM)، تعدیل رسوب کلاژن و بازسازی ECM موقتی به دائمی شود (31). نتایج مطالعه حاضر بیان بالایی از ژن $TGF-\beta$ در گروه‌های دریافت‌کننده پماد عصاره گیاه کاکتوس بند انگشتی را نسبت به گروه‌های کنترل و وازلین نشان داد. هم‌چنین این یافته‌ها همسو با نتایج حاصل از ارزیابی تکثیر سلولی بود. علاوه بر این، بررسی‌های استریولوژیکی در مطالعه حاضر تعداد قابل توجهی سلول‌های فیبروبلاست و نیز افزایش حجم اپیدرم و درم را در گروه‌های تحت تیمار با عصاره نسبت به گروه‌های کنترل و وازلین نشان داد که این یافته‌ها به نوعی تاییدکننده یکدیگر بودند. با این حال در مقایسه بین دو گروه دریافت‌کننده عصاره، این تغییرات در گروه پماد 5 درصد بیش‌تر بود.

از سوی دیگر رگ‌زایی، یکی از مهم‌ترین عوامل در فرآیند ترمیم بهینه زخم می‌باشد (32). فرآیند رگ‌زایی به دنبال حضور فاکتورهای رشد همچون $TGF-\beta$ و کاهش التهاب می‌تواند تسریع شود (3، 15، 16). در مطالعه حاضر رگ‌زایی به روش استریولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه همانگونه که انتظار می‌رفت، افزایش عروق خونی در گروه‌های درمانی با پمادهای 2 درصد و 5 درصد نسبت به گروه‌های کنترل و وازلین بود که این یافته نیز همسو با یافته‌های بیان ژن می‌باشد. با این حال این میزان تغییرات در گروه پماد 5 درصد نسبت به گروه پماد 2 درصد بیش‌تر و معنی‌دار بود. هم‌چنین در این مطالعه، تراکم کلاژن موضع درم به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بلوغ بافتی در کنار سایر مشخصه‌های استریولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. کلاژن به عنوان فراوان‌ترین پروتئین در بدن، یکی از مهم‌ترین ترشحات فیبروبلاست‌ها بوده که تولید و بازسازی آنها نقش اساسی در فرآیند ترمیم زخم دارد (27). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تراکم کلاژن در درم گروه‌های دریافت‌کننده عصاره به‌طور

اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آن باشد. بنابراین این یافته‌ها از داده‌های تجربی که به طور سنتی در بین مردم وجود دارد پشتیبانی می‌کند ولی با این حال جهت بررسی ایمنی و اثربخشی آن بر روی زخم‌های انسانی، مطالعات بیش‌تری مورد نیاز است.

از محدودیت‌های مطالعه، می‌توان به عدم بررسی‌های بیومکانیکی بافت زخم اشاره کرد.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل طرح تحقیقاتی با کد اخلاق (IR.MAZUMS.REC.1399-7117) می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌گردد.

References

1. Nilforoushzadeh MA, Raoofi A, Afzali H, Gholami O, Zare S, Nasiry D, et al. Promotion of cutaneous diabetic wound healing by subcutaneous administration of Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from umbilical cord. Arch Dermatol Res 2022; 1-13.
2. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery (Oxford) 2008; 26(2): 31-37.
3. Seyed Sharifi SH, Nasiry D, Mahmoudi F, Etezadpour M, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of Sambucus ebulus Fruit Extract in Full-Thickness Diabetic Wound Healing in Rats. J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(200): 11-25 (Persian).
4. Ebrahimzadeh MA, Rafati MR, Damchi M, Golpur M, Fathiazad F. Treatment of paederus dermatitis with Sambucus ebulus Lotion. Iran J Pharm Res 2014; 13(3): 1065-1071
5. Nasiry D, Ebrahimzadeh MA, Akbari J, Amiri FT, Talebpour F. Wound healing activity of Sambucus ebulus. IJPSR 2017; 8(1): 132-135.
6. Nasiry D, Khalatbary AR, Ebrahimzadeh MA. Anti-inflammatory and wound-healing potential of golden chanterelle mushroom, *Cantharellus cibarius* (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms 2017; 19(10): 893-903.
7. Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. J Ethnopharmacol 2007; 114(2): 103-113.
8. Ahmadi F, Zargari M, Nasiry D, Khalatbary AR. Synergistic neuroprotective effects of hyperbaric oxygen and methylprednisolone following contusive spinal cord injury in rat. J Spinal Cord Med 2021; 1-10.
9. Khalatbary AR, Ghabaee DNZ, Ahmadvand H, Amiri FT, Lehi ST. Deltamethrin-induced hepatotoxicity and virgin olive oil consumption: an experimental study. Iran J Med Sci 2017; 42(6): 586-592.
10. Nasiry D, Khalatbary AR, Ahmadvand H, Talebpour Amiri FB. Effects of Juglans regia

معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین بیش‌تر بود.

با توجه به این‌که در این مطالعه از داروی رفرنس Madecassol نیز به عنوان یک داروی تایید شده بالینی در درمان زخم استفاده شده بود تا به مقایسه آن با عصاره کاکتوس بند انگشتی پرداخته شود، مقایسه بین آن‌ها حاکی از همسانی و در بسیار از موارد بهتر بودن ترکیبات گیاهی به خصوص پماد 5 درصد بود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، عصاره کاکتوس بند انگشتی به خصوص در غلظت پماد 5 درصد می‌تواند طول مدت بهبودی زخم را در مقایسه با گروه‌های کنترل و وازلین به طور قابل توجهی کاهش دهد و به نظر می‌رسد بخش عمده‌ای از اثرات التیام بخشی گیاه فوق، احتمالاً به دلیل

- L. leaf extract supplementation on testicular functions in diabetic rats. *Biotech Histochem* 2021; 96(1): 41-47.
11. Çetinbaş-Genç A. Adverse effects of heat stress in relation to actin cytoskeleton on pollen performance of *Echinopsis chamaecereus* (Cactaceae). *Rev Bras Bot* 2020; 43(1): 29-34.
 12. Narmani A, Arzanlou M, Babai Ahari A, Hatef H, Ghasemi S. First report of fungal soft rot disease caused by *Fusarium proliferatum* on peanut cactus (*Echinopsis chamaecereus*) in the world. *Proceedings of the 22nd Iranian Plant Protection Congress*. College of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Iran; 2016.
 13. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* leaves. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 1097-1105.
 14. Ebrahimzadeh MA, Nabavi S, Nabavi S, Eslami B. Antioxidant activity of the bulb and aerial parts of *Ornithogalum sintenisii* L (Liliaceae) at flowering stage. *Trop J Pharm Res* 2010; 9(2): 141-148.
 15. Huang L, Wang M, Ebrahimzadeh MA, Jafari A, Jiang K. Stereological and molecular studies on the effects of *Ferula persica* extract on wound healing in rats. *Vet Med Sci* 2021; 8(1): 318-327.
 16. Nasiry D, Khalatbary AR, Abdollahifar M-A, Amini A, Bayat M, Noori A, et al. Engraftment of bioengineered three-dimensional scaffold from human amniotic membrane-derived extracellular matrix accelerates ischemic diabetic wound healing. *Arch Dermatol Res* 2021 313(7): 567-582.
 17. Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Adv Ther* 2017; 34(3): 599-610.
 18. Howard V, Reed M. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. 2thed. London: Garland Science; 2004.
 19. Amini A, Pouriran R, Abdollahifar M-A, Abbaszadeh HA, Ghoreishi SK, Chien S, et al. Stereological and molecular studies on the combined effects of photobiomodulation and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on wound healing in diabetic rats. *J Photochem Photobiol B* 2018; 182: 42-51.
 20. Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol* 2010; 19(2): 65-82.
 21. Nasiry D, Khalatbary AR, Ahmadvand H, Amiri FT. *Juglans regia* L. leaf extract attenuates diabetic nephropathy progression in experimental diabetes: an immunohistochemical study. *Iran J Med Sci* 2019; 44(1): 44-52.
 22. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
 23. Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (*Myrtus communis* L.). *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(127): 10-24 (Persian).
 24. Nishiyama T, Kii I, Kashima TG, Kikuchi Y, Ohazama A, Shimazaki M, et al. Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PloS One* 2011; 6(4): e18410.
 25. Bagheri M, Amini A, Abdollahifar M-A, Ghoreishi SK, Piryaee A, Pouriran R, et al. Effects of photobiomodulation on degranulation and number of mast cells and wound strength in skin wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. *Photomed Laser Surg* 2018; 36(8): 415-423.

26. Reinke J, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012; 49(1): 35-43.
27. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1219-1222.
28. Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, et al. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* 2010; 53(2): 378-388.
29. Dweck A. Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *J Appl Cosmetol* 2002; 20(1): 83
30. Babaei E, Asghari MH, Mehdikhani F, Moloudizargari M, Ghobadi E, Pouya SRH. The healing effects of herbal preparations from *Sambucus ebulus* and *Urtica dioica* in full-thickness wound models. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(5): 421-427.
31. Nasiry D, Khalatbary AR, Abdollahifar M-A, Bayat M, Amini A, Ashtiani MK, et al. SDF-1 α loaded bioengineered human amniotic membrane-derived scaffold transplantation in combination with hyperbaric oxygen improved diabetic wound healing. *J Biosci Bioeng* 2022; 133(5): 489-501.
32. Izanlu M, Khalatbary A, Aliabadi A, Davoodi S, Raoofi A, Modanloo F, et al. Synergistic Effect of Hyperbaric Oxygen and Decellularized Human Amniotic Membrane on Full-Thickness Diabetic Wound Healing in Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2022; 32(208): 1-15 (Persian).