

بررسی اثر ترمیم‌کنندگی عصاره‌ی هیدروآتانولی گلپر (*Heracleum Persicum*) بر زخم پوستی تمام ضخامت برشی در موش صحرایی

علی داودی^۱، فاطمه حسین‌پور^۲، محمد هاشم‌نیا^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: التیام زخم، فرایند طبیعی ترمیم بدن پس از آسیب می‌باشد. با توجه به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا و اجزای مؤثره فراوان، هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر عصاره‌ی گلپر بر ترمیم زخم پوستی تمام ضخامت برشی در موش صحرایی بود.

روش‌ها: پس از ایجاد زخم در ۶۰ سر موش صحرایی، حیوانات به چهار گروه شاهد، کرم پایه، تیمارهای ۱ و ۲ (عصاره ۵ و ۱۰ درصد گلپر) تقسیم شدند. داروها روزانه و به مدت ۱۴ روز استفاده شدند. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد زخم، از محل ضایعه جهت بررسی هیستوپاتولوژیک و آزمایش‌های بیوشیمیایی نمونه‌برداری گردید.

یافته‌ها: درمان با عصاره‌ی گلپر به ویژه عصاره‌ی ۱۰ درصد، باعث کاهش قابل توجه ناحیه‌ی زخم در مقایسه با گروه شاهد شد. علاوه بر این، عصاره‌ی گلپر تعداد لنفوسیت‌ها را نسبت به گروه شاهد کاهش داد و تعداد فیبروبلاست‌ها را در مراحل اولیه و تعداد فیبروسیت‌ها را در مراحل بعدی بهبود زخم افزایش داد. همچنین ایجاد اپی‌تلیوم مجدد، نظم بافتی، الیاف کلاژن با بلوغ بیشتر و رگ‌های خونی با اندازه بزرگ، در گروه‌های تیمار بویژه عصاره‌ی ۱۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد بهبود مشخصی را نشان دادند. عصاره‌ی گلپر، میزان هیدروکسی پرولین و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده و نیز موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید در بافت زخم گردید.

نتیجه‌گیری: استعمال عصاره‌ی گلپر، بویژه عصاره‌ی ۱۰ درصد در روند التیام زخم مؤثر است. این ویژگی می‌تواند مربوط به اثر عصاره بر عروق خونی، تعدیل فاز التهابی، افزایش کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و کاهش استرس اکسیداتیو باشد.

واژگان کلیدی: ترمیم زخم؛ گلپر؛ هیدروکسی پرولین؛ گلیکوزآمینوگلیکان؛ استرس اکسیداتیو

ارجاع: داودی علی، حسین‌پور فاطمه، هاشم‌نیا محمد. بررسی اثر ترمیم‌کنندگی عصاره‌ی هیدروآتانولی گلپر (*Heracleum Persicum*) بر زخم پوستی تمام ضخامت برشی در موش صحرایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۵۰۲): ۳۰-۴۵.

مقدمه

پوست بزرگ‌ترین اندام بدن انسان است و در فرایندهای مختلفی از جمله هیدراتاسیون، محافظت از بدن به عنوان اولین سد دفاعی مکانیکی در برابر عوامل بیماری‌زا و مواد شیمیایی، شروع سنتز ویتامین دی، دفع و تنظیم دمای بدن نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین آسیب شدید به پوست می‌تواند تهدیدکننده‌ی حیات باشد (۱).

زخم، گسیختگی در ساختار بافت نرم بوده که به سبب عوامل مختلف ایجاد می‌شود و التیام زخم در واقع یک پاسخ دینامیکی به

آسیب است که پیچیده و اما منظم بوده و مستلزم تعامل بین انواع مختلف سلول‌ها، سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و پروتئین‌های ساختمانی می‌باشد (۲). گفته شده در زمان ایجاد زخم، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) (ROS) افزایش یافته و استرس اکسیداتیو تشدید می‌گردد (۳). در شرایط طبیعی، اغلب بین تولید ROS از یک سو و قدرت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی از طرف دیگر حالت تعادل وجود دارد. در صورت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا کاهش قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی، زمینه برای ایجاد صدمات

۱- دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: فاطمه حسین‌پور؛ استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

از گیاهان دارویی روی آورده است. یکی از این اختلالات، زخم پوستی است و پژوهش‌های مختلفی در زمینه‌ی اثرات برجسته‌ی گیاهان دارویی در ترمیم زخم انجام شده است (۱۲).

Heracleum persicum گیاهی گل‌دار از خانواده‌ی *Apiaceae*

است که معمولاً با نام ایرانی «گلپر» شناخته می‌شود. این گیاه بومی کشورهای آسیایی ایران، عراق و ترکیه است (۱۳، ۱۴). گیاه گلپر حاوی اجزای مؤثره و به عبارتی متابولیت‌های ثانویه فراوانی است که از جمله آن‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد: مواد فرار، تربینوئیدها، تری‌ترین‌ها، فورانوکومارین‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها (۱۵). اثرات فارماکولوژیک و فعالیت‌های بیولوژیک متعددی از گیاه گلپر گزارش شده است که شامل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب، ضد درد، ضدقارچ، ضدباکتری، حشره‌کش، تعدیل‌کننده ایمنی، اثرات محافظتی بر باروری، کبد، معده و قلب و کاهنده‌ی چربی خون می‌باشد (۱۶، ۱۷). با توجه به محتوای غنی گیاه گلپر و نیز اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و اثرات متنوع بیولوژیک اشاره شده و همچنین با توجه به این که در فرایند ایجاد زخم روند التهاب و نیز استرس اکسیداتیو تشدید می‌گردد، لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثرات عصاره‌ی هیدروآتانولی گلپر بر زخم پوستی تمام ضخامت برشی با توجه به معیارهای هیستوپاتولوژیک و برخی از آزمون‌های بیوشیمیایی در موش صحرایی بوده است.

روش‌ها

جهت انجام این مطالعه‌ی تجربی، ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم تهیه گردید. به منظور تطابق با محیط و شرایط جدید، حیوانات به مدت ۷ روز در خانه حیوانات و در قفس‌های تمیز بر اساس شرایط استاندارد: درجه حرارت ۲۴-۲۲ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰-۴۰ درصد و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در طول مدت پژوهش حیوانات با غذای پلت شده استاندارد تغذیه شدند و به طور آزادانه به آب دسترسی داشتند. پس از گذشت یک هفته، سایر مراحل آزمایش بر روی حیوانات انجام گرفت.

گیاه گلپر

تهیه‌ی عصاره

گیاه گلپر، از بازار محلی کرمانشاه خریداری شد و جنس و گونه آن توسط یک گیاه‌شناس در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه رازی تأیید شد (کد هرباریوم: ۲۹۱۹). جهت استخراج عصاره‌ی هیدروآتانولی، از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. بدین منظور ابتدا میوه‌های گیاه گلپر کاملاً خشک شد و سپس ۱۰۰ گرم گیاه خشک شده‌ی گلپر به وسیله‌ی آسیاب برقی به پودر تبدیل و در ظرف دهان‌گشاد ریخته شد و به آن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درجه اضافه گردید. بعد از

ناشسی از فعالیت رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد که به این حالت استرس اکسیداتیو اطلاق می‌شود (۴).

ترمیم انواع زخم‌ها بدون توجه به عامل ایجاد آن، خواه تروماتیک یا ناشی از برش جراحی و یا سوختگی، شامل فعالیت مجموعه‌ای از سلول‌های خونی از جمله ماکروفاژها و پلاکت‌ها، انواع بافت‌ها، سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد است که نتیجه فعالیت آن‌ها، افزایش متابولیسم سلولی برای پاک‌سازی محل، شکل‌گیری رشته‌های کلاژن و نهایتاً سازمان‌دهی آن‌ها و ترمیم زخم می‌شود (۵). در واقع فرایند ترمیم زخم شامل چهار مرحله می‌باشد که عبارتند از مراحل خون‌بندی، التهابی و پاک‌سازی، تکثیر و تزاید سلولی و در نهایت مرحله‌ی بلوغ که سازمان‌دهی رشته‌های کلاژن در مرحله‌ی بلوغ رخ می‌دهد (۶). کلاژن از پروتئین‌های اصلی ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. ماتریکس خارج سلولی یک شبکه سه بعدی کاملاً سازمان‌یافته در بافت‌های مختلف از جمله پوست بوده و در سازمان‌دهی بافت، بازسازی و تنظیم فرایندهای سلولی دارای نقش‌های ساختاری و عملکردی می‌باشد (۷). اجزای سازنده این ماتریکس، شامل پروتئین‌های رشته‌ای (کلاژن و الاستین) و گلیکوپروتئین‌ها (فیبرونکتین، لامینین و پروتئوگلیکان‌ها) می‌باشد (۸). پروتئوگلیکان‌ها خود از کربوهیدرات‌های بزرگ که عمدتاً گلیکوزآمینوگلیکان (GAGs) نامیده می‌شوند، تشکیل شده است که به پروتئین‌ها متصل می‌شوند. یکی از عملکردهای گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، پر کردن فضای خارج سلولی و روان‌کاری است. گلیکوزآمینوگلیکان‌ها چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی را تقویت می‌کنند. این ملکول‌ها به پروتئین‌های ترشح شده از فیبروبلاست‌ها (رشته‌های کلاژن) و فاکتورهای رشد در ماتریکس خارج سلولی چسبیده و بنابراین در سازمان‌دهی رشته‌های نازک کلاژن نقش ایفا می‌کنند (۹، ۱۰).

مراقبت از زخم و درمان به‌نگام جهت تسریع ترمیم، همچنین جلوگیری از ایجاد و گسترش عفونت و نیز مزمن شدن همواره مورد توجه بوده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضدالتهاب برای بسیاری از سوختگی‌ها و یا جراحات پوستی، به‌منظور جلوگیری از بروز عفونت‌های خطرناک ثانویه، و نیز تسریع روند التیام زخم رایج‌ترین عملیات درمانی هستند (۱۱). امروزه مسأله‌ی ترمیم زخم بسیار مورد توجه قرار گرفته است و پژوهش در این حوزه از نظر سرعت روند بهبود زخم، به خصوص در مواردی که زخم‌ها دیر بهبود یافته و یا تحت فشار هستند، دارای اهمیت ویژه‌ای است.

گیاهان دارویی از دیرباز در طب سنتی به‌منظور درمان امراض مختلف مورد توجه بوده‌اند. امروزه نیز به دلیل عوارض جانبی بالا، تداخلات دارویی و هزینه‌ی بالای داروهای سنتتیک، بشر به استفاده

بر حسب میلی‌گرم روتین در گرم عصاره‌ی خشک محاسبه شد.

آزمون حیوانی

در این مطالعه به منظور ایجاد زخم پوستی، پس از ایجاد بیهوشی با استفاده از داروهای زایلازین (۱ mg/kg) و کتامین (۶۰ mg/kg)، بخشی از پوست پشت گردن به صورت دایره‌ای و به قطر ۲ سانتی‌متر با استفاده از تیغه اسکالپل شماره‌ی ۱۱ و پنس شستی برداشته شد (۲۳). سپس حیوانات در ۴ گروه ۱۵ تایی به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند.

۱- گروه اول (شاهد)، بدون درمان

۲- گروه دوم، تیمار با کرم اوسرین خالص

۳- گروه سوم، تیمار با کرم عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۵ درصد

۴- گروه چهارم، تیمار با کرم عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۱۰ درصد

داروها روزانه و به مدت ۱۴ روز استفاده شدند و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد زخم و تیمار روزانه با داروی مربوطه طبق گروه‌بندی فوق، از هر گروه، ۵ سر موش با استفاده از دوز بالای کتامین (۳۰۰ mg/kg) و زایلازین (۳۰ mg/kg) آسان‌کشی شده (۲۴) و از محل ضایعه نمونه‌برداری بصورت تمام ضخامت شامل اپیدرم، درم و ناحیه زیرپوستی انجام گرفت. نمونه‌ها به ۲ قسمت تقسیم شد، نیمی از آن به منظور مطالعات هیستوپاتولوژی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و نیمی از آن با فسفات بافر سالین (PBS) سریعاً شستشو داده شد و جهت مطالعات بیوشیمیایی در میکروتیوب قرار گرفته و در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی مورفومتری

برای ارزیابی مورفومتری، با استفاده از دوربین دیجیتال در زمان‌های ذکر شده و با فاصله یکسان از زخم‌ها تصاویری تهیه و پس از انتقال به کامپیوتر با استفاده از نرم‌افزار Image J ورژن ۱/۴۷ مساحت زخم اندازه‌گیری و محاسبه شد.

ارزیابی هیستوپاتولوژی و هیستومورفومتری

در آزمایشگاه پاتولوژی از نمونه‌های بافتی پس از آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشته‌سازی با پارافین، قالب‌های بافتی تهیه گردید. سپس با استفاده از میکروتوم، از قالب‌ها برش‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت مقاطع رنگ‌آمیزی شده از نظر مورفولوژیک و تغییرات ایجاد شده در گروه‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج ثبت گردید.

با استفاده از دوربین دیجیتال از هر مقطع عکس‌برداری و جهت آنالیزهای دیجیتال به نرم‌افزار فتوشاپ منتقل شدند. تعداد ۵ عکس معادل ۵ فیلد میکروسکوپیکی از هر بافت برای ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی یک استفاده‌نمده گردید. پارامترهایی که در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند شامل رسوب فیبرین،

گذشت حدود ۷۲ - ۴۸ ساعت، از کاغذ فیلتر واتمن عبور داده شد و محتویات حاصله در پلیت‌های جداگانه قرار گرفته و به آون ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شد. باقی‌مانده‌ی حلال عصاره، ظرف مدت ۲۴ ساعت تیخیر و پودر حاصله جمع‌آوری شد. برای تهیه‌ی کرم ۵ و ۱۰ درصد، به ترتیب ۵ و ۱۰ گرم از پودر عصاره‌ی میوه‌ی گیاه گلپر حاصله با ۹۵ و ۹۰ گرم کرم پایه (اوسرین) مخلوط گردید (۱۸، ۱۹).

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، میزان ترکیبات فنولی تام و میزان

فلاونوئید عصاره

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام عصاره با استفاده از معرف ۲ و ۲ دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (۲۰). به‌طور خلاصه غلظت‌های مختلفی از عصاره و بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT)، به عنوان کنترل مثبت شامل ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و به میزان ۲ میلی‌لیتر تهیه شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از DPPH ۰/۱ میلی‌مولار به هریک از غلظت‌های عصاره و یا BHT اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر جذب نوری نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر قرائت و درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$DPPH \text{ مهارکنندگی فعالیت} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

که در آن A_0 مقدار جذب نمونه بلانک و A_1 مقدار جذب نمونه‌ی عصاره‌ی گلپر می‌باشد. منحنی درصد مهار شده و غلظتی از عصاره که موجب ۵۰ درصد مهار شده بود به عنوان IC_{50} تعیین گردید.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ی میوه‌ی گلپر توسط روش فولین سیوکالتیو و در طول موج ۷۶۰ نانومتر انجام گردید (۲۱). به‌طور خلاصه به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی رقیق‌شده‌ی میوه‌ی گیاه گلپر (۰/۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درصد) و یا رقت‌های مختلف اسید گالیک، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین سیوکالتیو اضافه شده و پس از ۳ تا ۵ دقیقه مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از بی‌کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در برابر بلانک آب مقطر قرائت شد. سپس منحنی استاندارد رسم شده و مقدار فنول تام بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. میزان فلاونوئید عصاره به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۲). به‌طور خلاصه به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی رقیق‌شده‌ی میوه‌ی گیاه گلپر (۰/۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درصد) و یا رقت‌های مختلف روتین (از فلاونوئیدهای غالب در گیاهان)، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۲ در صد اضافه شده و سپس با ۳ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ درصد ترکیب گردید. پس از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر قرائت شد. سپس منحنی استاندارد رسم شده و مقدار فلاونوئید عصاره

نمونه‌های بافت پوستی محاسبه گردید. این شاخص جهت استاندارد کردن شاخص‌های بیوشیمیایی: مالون‌دی آلدئید (Malondialdehyde) MDA، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (Total antioxidant capacity) TAC، هیدروکسی پرولین و GAGs اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان هیدروکسی پرولین و گلیکوز آمینوگلیکان‌ها (GAGs)

میزان هیدروکسی پرولین با استفاده از روش Oryan و همکاران و بر مبنای رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد (۲۵). میزان جذب نوری در ۵۴۶ نانومتر قرائت شده و بر اساس منحنی استاندارد مقدار هیدروکسی پرولین به دست آمد. مقادیر بر اساس میلی‌گرم پروتئین، استاندارد شده و بر اساس میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

میزان GAGs نیز در بافت هضم شده پائین، با استفاده از دی‌متیل متیلن بلو (DMB) در مقایسه با سطوح مختلف استاندارد کوندرویتین سولفات اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان GAGs بر اساس میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (۲۶).

تعیین میزان مالون‌دی آلدئید

اندازه‌گیری این شاخص با استفاده از کیت Nalondi® خریداری شده از شرکت نوند سلامت، صورت گرفت. جذب نوری نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر قرائت شده و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت MDA مربوط به هر کدام از

خونریزی، شاخی شدن اپی‌تلیوم، ارتشاح سلول‌های پلی‌مورفونکلتر و سلول‌های تک‌هسته‌ای، اپیتلیزاسیون، واسکولاریتی، تعداد فیبروبلاست، ماکروفاژ، وجود فیبروسیت‌ها و بلوغ و سازماندهی کلاژن بود.

تعداد کل سلول‌ها (بزرگ‌نمایی ۲۸۰)، و تعداد فیبروبلاست‌ها، فیبروسیت‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و عروق خونی (بزرگ‌نمایی ۷۲۰) در ناحیه زخم مورد شمارش قرار گرفت و میانگین و انحراف معیار آن‌ها محاسبه شد. جهت تشخیص فیبروسیت و فیبروبلاست، بزرگ‌ترین سلول‌های بیضوی با سیتوپلاسم گرانوله فراوان و بازوفیلیک به عنوان فیبروبلاست تعیین شدند، در حالی که سلول‌های دراز سیگاری شکل با سیتوپلاسم گرانوله کمتر اما اتوزینوفیلیک بیشتر و وجود هسته متراکم، فیبروسیت در نظر گرفته شدند. علاوه بر این، سطح زخم، هم‌ترازی بافت، بلوغ بافت، واسکولاریتی و ادم اطراف عروقی بر اساس جداول ۱ و ۲ ارزیابی و امتیازدهی شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی

اندازه‌گیری پروتئین تام

جهت سنجش پروتئین تام از کیت شرکت نوند سلامت (Nadford) استفاده شد. اساس کار به روش برادفورد و با استفاده از رنگ کوماسی بلو G-250 می‌باشد. جذب نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر در میکروپلیت ریدر قرائت، و بر اساس منحنی استاندارد، غلظت پروتئین تام هر کدام از

جدول ۱. معیارهای امتیازدهی مورد استفاده برای تعریف سطح زخم، هم‌ترازی بافت و بلوغ بافت

امتیاز	مورفولوژی اپیدرم	فاصله‌ی بین لبه‌های زخم
(۰) نزدیک به نرمال	کاملاً بازسازی شده است	کمتر از ۵۰۰ میکرومتر
(۱) کاملاً بالغ	بیش از ۸۰ درصد بازسازی شده است	کمتر از ۱۰۰۰ میکرومتر
(۲) بالغ	بیش از ۵۰ درصد بازسازی شده است	کمتر از ۱۵۰۰ میکرومتر
(۳) نابالغ	کمتر از ۲۰ درصد بازسازی شده است	کمتر از ۲۰۰۰ میکرومتر
(۴) بسیار نابالغ	هیچ اپیدرمی تشکیل نشده است	بیش از ۲۰۰۰ میکرومتر
امتیاز	جهت الیاف کلاژن	جهت فیبروبلاست‌ها
(۰) نزدیک به نرمال	تقریباً همه در یک جهت	موازی با الیاف کلاژن
(۱) کاملاً بالغ	اغلب در یک جهت طولی بوده، اما در برخی مناطق الیاف کلاژن سازمان نیافته می‌باشند	بیش از ۷۵ درصد در جهت الیاف کلاژن
(۲) بالغ	بیش از یک جهت طولی	بیش از ۵۰ درصد در جهت الیاف کلاژن
(۳) نابالغ	جهت‌گیری نامنظم؛ الیاف کلاژن جهت‌گیری خاصی دارند اما جهت‌گیری طولی نیست (مثلاً الگوی دایره‌ای)	بیش از ۲۵ درصد در جهت الیاف کلاژن
(۴) بسیار نابالغ	بدون جهت قابل تشخیص	بدون جهت‌گیری
امتیاز	جمعیت سلولی	ظاهر الیاف کلاژن
(۰) نزدیک به نرمال	بیش از ۷۵ درصد فیبروسیت‌ها	بیش از ۷۵ درصد الیاف کلاژن متراکم هستند و اندازه‌ی بزرگی دارند
(۱) کاملاً بالغ	بیش از ۵۰ درصد فیبروسیت‌ها	بیش از ۵۰ درصد الیاف کلاژن متراکم هستند و اندازه‌ی بزرگی دارند
(۲) بالغ	بیش از ۲۵ درصد فیبروسیت‌ها	بیش از ۲۵ درصد الیاف کلاژن متراکم هستند و اندازه‌ی متوسطی دارند
(۳) نابالغ	بیش از ۷۵ درصد فیبروبلاست‌ها	الیاف کلاژن متراکم نیستند، اما اندازه‌ی متوسطی دارند
(۴) بسیار نابالغ	سلول‌های التهابی غالب هستند	الیاف کلاژن متراکم نیستند، اما اندازه‌ی کوچکی دارند

سطح زخم

تراز بافتی

بلوغ بافت

جدول ۲. معیارهای امتیازدهی مورد استفاده برای تعریف واسکولاریتی و

ادم اطراف عروقی

واسکولاریتی	
امتیاز	تعداد عروق و قطر آنها
(۰) نزدیک به نرمال	تا ۴ رگ، همه با قطر بزرگ
(۱) کاملاً بالغ	۵ تا ۱۰ رگ، ۷۰ درصد بزرگ
(۲) بالغ	۱۱ تا ۲۰ رگ، ۵۰ درصد بزرگ
(۳) نابالغ	۲۱ تا ۳۰ رگ، کمتر از ۲۰ درصد بزرگ و بقیه کوچک
(۴) بسیار نابالغ	بیش از ۳۰ رگ و تقریباً در اندازه کوچک
ادم اطراف عروقی	
امتیاز	شرح
(۰) نرمال	هیچ ادمی در اطراف عروق دیده نمی‌شود
(۱) خفیف	وجود ادم در اطراف عروق کوچک
(۲) شدید	وجود ادم در اطراف عروق بزرگ

زخم به ترتیب در گروه‌های عصاره‌های ۱۰ و ۵ درصد میوه گلپر مشاهده شد که این اختلاف در مقایسه با گروه‌های شاهد و کرم پایه معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در مقایسه بین دو گروه درمان با عصاره‌های ۵ و ۱۰ درصد میوه گلپر، هرچند سرعت بسته شدن زخم در گروه عصاره‌ی ۱۰ درصد در همه‌ی روزهای آزمایش بیشتر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) (شکل ۱) (جدول ۳).

نتایج پاتولوژی

مشاهدات کلی

در روز ۷ پس از ایجاد زخم، یک بافت گرانوله ضخیم شامل عروق خونی تازه تشکیل شده و فیبروبلاست‌های فراوان در ناحیه‌ی زخم در همه حیوانات مشاهده شد، اما میزان بافت اسکار در گروه تیمار شده با عصاره‌ی ۵ و ۱۰ درصد میوه گلپر، بیشتر از سایر گروه‌ها بود. در این مرحله، زخم‌های تیمار شده با عصاره‌ی ۱۰ درصد، بالاترین میزان تشکیل اپی‌تلیوم را نشان دادند و برعکس گروه شاهد حداقل اپیتلیزاسیون مجدد را داشتند. زوائد پوستی مانند فولیکول‌های مو یا غدد در بافت درم هیچ کدام از گروه‌ها وجود نداشت. نفوذ سلول‌های التهابی متعدد شامل لنفوسیت‌ها، پلاسماسل‌ها و ماکروفاژها در درمیس، به‌ویژه در قسمت‌های عمیق‌تر ضایعات در تمام گروه‌ها مشاهده شد. همچنین تعداد زیادی فیبروبلاست و تعداد کمتری فیبروسیت در درم مشاهده شد. در ضایعات درمان شده با عصاره ۵ و ۱۰ درصد تعداد سلول‌های التهابی، میزان ادم اطراف عروقی و رسوب فیبرینوژن در مقایسه با سایر گروه‌ها کمتر بود. به طور کلی، کلاژن‌های تازه سنتز شده هنوز سازماندهی نشده بودند و دارای الگوی توزیع تصادفی در همه گروه‌ها بودند (شکل ۲).

در روز ۱۴ پس از ایجاد زخم، گروه شاهد و کرم پایه کمترین میزان اپیتلیزاسیون مجدد را نشان دادند، در حالی که اپی‌تلیال‌سازی مجدد در زخم‌هایی که با عصاره‌ی میوه گلپر درمان شده بودند بهتر بود و لایه پایه اپیدرمی محکم‌تر به درم متصل شده بود. اگرچه اپیدرم تشکیل شده، به ویژه در مقایسه با پوست طبیعی مجاور در همه‌ی گروه‌ها ضخیم و نامنظم بود، اما اندازه‌ی آن کاهش یافته و در ضایعات درمان شده با عصاره گلپر نسبت به سایر گروه‌ها، سازماندهی بهتری داشت. افزایش تعداد فیبروبلاست‌ها و رسوب کلاژن در تمام گروه‌های آزمایشی مشهود بود. با این حال، فیبرهای کلاژن در درم در گروه‌های تیمار شده با عصاره میوه گلپر در مقایسه با گروه‌های تیمار نشده، سازمان‌یافته‌تر و فشرده‌تر بودند. تیمار با عصاره‌ی میوه گلپر باعث کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش تعداد عروق خونی و همچنین قطر آنها در ناحیه زخم در مقایسه با گروه شاهد شد (شکل ۲).

در روز ۲۱ پس از ایجاد زخم، زخم‌های درمان شده با عصاره‌ی میوه گلپر به صورت کامل بسته شده بودند، در حالی که اپیتلیزاسیون مجدد زخم‌ها

نمونه‌ها محاسبه و به‌صورت مول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

تعیین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

میزان این شاخص با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت نوند سلامت (Naxifer®) اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌ها توسط میکروپلیت ریدر و در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت و غلظت TAC با استفاده از منحنی استاندارد و به صورت میلی‌مول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

تحلیل آماری

پس از تأیید نرمال بودن توزیع داده‌های کمی با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه شدند. برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در خصوص داده‌های نیمه کمی، برای ارزیابی تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون‌های ناپارامتری Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۶ (version 26, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام و سطح آماری معنی‌دار $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

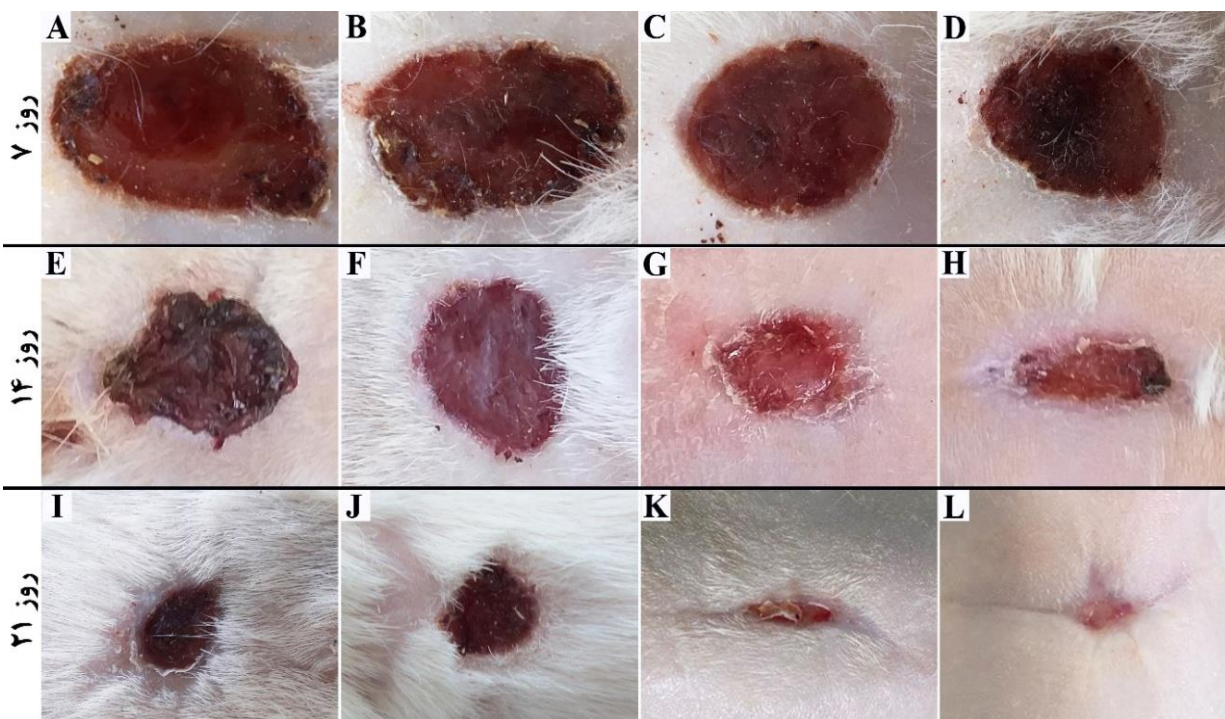
یافته‌ها

فیتوشیمی میوه گلپر

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه گلپر نسبتاً قوی بوده و IC_{50} آن $0/11 \pm 180/31$ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. میزان ترکیبات فنولی تام (معادل اسید گالیک) و فلاونوئید (معادل روتین) میوه گلپر به ترتیب $6/34 \pm 52/91$ و $8/46 \pm 54/04$ میلی‌گرم بر گرم محاسبه شد.

ارزیابی کمی اندازه‌گیری سطح زخم

در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد زخم، بیشترین میزان بسته شدن



شکل ۱. تصاویر ماکروسکوپی زخم در گروه‌های شاهد (A, E, I)، کرم پایه (B, F, J)، عصاره‌ی ۵ درصد (C, G, K) و عصاره‌ی ۱۰ درصد (D, H, L) در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد ضایعه

جدول ۳. درصد بسته شدن سطح زخم در گروه‌ها و روزهای مختلف پس از ایجاد زخم.

روز	شاهد	کرم پایه	کلپر ۵ درصد	کلپر ۱۰ درصد
روز ۷	۳۰/۳۰ ± ۳/۲۰ ^a	۳۱/۵۸ ± ۳/۷۱ ^a	۳۸/۶۴ ± ۵/۳۹ ^b	۴۲/۶۵ ± ۳/۶۲ ^b
روز ۱۴	۵۳/۳۷ ± ۵/۲۰ ^a	۵۵/۴۲ ± ۵/۱۸ ^a	۶۴/۴۵ ± ۳/۹۸ ^b	۷۰/۱۵ ± ۶/۰۷ ^b
روز ۲۱	۸۰/۲۳ ± ۲/۸۱ ^a	۸۰/۶۷ ± ۱/۹۳ ^a	۹۰/۹۷ ± ۳/۵۶ ^b	۹۳/۵۶ ± ۱/۶۱ ^b

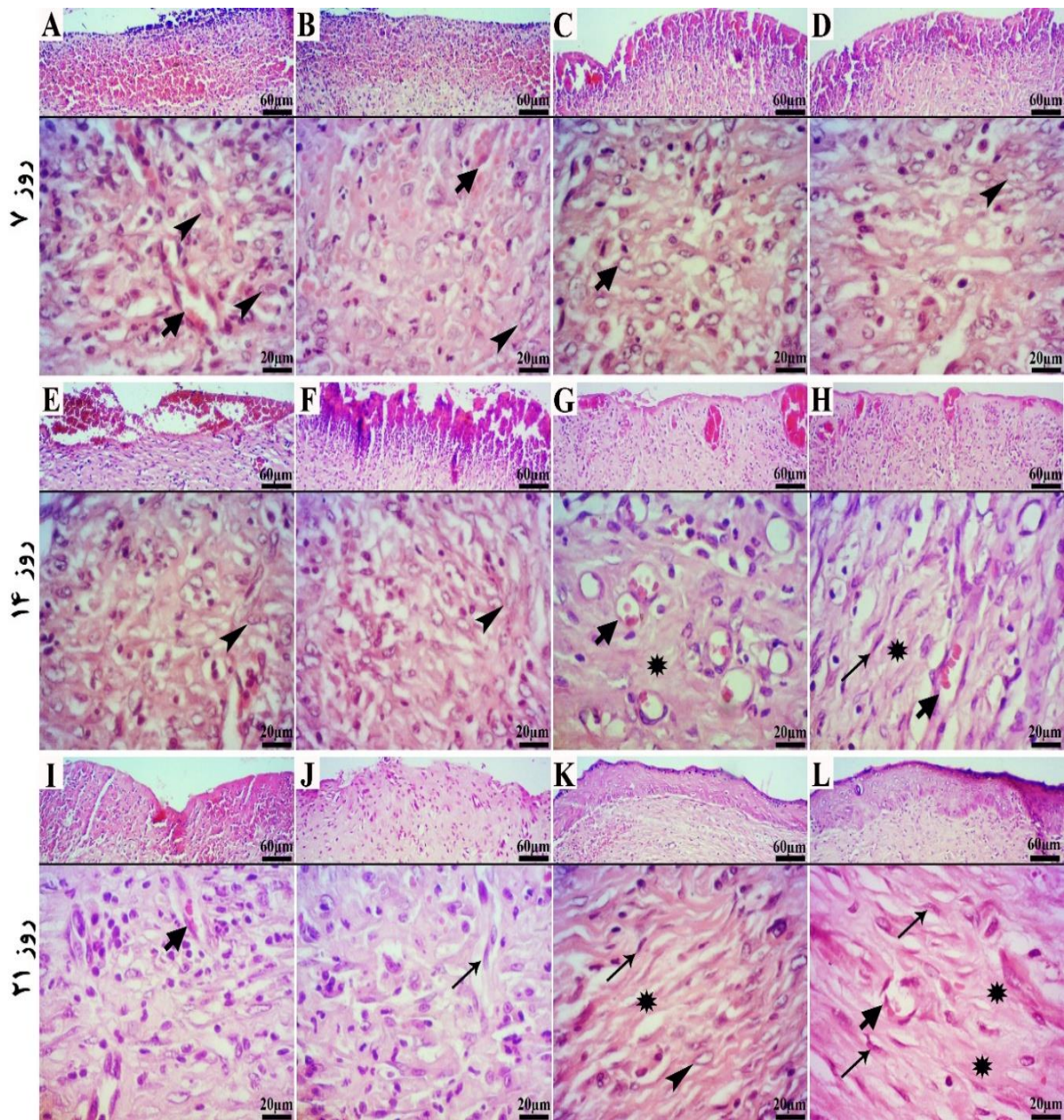
داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مقایسه و به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند. حروف مختلف در یک ردیف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. نتایج با $P < 0.05$ ارائه شده‌اند.

(P). گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی میوه گلپر دارای تعداد فیبروسیت بیشتری در مقایسه با گروه کرم پایه و شاهد بودند، اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). بیشترین تعداد فیبروبلاست، به ترتیب در گروه‌های تیمار شده با عصاره ۵ و ۱۰ درصد مشاهده شد و این تفاوت بین این گروه‌های تیمار شده با عصاره در مقایسه با گروه کرم پایه و گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). کاهش معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌ها در گروه ۱۰ درصد عصاره‌ی میوه گلپر در مقایسه با کرم پایه و گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). میانگین تعداد ماکروفاژها در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی میوه گلپر، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). تعداد نوتروفیل‌ها در تمام ضایعات تیمار شده با عصاره‌ی میوه گلپر نسبت به گروه شاهد کاهش یافت، اما این تفاوت تنها برای گروه عصاره ۱۰ درصد میوه گلپر از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

در گروه شاهد و کرم پایه، کامل نبود. در زخم‌های درمان شده با عصاره‌ی میوه گلپر، اندازه‌ی بافت اسکار کوچک‌تر بود و نظم فیبرهای کلاژن نسبت به گروه‌های شاهد و کرم پایه بهبود یافته بود. علاوه بر این، تعداد لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها در گروه‌های تحت درمان، به ویژه در گروه عصاره ۱۰ درصد کاهش یافته بود و میزان بلوغ بافتی و تعداد رگ‌های خونی با اندازه‌ی بزرگ نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود (شکل ۲).

ارزیابی هیستوپاتولوژیک و هیستومورفومتریک

نتایج به دست آمده بر اساس ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک در جداول ۴ و ۵ خلاصه شده است. هفت روز پس از ایجاد زخم، درمان با عصاره‌های ۵ و ۱۰ درصد به طور قابل توجهی باعث کاهش تمامی سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد و کرم پایه شد ($P < 0.05$). تیمار با عصاره‌های ۵ و ۱۰ درصد به طور معنی‌داری تعداد عروق را نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داد ($P < 0.05$).



شکل ۲. مقاطع برش طولی اپیدرم و درم پوست در گروه‌های شاهد (A, E و I)، کرم پایه (B, F و J)، عصاره‌ی ۵ درصد (C, G و K) و عصاره‌ی ۱۰ درصد (D, H و L) در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد ضایعه (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). سرفلش: فیبروبلاست، فلش بلند: فیبروسیت، فلش کوتاه: رگ خونی، ستاره: رشته‌های کلاژن. در تمام روزهای آزمایش تعداد کل سلول‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی گلپر نسبت به سایر گروه‌ها کمتر است. همچنین تعداد سلول‌های التهابی در گروه‌های درمان در مقایسه با گروه‌های شاهد و کرم پایه کمتر است، که در روز ۲۱ تعداد این سلول‌ها به کمترین تعداد خود می‌رسد. هرچند تعداد عروق خونی در روز ۷ در گروه‌های درمان بیشتر است، اما در روزهای ۱۴ و ۲۱ از تعداد عروق خونی در گروه‌های درمان نسبت به سایر گروه‌ها کاسته شده، اما بر قطر آن‌ها افزوده شده است. در تمام روزهای آزمایش، اندازه‌ی بافت اسکار در گروه‌های درمانی کوچک‌تر بود و نظم فیبرهای کلاژن در این گروه‌ها نسبت به گروه‌های شاهد و کرم پایه بهبود یافته است.

جدول ۴. تجزیه و تحلیل هیستوپاتولوژیک و هیستومورفومتریک

شاهد	کرم پایه	کلپر ۵ درصد	کلپر ۱۰ درصد
تعداد کل سلول‌ها	۴۲۹/۵۰±۶/۴۴ ^a	۳۶۱/۷۰±۶/۶۶ ^b	۳۴۵/۱۵±۲/۵۸ ^b
تعداد عروق	۱۰/۷۰±۰/۳۳ ^a	۱۲/۵۰±۰/۳۵ ^b	۱۴/۱۵±۰/۳۹ ^c
فیبروبلاست و فیبروسیت‌ها	۲۲/۷۵±۰/۳۵ ^a	۲۵/۵۰±۰/۴۷ ^b	۲۹/۰۵±۰/۴۱ ^c
فیبروسیت‌ها	۶/۸۰±۰/۱۲ ^a	۷/۷۰±۰/۱۹ ^a	۸/۱۵±۰/۲۰ ^a
فیبروبلاست‌ها	۱۶/۱۰±۰/۴۲ ^{ab}	۱۷/۸۰±۰/۴۳ ^b	۲۰/۹۰±۰/۳۳ ^c
نسبت	۰/۴۲±۰/۰۱ ^a	۰/۴۳±۰/۰۲ ^a	۰/۳۹±۰/۰۱ ^a
لنفوسیت	۱۹/۵۵±۰/۵۱ ^a	۱۸/۶۵±۰/۴۷ ^{ab}	۱۷/۲۵±۰/۴۴ ^b
ماکروفاز	۱۸/۱۵±۰/۴۰ ^{ab}	۲۰/۱۰±۰/۳۰ ^b	۲۳/۵۰±۰/۴۷ ^c
نوتروفیل	۳/۹۵±۰/۴۲ ^a	۳/۰۰±۰/۴۰ ^{ab}	۲/۵۰±۰/۳۸ ^b
تعداد کل سلول‌ها	۳۰۷/۳۰±۴/۹۲ ^a	۲۲۲/۹۵±۴/۱۳ ^b	۱۷۸/۸۵±۳/۶۵ ^c
تعداد عروق	۱۱/۳۵±۰/۴۱ ^a	۹/۹۰±۰/۱۹ ^{ab}	۸/۸۰±۰/۳۴ ^b
فیبروبلاست و فیبروسیت‌ها	۲۲/۲۰±۰/۶۷ ^{ab}	۲۴/۲۵±۰/۵۹ ^b	۲۸/۳۰±۰/۵۱ ^c
فیبروسیت‌ها	۸/۲۰±۰/۱۷ ^a	۸/۷۵±۰/۲۶ ^a	۱۶/۸۵±۰/۵۴ ^c
فیبروبلاست‌ها	۱۴/۰۰±۰/۶۹ ^a	۱۰/۸۵±۰/۳۳ ^b	۱۱/۴۵±۰/۲۶ ^b
نسبت	۰/۶۲±۰/۰۴ ^a	۱/۲۵±۰/۰۶ ^b	۱/۴۹±۰/۰۷ ^b
لنفوسیت	۱۴/۶۵±۰/۴۳ ^a	۱۰/۰۰±۰/۴۳ ^c	۹/۳۰±۰/۵۸ ^c
ماکروفاز	۱۷/۳۵±۰/۲۹ ^a	۱۳/۶۰±۰/۴۳ ^b	۱۰/۵۵±۰/۵۱ ^c
نوتروفیل	۱/۸۵±۰/۲۷ ^a	۱/۴۵±۰/۲۲ ^a	۰/۹۵±۰/۲۱ ^a
تعداد کل سلول‌ها	۲۰۰/۷۰±۴/۷۴ ^a	۱۱۸/۷۰±۳/۵۶ ^b	۹۳/۱۵±۲/۹۱ ^c
تعداد عروق	۷/۰۵±۰/۲۶ ^a	۵/۲۵±۰/۱۸ ^b	۴/۲۵±۲/۲۶ ^b
فیبروبلاست و فیبروسیت‌ها	۲۶/۸۰±۰/۴۲ ^a	۳۳/۳۳±۰/۴۸ ^b	۳۵/۲۰±۰/۶۸ ^b
فیبروسیت‌ها	۱۵/۴۵±۰/۳۷ ^a	۱۶/۸۵±۰/۳۳ ^a	۲۹/۴۵±۰/۷۵ ^c
فیبروبلاست‌ها	۱۱/۳۵±۰/۲۴ ^a	۸/۲۰±۰/۲۹ ^b	۵/۷۵±۰/۴۰ ^c
نسبت	۱/۳۷±۰/۰۵ ^a	۳/۱۳±۰/۱۳ ^b	۵/۶۸±۰/۴۶ ^c
لنفوسیت	۸/۳۰±۰/۲۸ ^a	۸/۷۵±۰/۳۰ ^a	۵/۷۰±۰/۴۰ ^b
ماکروفاز	۱۰/۵۵±۰/۴۹ ^{ab}	۱۱/۳۰±۰/۵۳ ^a	۶/۱۰±۰/۵۶ ^c
نوتروفیل	۱/۲۰±۰/۲۴ ^a	۰/۷۵±۰/۱۴ ^a	۰/۷۰±۰/۱۵ ^a

داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مقایسه و به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند. حروف مختلف در یک ردیف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. نتایج با $P < ۰/۰۵$ ارائه شده‌اند.

جدول ۵. نمرات سطح زخم، تراز بافتی، بلوغ بافت، واسکولاریتی و ادم اطراف عروق در همه‌ی گروه‌های آزمایشی.

P ^d	P ^e	P ^b	P ^e a	کلپر ۱۰ درصد	کلپر ۵ درصد	کرم پایه	شاهد	
۰/۰۰۰	۰/۰۲۹	۰/۵۱۳	۰/۰۰۰	۳/۰۵±۰/۰۵ ۳ (۳-۴)	۳/۳۵±۰/۱۱ ۳ (۳-۴)	۳/۶۰±۰/۱۱ ۴ (۳-۴)	۳/۷۰±۰/۱۱ ۴ (۳-۴)	سطح زخم
۰/۰۰۰	۰/۰۱۲	۰/۰۶۱	۰/۰۰۳	۳/۱۰±۰/۰۷ ۳ (۳-۴)	۳/۲۵±۰/۱۰ ۳ (۳-۴)	۳/۳۵±۰/۱۱ ۳ (۳-۴)	۳/۶۵±۰/۱۱ ۴ (۳-۴)	تراز بافتی
۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۲۸۸	۰/۰۰۰	۳/۳۰±۰/۱۱ ۳ (۳-۴)	۳/۳۵±۰/۱۱ ۳ (۳-۴)	۳/۷۵±۰/۱۰ ۴ (۳-۴)	۳/۹۰±۰/۰۷ ۴ (۳-۴)	بلوغ بافت
۰/۰۰۰	۰/۰۱۲	۰/۲۰۲	۰/۰۰۰	۳/۰۵±۰/۰۵ ۴ (۳-۴)	۳/۳۰±۰/۱۰ ۳ (۳-۴)	۳/۵۰±۰/۱۱ ۳/۵ (۳-۴)	۳/۷۰±۰/۱۰ ۴ (۳-۴)	واسکولاریتی
۰/۰۱۹	۰/۰۵۲	۰/۵۲۴	۰/۰۴۲	۰/۹۵±۰/۱۵ ۱ (۰-۲)	۱/۱۰±۰/۱۲ ۱ (۰-۲)	۱/۱۰±۰/۱۲ ۱ (۱-۲)	۱/۳۵±۰/۱۱ ۱ (۱-۲)	ادم اطراف عروق
۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۳۴۳	۰/۰۰۰	۱/۹۵±۰/۰۸ ۲ (۲-۳)	۲/۱۵±۰/۰۸ ۲ (۲-۳)	۲/۵۰±۰/۱۱ ۲/۵ (۲-۳)	۲/۶۵±۰/۱۱ ۳ (۲-۳)	سطح زخم
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۵۳	۰/۰۰۰	۲/۲۵±۰/۱۰ ۲ (۲-۳)	۲/۳۵±۰/۱۱ ۲ (۲-۳)	۳/۰۵±۰/۰۵ ۳ (۳-۴)	۳/۱۰±۰/۰۷ ۳ (۳-۴)	تراز بافتی
۰/۰۰۱	۰/۰۰۹	۰/۲۶۲	۰/۰۰۵	۲/۳۵±۰/۱۱ ۲ (۲-۳)	۱/۹۵±۰/۰۹ ۲ (۲-۳)	۲/۷۰±۰/۱۱ ۳ (۲-۳)	۲/۸۵±۰/۰۸ ۳ (۲-۳)	بلوغ بافت
۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۱۱۸	۰/۰۰۰	۲/۱۰±۰/۰۶ ۲ (۲-۳)	۲/۷۵±۰/۰۹ ۳ (۲-۳)	۳/۱۰±۰/۰۶ ۳ (۳-۴)	۳/۳۰±۰/۱۰ ۳ (۳-۴)	واسکولاریتی
۰/۰۱۱	۰/۰۷۳	۰/۹۸۵	۰/۰۰۹	۰/۵۰±۰/۱۱ ۰/۵ (۰-۱)	۰/۶۵±۰/۱۱ ۱ (۰-۱)	۰/۹۵±۰/۰۹ ۱ (۰-۲)	۰/۹۵±۰/۱۱ ۱ (۰-۲)	ادم اطراف عروق
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۳۲	۰/۰۰۰	۰/۵۰±۰/۱۱ ۰/۵ (۰-۱)	۰/۸۰±۰/۰۹ ۱ (۰-۱)	۱/۴۵±۰/۱۱ ۲ (۱-۲)	۱/۵۵±۰/۱۱ ۲ (۱-۲)	سطح زخم
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۷۰۸	۰/۰۰۰	۱/۱۰±۰/۰۶ ۲ (۱-۲)	۱/۴۰±۰/۱۱ ۱ (۱-۲)	۲/۲۰±۰/۰۹ ۲ (۲-۳)	۲/۲۵±۰/۱۰ ۲ (۲-۳)	تراز بافتی
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۶۸۱	۰/۰۰۰	۰/۸۵±۰/۰۸ ۱ (۰-۱)	۱/۱۵±۰/۱۱ ۱ (۰-۲)	۱/۸۰±۰/۰۹ ۲ (۱-۲)	۱/۸۵±۰/۰۸ ۲ (۱-۲)	بلوغ بافت
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۵۶	۰/۰۰۰	۱/۵۰±۰/۱۱ ۱/۵ (۱-۲)	۱/۷۰±۰/۱۰ ۲ (۱-۲)	۲/۲۵±۰/۰۹ ۲ (۲-۳)	۲/۵۵±۰/۱۱ ۳ (۲-۳)	واسکولاریتی
۰/۰۲۳	۰/۰۹۸	۰/۶۷۷	۰/۰۱۴	۰/۲۵±۰/۱۰ ۰ (۰-۱)	۰/۳۵±۰/۱۱ ۰ (۰-۱)	۰/۷۰±۰/۱۱ ۱ (۰-۱)	۰/۶۵±۰/۱۳ ۱ (۰-۲)	ادم اطراف عروق

داده‌ها با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis و Mann-Whitney مقایسه شدند. نتایج با $P < ۰/۰۵$ ارائه شده‌اند.

a: مقایسه‌ی بین همه‌ی گروه‌ها، b: مقایسه‌ی بین گروه شاهد و کرم پایه، c: مقایسه‌ی بین گروه شاهد و کلپر ۵٪ و d: مقایسه‌ی بین گروه شاهد و کلپر ۱۰٪.

گروه تحت درمان در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود، اما این تفاوت‌ها فقط برای گروه عصاره‌ی ۱۰ درصد معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).
۱۴ روز پس از ایجاد زخم، کم‌ترین تعداد کل سلول‌ها در گروه ۱۰ درصد عصاره‌ی میوه‌ی کلپر و پس از آن گروه عصاره‌ی ۵ درصد، کرم پایه و گروه شاهد مشاهده شد. تفاوت بین دو گروه تیمار شده با عصاره در مقایسه با گروه کرم پایه و گروه شاهد از

بر اساس تجزیه و تحلیل نیمه کمی، ضایعات درمان شده با دو دوز عصاره‌ی میوه‌ی کلپر، از نظر سطح زخم، هم‌ترازی بافت و بلوغ به طور قابل توجهی امتیاز بهتری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). حیوانات درمان شده با عصاره ۵ و ۱۰ درصد میوه‌ی کلپر در مقایسه با گروه شاهد نمره‌ی بهتری را از نظر واسکولاریتی داشتند ($P < ۰/۰۵$). امتیاز ادم اطراف عروقی در هر دو

عروقی در گروه عصاره‌ی ۱۰ درصد و پس از آن عصاره‌ی ۵ درصد، کرم پایه و گروه شاهد مشاهده شد. تفاوت امتیاز واسکولاریتی بین گروه‌های تحت درمان و شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$)، اما برای ادم اطراف عروقی، تنها تفاوت بین عصاره‌ی ۱۰ درصد و گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

میزان هیدروکسی پرولین

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، تیمار با عصاره‌های ۵ و ۱۰ درصد میوه‌ی گلپر به طور قابل توجهی میزان هیدروکسی پرولین در ناحیه‌ی زخم‌ها را نسبت به کرم پایه و گروه شاهد در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از درمان افزایش داد ($P < 0/05$). لازم به ذکر است که میزان هیدروکسی پرولین در گروه ۱۰ درصد عصاره در مقایسه با گروه ۵ درصد در هر سه روز نمونه‌گیری بیشتر بود، اما این تفاوت تنها در روز ۲۱ پس از ایجاد زخم، معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌ها

همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به واسطه‌ی استعمال عصاره‌ی میوه‌ی گلپر در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد زخم، نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0/05$). لازم به ذکر است که میزان این شاخص در گروه عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۱۰ درصد در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۵ درصد بیشتر بود ولی در هیچ‌کدام از روزهای نمونه‌گیری این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

میزان مالون دی آلدیید

همان‌طور که شکل ۵ نشان می‌دهد، استعمال عصاره‌ی ۵ درصد میوه‌ی گلپر در روزهای ۱۴ و ۲۱ و عصاره‌ی ۱۰ درصد در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد زخم، میزان MDA را نسبت به گروه شاهد و نیز گروه کرم پایه کمتر کرد ($P < 0/05$). در روز ۷ درمان، اگرچه عصاره‌ی ۵ درصد میزان این شاخص را نسبت به گروه شاهد و کرم پایه پایین آورد ولی این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). لازم به ذکر است که میزان این شاخص در گروه عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۱۰ درصد در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۵ درصد کمتر بود ولی این تفاوت تنها در روز ۷ درمان ($P < 0/05$) معنی‌دار بود.

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

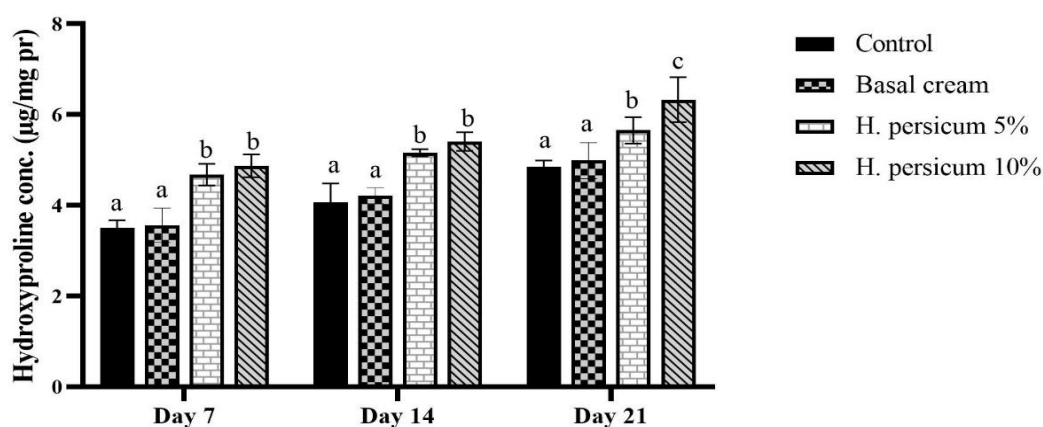
همان‌طور که شکل ۶ نشان می‌دهد، میزان TAC به‌واسطه‌ی دریافت هر دو غلظت عصاره (۵ و ۱۰ درصد) در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ درمان نسبت به گروه شاهد و گروه کرم پایه افزایش داشت ($P < 0/05$). اگرچه میزان این شاخص در گروه عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۱۰ درصد در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۵ درصد بیشتر بود ولی در هیچ‌کدام از روزهای نمونه‌گیری این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در این مرحله، گروه ۱۰ درصد عصاره‌ی میوه‌ی گلپر، تعداد عروق خونی کمتری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < 0/05$). تیمار با هر دو دوز عصاره باعث افزایش معنی‌دار تعداد فیبروسیت‌ها در مقایسه با کرم پایه و گروه شاهد شد ($P < 0/05$). تعداد فیبروبلاست‌ها در ضایعات تیمار شده با عصاره در مقایسه با سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/05$). کمترین تعداد لنفوسیت و ماکروفاژ به ترتیب در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی میوه‌ی گلپر ۵ و ۱۰ درصد مشاهده گردید. این تفاوت در مقایسه با گروه کرم پایه و شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). هرچند تعداد نوتروفیل‌ها در ضایعات تیمار شده با عصاره‌ی میوه‌ی گلپر کمتر از سایر گروه‌ها بود، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P < 0/05$).

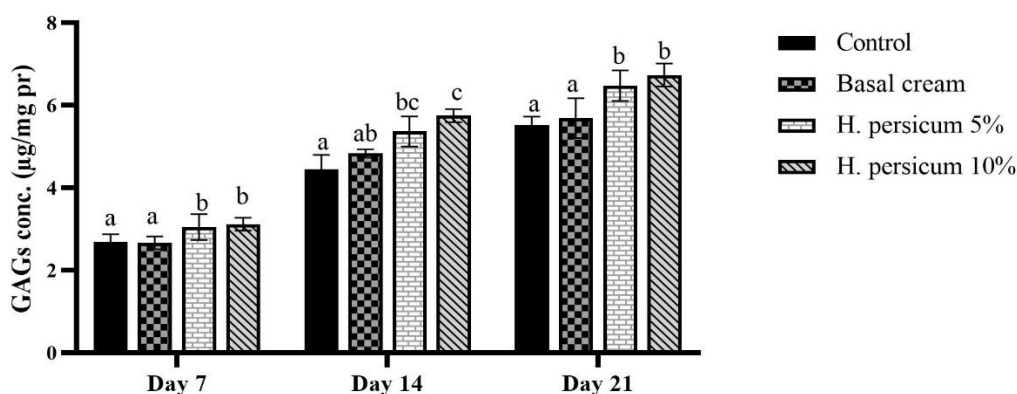
در این مرحله، تیمار با عصاره‌ی ۵ و ۱۰ درصد باعث کاهش معنی‌دار امتیاز سطح زخم و افزایش نمرات هم‌ترازی و بلوغ بافت نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0/05$). کاهش معنی‌داری در امتیاز واسکولاریتی در هر دو گروه عصاره نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). همچنین امتیاز ادم اطراف عروقی در ضایعات تحت درمان با عصاره کمتر از گروه شاهد بود، اما این تفاوت تنها در گروه ۱۰ درصد عصاره‌ی معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

۲۱ روز پس از ایجاد زخم، تعداد سلول‌های کل در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی میوه‌ی گلپر در مقایسه با کرم پایه و گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). در مقایسه‌ی بین گروه‌های تیمار شده، عصاره‌ی ۱۰ درصد دارای تعداد سلول‌های کمتری بود ($P < 0/05$). در این مرحله تعداد عروق خونی در گروه‌های تیمار شده با عصاره در مقایسه با کرم پایه و گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/05$). گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی میوه‌ی گلپر دارای بیشترین تعداد فیبروسیت و کمترین تعداد فیبروبلاست در مقایسه با کرم پایه و گروه شاهد بودند. کمترین تعداد لنفوسیت و ماکروفاژ در گروه ۱۰ درصد عصاره و پس از آن عصاره‌ی ۵ درصد، کرم پایه و گروه شاهد مشاهده شد. تفاوت بین گروه ۱۰ درصد عصاره با گروه کرم پایه و گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). هرچند موش‌های گروه عصاره ۵ و ۱۰ درصد در مقایسه با کرم پایه و شاهد، تعداد نوتروفیل کمتری داشتند، اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

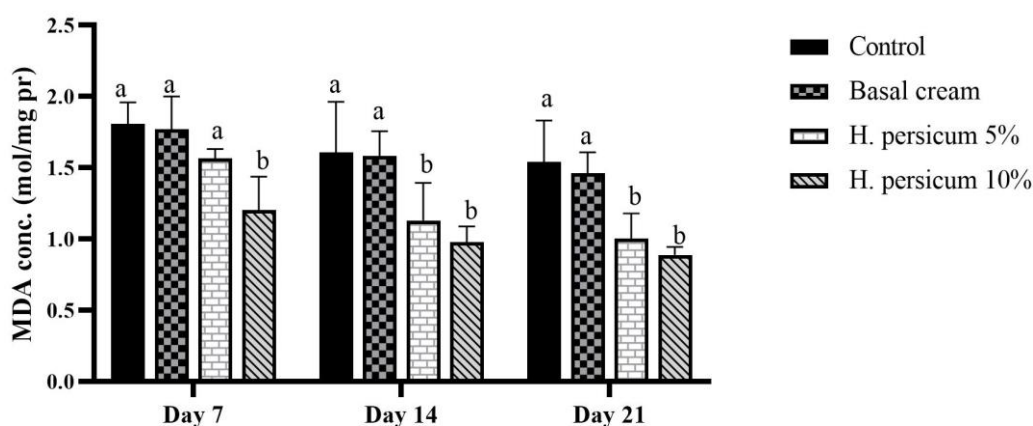
بر اساس امتیازدهی نیمه کمی، کاهش معنی‌داری در امتیاز سطح زخم در هر دو گروه تیمار شده با عصاره‌ی میوه‌ی گلپر نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). اسکارها در ضایعات تیمار شده با عصاره‌ی ۵ و ۱۰ درصد نسبت به ضایعات گروه شاهد امتیاز بهتری از نظر هم‌ترازی و بلوغ بافت داشتند ($P < 0/05$). کمترین امتیاز واسکولاریتی و ادم اطراف



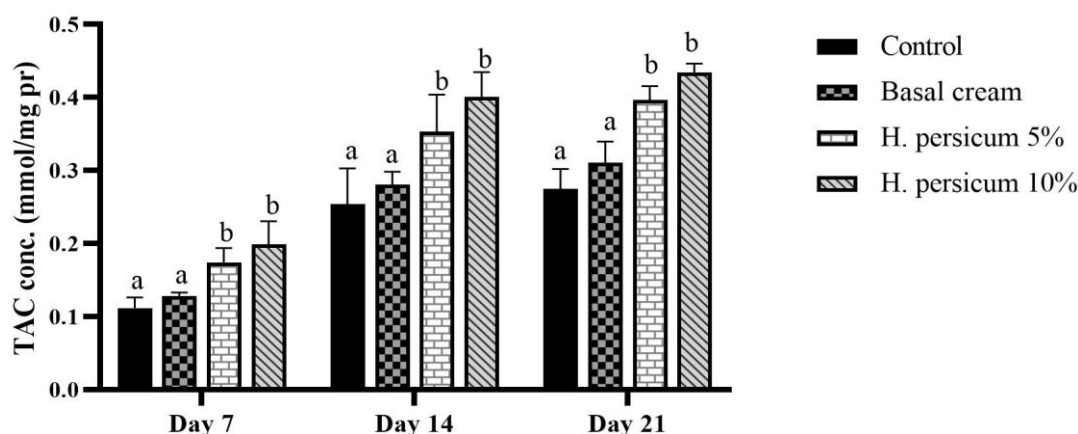
شکل ۳. میزان هیدروکسی پرولین در گروه‌های آزمایشی در روزهای مختلف پس از آسیب. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نشان داده شده‌اند. حروف مختلف در ستون‌های مربوط به هر کدام از روزهای نمونه‌گیری، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مقایسه شدند.



شکل ۴. میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در گروه‌های آزمایشی در روزهای مختلف پس از آسیب. داده‌های مختلف به صورت میانگین \pm خطای معیار نشان داده شده‌اند. حروف مختلف در ستون‌های مختلف مربوط به هر کدام از روزهای نمونه‌گیری، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مقایسه شدند.



شکل ۵. میزان مالون دی‌آلدهید در مقاطع زخم پوستی در گروه‌های مختلف. داده‌های مختلف به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. حروف مختلف در ستون‌های مختلف مربوط به هر کدام از روزهای نمونه‌گیری، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مقایسه شدند.



شکل ۶. میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در مقاطع زخم پوستی در گروه‌های مختلف. داده‌های مختلف به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. حروف مختلف در ستون‌های مختلف مربوط به هر کدام از روزهای نمونه‌گیری، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مقایسه شدند.

فیبروبلاست‌ها در این مرحله در ناحیه‌ی زخم مشاهده شد. این یافته‌های پاتولوژی تفاوت معنی‌دار بین اندازه‌ی سطح زخم در موش‌های درمان شده با عصاره‌ی میوه گلپر در مقایسه با سایر گروه‌ها را تأیید می‌کند. انقباض زخم در واقع فرایندی است که در آن پوست طبیعی اطراف زخم برای پوشاندن ناحیه‌ی برهنه شده به حرکت در می‌آید و شامل فعل و انفعالات پیچیده و هماهنگ بین سلول‌ها، ماتریکس خارج سلولی و سیتوکین‌ها می‌باشد (۳۰). شاید بتوان این‌گونه بیان کرد که اثر ضد التهابی میوه‌ی گیاه گلپر و همچنین تأثیر مثبت آن بر بلوغ و سازماندهی بافت گرانوله موجب افزایش سرعت بسته شدن زخم و کاهش مدت زمان ترمیم در موش‌های تحت درمان با میوه این گیاه شده است.

در طی مراحل اولیه‌ی بهبود زخم، سلول‌های اپی‌تلیال تکثیر می‌شوند و از لبه‌های زخم شروع به مهاجرت می‌کنند و در نهایت آن را می‌پوشانند. تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها و نیز فیبروبلاست‌ها نیازمند اکسیژن‌رسانی کافی در ناحیه زخم می‌باشد. تغذیه و اکسیژن‌رسانی به سلول‌ها، افزایش بلوغ فیبروبلاست‌ها و نیز تولید کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها در گرو عملکرد صحیح عروق خونی می‌باشد (۳۱). تأمین اکسیژن با ۲ مکانیسم ممکن است: افزایش میزان جریان خون در عروق خونی موضع و یا از طریق عروق تازه تشکیل شده به واسطه افزایش رگ‌زایی در محل زخم (۳۲). وجود تعداد زیادی عروق خونی در ضایعات درمان شده با عصاره‌ی میوه‌ی گلپر در مراحل اولیه ترمیم زخم (روز ۷ پس از ایجاد ضایعه)، نشان‌دهنده‌ی آن است که این گیاه یک عامل محرک رگ‌زایی است و به نظر می‌رسد مکانیسم دوم، وظیفه تأمین خون و اکسیژن بیشتر را بر عهده دارد.

در روز ۱۴ پس از ایجاد ضایعه، حضور اپیدرم به میزان بیشتر (اپی‌تلیال‌سازی بیشتر)، کاهش تعداد سلول‌ها و هم‌ترازی و سازماندهی

بحث

وجود ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین و دیگر متابولیت‌های ثانویه در برخی گیاهان دارویی موجب شده است که این گیاهان در فرایند ترمیم زخم مؤثر باشند (۲۳، ۲۷).

گیاه گلپر با نام علمی *Heracleum persicum* غنی از ترکیبات فیتوشیمیایی همچون مواد فرار، ترپنوئیدها، تری‌ترپن‌ها، فورانوکو مارین ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها می‌باشد (۱۵). فعالیت‌های بیولوژیک متعددی مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، ضد باکتری، ضد قارچ و ... از این گیاه گزارش شده است (۱۶، ۱۷). تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اثرات ترمیم زخم گیاه گلپر انجام نشده است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره‌ی میوه‌ی گیاه گلپر بر ترمیم زخم پوستی تمام ضخامت بر شی در موش صحرائی صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی میوه‌ی گیاه گلپر توانست ضایعات هیستوپاتولوژی در محل زخم را تا حد زیادی بهبود بخشد. عصاره‌ی این گیاه همچنین میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و هیدروکسی پرولین را در موضع زخم افزایش داده و با کاهش میزان مالون دی‌آلدئید و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام توانست موجب تخفیف استرس اکسیداتیو گردد.

نتایج هیستوپاتولوژی این مطالعه نشان داد که کاربرد موضعی عصاره‌ی هیدروآتانولی میوه‌ی گیاه گلپر سرعت ترمیم زخم را بالا می‌برد. افزایش سرعت ترمیم زخم در اثر عصاره‌ی این گیاه می‌تواند به دلیل اثرات ضد التهاب و تعدیل‌کننده‌ی ایمنی باشد که در مطالعات دیگر اثبات شده است (۲۸، ۲۹). استعمال موضعی کرم حاوی عصاره‌ی گلپر در مراحل اولیه ترمیم زخم (فرایندهای التهابی) موجب بهبود فیبروبلاستی و بازسازی زخم شد. علاوه بر این، کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش بلوغ و تمایز

اسید اوریک و ... می‌باشد (۳۶)، که اندازه‌گیری تک تک آن‌ها وقت‌گیر و پرهزینه است، بنابراین TAC تخمین مفیدی از فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در یک محیط می‌باشد.

تولید گونه‌های فعال اکسیژن همچون آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن در محل برش پوست و زخم جراحی در مطالعات قبل به اثبات رسیده است. افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر تکثیر سلولی اثر گذاشته و از طریق آسیب به غشای سلولی، پروتئین‌ها و DNA می‌تواند موجب آپوپتوز شود. تولید مداوم رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محل زخم عملکرد سلول‌های پوست (فیبروبلاست‌ها، کراتینوسیت‌ها و غیره) را به خطر می‌اندازد و باعث التهاب، نکروز و اسکار فیبروتیک می‌شود و در نهایت روند ترمیم بافت را به تأخیر می‌اندازد (۳۷). از دیگر شاخص‌های مورد بررسی در این مطالعه، فاکتورهای مربوط به استرس اکسیداتیو شامل MDA و TAC بود. بر اساس نتایج بدست آمده، استفاده از کرم حاوی عصاره میوه گیاه کلپر موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و کاهش مالون‌دی‌آلدئید در مقاطع بافت پوستی درمان شده در مقایسه با گروه شاهد و کرم پایه در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ایجاد ضایعه گردید.

در توضیح تغییرات ایجاد شده در غلظت این شاخص‌ها، می‌توان این‌گونه بیان کرد که گونه‌های فعال اکسیژن در تمام حیوانات که زخم را تجربه کردند، موجب آسیب به غشای سلول‌ها و به دنبال آن افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید گردید و تیمار با عصاره میوه گیاه کلپر توانست میزان این شاخص را در روزهای مختلف پس از درمان کاهش دهد. همچنین، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به واسطه آسیب و جراحت وارده به بافت پوست موجب مصرف فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی مثل آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون احیا و سایر آنزیم‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی و یا حتی عواملی مانند ویتامین C، ویتامین E و ... شده است، در حالی که عصاره میوه گیاه کلپر به دلیل حضور متابولیت‌های ثانویه مختلف و نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا (IC50 نسبتاً پایین گیاه) تا حد زیادی این دفاع را احیا و جبران کرده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام موضع زخم (TAC) را افزایش داده است.

از طرف دیگر شاید میزان پایین TAC که برآیند تمام شاخص‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی است، در گروه‌های شاهد و کرم پایه این فرصت را به رادیکال‌های آزاد اکسیژن داده است تا آسیب بیشتری در بافت ایجاد کنند. در مطالعه‌ای که سابق بر این انجام شده، گزارش شده است که گروه‌های فنولی موجود در عصاره گیاه کلپر به عنوان دهنده هیدروژن عمل کرده که خود مبین فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد (۱۷). در مطالعه‌ی حاضر نیز حضور

بهتر فیبرهای کلاژن از مهم‌ترین یافته‌های پاتولوژی بود. کاهش تعداد سلول‌ها و به‌ویژه تعداد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را می‌توان به دلیل اثر ضدالتهابی عصاره میوه گیاه کلپر دانست. مطالعات قبلی حضور فورانوکو مارین‌های مختلف از جمله اسفون‌دین را در عصاره میوه هیدروکلی کلپر گزارش کرده‌اند (۲۸). گفته شده اسفون‌دین می‌تواند بیان سیکلواکسیژناز القا شده با ایترلوکین ۱-بتا را مهار کند. این آنزیم با تولید پروستاگلاندین‌های مختلف، نقش کلیدی در بروز التهاب دارد، بنابراین مهار آنزیم سیکلواکسیژناز توسط اسفون‌دین می‌تواند گویای اثرات ضدالتهابی عصاره میوه گیاه کلپر باشد (۳۳).

در روز ۲۱ پس از ایجاد ضایعه، اپیتلیزاسیون مجدد در زخم‌های درمان شده با میوه گیاه کلپر منظم‌تر و کامل‌تر بود. علاوه بر این، زخم‌های درمان شده با عصاره میوه گیاه کلپر دارای تعداد لنفوسیت و ماکروفاژ کمتر و تعداد فیبروسیت بیشتر، بلوغ و تراز بافتی بهتر بودند و قطر عروق خونی تازه تشکیل شده نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود.

به طور خلاصه می‌توان گفت که کرم حاوی عصاره میوه گیاه کلپر، توانست سرعت و کیفیت تشکیل اپی‌تلیال مجدد و تشکیل بافت اسکار را در کوتاه‌مدت به میزان قابل توجهی افزایش دهد. همچنین عصاره این گیاه در طولانی‌مدت موجب کاهش التهاب و بهبود بلوغ فیبروبلاست‌ها شده و در نهایت با تراز کردن فیبرهای کلاژن موجب کاهش اندازه‌ی بافت اسکار شد.

از دیگر شاخص‌های مورد بررسی در این مطالعه میزان هیدروکسی پرولین و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها بود. هیدروکسی پرولین یکی از اسید آمینه‌های اصلی تشکیل‌دهنده پروتئین کلاژن است، به همین دلیل در آزمون‌های بیوشیمی به‌عنوان شاخصی از میزان کلاژن موجود در بافت اندازه‌گیری می‌شود (۳۴) و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) مولکول‌های کربوهیدرات پیچیده بزرگی هستند که در سازمان‌دهی رشته‌های نازک کلاژن نقش مهمی ایفا می‌کنند. در این مطالعه عصاره میوه گیاه کلپر موجب افزایش میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و نیز میزان هیدروکسی پرولین گردید. کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها از اجزای ماتریکس خارج سلولی بوده که توسط فیبروبلاست‌ها تولید می‌شوند و بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره میوه گیاه کلپر با ایجاد پاسخ فیبروبلاستی قوی توانسته است موجب افزایش مقدار گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و هیدروکسی پرولین شود.

استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و غیر فعال کردن آن‌ها توسط بدن است. MDA یکی از فرآورده‌های اصلی پراکسیداسیون لیپیدها بوده و به راحتی در سرم، پلاسما و هموژنات بافت‌های مختلف اندازه‌گیری می‌شود (۳۵). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و ... و غیر آنزیمی شامل ویتامین A، C، بتاکاروتن،

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره میوه گلپر در درمان زخم‌های پوستی می‌تواند پارامترهای هیستوپاتولوژیک و هیستومورفومتریک را بهبود دهد. علاوه بر این، داروی ذکر شده باعث افزایش قابل توجه میزان گلیکوزآمینوگلیکان و محتوای هیدروکسی پرولین در مراحل مختلف بهبود زخم می‌شود. نتایج مربوط به استرس اکسیداتیو در این مطالعه کاملاً با نتایج پاتولوژی مطابقت داشت و به نوعی تأییدکننده نتایج مذکور بود، چرا که در گروه‌های بدون درمان بوا سطح تشدید استرس اکسیداتیو روند ترمیم زخم به کندی صورت گرفته در حالی که درمان با عصاره میوه گلپر موجب تسریع فرایند ترمیم زخم گردید. اثرات محافظتی و ترمیم‌کنندگی عصاره میوه گلپر بر زخم پوستی احتمالاً به دلیل محتوای غنی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بوده که خود موجب تقویت خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی به شماره ۷۸۷۴۹۳۰۵ می‌باشد. بدین وسیله از زحمات کلیه همکاران و کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه به ویژه بخش پاتولوژی تشکر و قدردانی می‌گردد. هیچ کلام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

پررنگ ترکیبات فنولی گزارش شده است. از آنجا که ترکیبات فنولی نقش مهمی در جذب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) دارند (۳۸)، کاهش میزان مالون دی‌آلدئید توسط عصاره میوه گلپر کاملاً منطقی به نظر می‌رسد چرا که به واسطه حضور ترکیبات فنولی در عصاره میوه این گیاه، میزان ROS کاهش یافته و مجال کافی جهت پراکسیداسیون لیپیدهای موضع زخم را نیافته‌اند، لذا میزان MDA در موضع با استعمال عصاره میوه گلپر کاهش یافته است. همچنین در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده و فیتوشیمی گیاه گلپر را بررسی کرده است، حضور فلاونوئیدهای مختلف از جمله کوئرستین، کامپفرول-۷-گلوکوزید، آپیزین و... گزارش شده است (۳۹). اثرات این فلاونوئیدها در مطالعات مختلف علیه استرس اکسیداتیو و بعضاً ترمیم زخم بررسی گردید (۴۰-۴۲). در مطالعه حاضر نیز محتوای غنی فلاونوئید گلپر تأیید شد. بنابراین تخفیف و بهبود استرس اکسیداتیو در مطالعه حاضر را می‌توان به حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهای مذکور نسبت داد. عدم بررسی سایر مکانیسم‌های دخیل در اثرات ترمیم‌کنندگی عصاره میوه گلپر در زخم پوستی، مانند اثرات ضدالتهابی و یا سنجش دیگر شاخص‌های مربوط به ترمیم زخم همچون ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) از محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات دیگر به بررسی دیگر جنبه‌های مکانیسم اثرات محافظتی و ترمیم‌کنندگی زخم پوستی پرداخته شود.

References

- Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L, et al. Regenerative Skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36(1): 1-23.
- Tavakoli A, Vazirinejad R, Ansari Jaber A, Negahban T, Mashayekhi H, Nazari M, et al. Effect of Teucrium polium extract on skin wound healing in rat [in Persian]. *Hormozgan Medical Journal* 2012; 16(1): 17-24.
- Wang G, Yang F, Zhou W, Xiao N, Luo M, Tang Z. The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. *Biomed Pharmacother* 2023; 157: 114004.
- Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem* 2023; 11: 1158198.
- de Oliveira Gonzalez AC, Costa TF, de Araújo Andrade Z, Medrado AR. Wound healing-A literature review. *An Bras Dermatol* 2016; 91(5): 614-20.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev* 2019; 99(1): 665-706.
- Manou D, Caon I, Bouris P, Triantaphyllidou IE, Giaroni C, Passi A, et al. The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues. *Methods Mol Biol* 2019; 1952: 1-20.
- Cramer MC, Badylak SF. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. *Ann Biomed Eng* 2020; 48(7): 2132-53.
- Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4(3): 119-36.
- Bayer IS. Hyaluronic acid and controlled release: a review. *Molecules* 2020; 25(11): 2649.
- Atiyeh BS, Gunn SW, Hayek SN. State of the art in burn treatment. *World J Surg* 2005; 29(2): 131-48.
- Vitale S, Colanero S, Placidi M, Di Emidio G, Tatone C, Amicarelli F, et al. Phytochemistry and biological activity of medicinal plants in wound healing: an overview of current research. *Molecules* 2022; 27(11): 3566.
- Farzaei MH, Khanavi M, Moghaddam G, Dolatshahi F, Rahimi R, Shams-Ardekani MR, et al. Standardization of *Tragopogon graminifolius* DC. extract based on phenolic compounds and antioxidant activity. *J Chem* 2014; 2014(1): 425965.
- Hanachi P, Gharari Z, Sadeghinia H, Walker TR. Synthesis of bioactive silver nanoparticles with eco-friendly processes using *Heracleum persicum* stem extract and evaluation of their antioxidant,

- antibacterial, anticancer and apoptotic potential. *J Mol Struct* 2022; 1265: 133325.
15. Hemati A, Azarnia M, Angaji SA. Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle East J Sci* 2010; 5(3): 174-6.
 16. Asgarpanah J, Dadashzadeh Mehrabani G, Ahmadi M, Ranjbar R, Safi-Aldin Ardebily M. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Heracleum persicum* Desf. *Ex Fischer: A review. J Med Plants Res* 2012; 6(10): 1813-20.
 17. Majidi Z, Sadati Lamardi SN. Phytochemistry and biological activities of *Heracleum persicum*: A review. *J Integr Med* 2018; 16(4): 223-35.
 18. Hemmati AA, Rashidi I, Dahanzadeh S, Moeini M. Investigating the healing effect of the hydroalcoholic extract of pomegranate seed (*Punica granatum*) on the full thickness wound in rabbit. *J Contemp Med Sci* 2020; 6(2): 66-72.
 19. Tekleyes B, Huluka SA, Wondu K, Wondmkun YT. Wound healing activity of 80% methanol leaf extract of *Zehneria scabra* (Lf) Sond (Cucurbitaceae) in mice. *J Exp Pharmacol* 2021; 31: 537-44.
 20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 1995; 28(1): 25-30.
 21. Lamuela-Raventós RM. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F, editors. *Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications*. 1st ed. New York, NY: John Wiley & Sons Ltd; 2018. p. 107-15.
 22. Nugroho AE, Malik A, Pramono S. Total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antihypertension activity of purified extract of Indonesian cashew leaves (*Anacardium occidentale* L.). *Int Food Res J* 2013; 20(1): 299-305.
 23. Hoseinpour F, Hashemnia M, Cheraghi H, Safikhani R, Sheikhi T, Hasani Z. Assessment of antioxidant and cutaneous wound healing effects of *Ornithogalum cuspidatum* hydroalcoholic extract in male Wistar rats. *J Basic Clin Pathophysiol* 2021; 9(1): 23-32.
 24. Derakhshanfar A, Kian M, Dehghan Z, Valizadeh A, Moayedi J. Comparison of the effects of two methods of euthanasia on post mortem changes in rats: histopathological and molecular findings. *Comp Clin Path* 2022; 31(5): 815-26.
 25. Oryan A, Mohammadalipour A, Moshiri A, Tabandeh MR. Avocado/soybean unsaponifiables: a novel regulator of cutaneous wound healing, modelling and remodelling. *Int Wound J* 2015; 12(6): 674-85.
 26. Goudarzi F, Mohammadalipour A, Bahabadi M, Goudarzi MT, Sarveazad A, Khodadadi I. Hydrogen peroxide: a potent inducer of differentiation of human adipose-derived stem cells into chondrocytes. *Free Radic Res* 2018; 52(7): 763-74.
 27. Hashemnia M, Nikousefat Z, Mohammadalipour A, Zangeneh MM, Zangeneh A. Wound healing activity of *Pimpinella anisum* methanolic extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Wound Care* 2019; 28(10): 26-36.
 28. Hajhashemi V, Sajjadi SE, Heshmati M. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. *J Ethnopharmacol* 2009; 124(3): 475-80.
 29. Sharififar F, Pournourmohammadi S, Arabnejad M, Rastegarianzadeh R, Ranjbaran O, Purhemmaty A. Immunomodulatory activity of aqueous extract of *heracleum persicum* Desf. in Mice. *Iran J Pharm Res* 2009; 8(4): 287-92.
 30. Kumari M, Eesha BR, Amberkar M, Kumar N. Wound healing activity of aqueous extract of *Crotalaria verrucosa* in Wistar albino rats. *Asian Pac J Trop Med* 2010; 3(10): 783-7.
 31. Courtois MC, Sapoval M, Del Giudice C, Ducloux R, Mirault T, Messas E. Distal revascularization in diabetic patients with chronic limb ischemia. *J Mal Vasc* 2015; 40(1): 24-36.
 32. Oryan A, Naeini AT, Moshiri A, Mohammadalipour A, Tabandeh MR. Modulation of cutaneous wound healing by silymarin in rats. *J Wound Care* 2012; 21(9): 457-64.
 33. Yang LL, Liang YC, Chang CW, Lee WS, Kuo CT, Wang CC, et al. Effects of sphonidin, isolated from *Heracleum laciniatum*, on IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells. *Life Sci* 2002; 72(2): 199-213.
 34. Caetano GF, Fronza M, Leite MN, Gomes A, Frade MA. Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis. *Pharm Biol* 2016; 54(11): 2555-9.
 35. Lorente L, Rodriguez ST, Sanz P, Abreu-González P, Díaz D, Moreno AM, et al. Association between pre-transplant serum malondialdehyde levels and survival one year after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 2016; 17(4): 500.
 36. Zhang B, Zehnder JL. Oxidative stress and immune thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2013; 50(3): e1-e4.
 37. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J* 2017; 14(1): 89-96.
 38. Merecz-Sadowska A, Sitarek P, Kucharska E, Kowalczyk T, Zajdel K, Cegliński T, et al. Antioxidant properties of plant-derived phenolic compounds and their effect on skin fibroblast cells. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(5): 726.
 39. Akbaribazm M, Goodarzi N, Rahimi M, Naseri L, Khazaei M. Anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of *Heracleum persicum* L. extract on rats with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2021; 11(2): 47-58.
 40. Kant V, Sharma M, Jangir BL, Kumar V. Acceleration of wound healing by quercetin in diabetic rats requires mitigation of oxidative stress and stimulation of the proliferative phase. *Biotech Histochem* 2022; 97(6): 461-72.
 41. Ma X, Lin Y, Liu Y, Li W, He J, Fang M, et al. Effects of apigenin treatment on random skin flap survival in rats. *Front Pharmacol* 2021; 12: 625733.
 42. Al-Numair KS, Chandramohan G, Veeramani C, Alsaif MA. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep* 2015; 20(5): 198-209.

Investigation of the Healing Effects of Hydroethanolic Extract of *Heracleum Persicum* on Full-thickness Incisional Cutaneous Wounds in Rats

Ali Davoudi¹, Fatemeh Hoseinpour², Mohammad Hashemnia³

Original Article

Abstract

Background: Wound healing is the body's natural repair process after injury. Due to its high antioxidant capacity and many effective components, this study aimed to assess the impact of topically applied *Heracleum persicum* extract on rat full-thickness incisional cutaneous wound healing.

Methods: After induction the wound, sixty male rats were divided into four groups: control, basal cream, H. *persicum* 5% and 10% and were treated daily with saline, basal cream, H. *persicum* 5% and H. *persicum* 10% for 14 days, respectively. The animals were euthanized at 7, 14 and 21 days post-injury, and samples were collected for histopathological and biochemical analysis.

Findings: A prominent decrease in the wound area was observed in the treatment groups, particularly H. *persicum* 10% compared to the control group. Additionally, treatment with H. *persicum* decreased the number of lymphocytes and improved the number of fibroblasts at the earlier stages and increased the number of fibrocytes at the later stages of wound healing. Also, re-epithelization, tissue alignment, higher maturity of the collagen fibers and large capillary-sized blood vessels revealed significant changes in the treatment groups, especially H. *persicum* 10% compared to the control group. H. *persicum* extracts increased hydroxyproline and glycosaminoglycans contents and elevated total antioxidant capacity, while decreased malondialdehyde compared to the control group.

Conclusion: This study showed that H. *persicum* promotes wound healing activity. This property can be attributed to its action on blood vessels, modulation of inflammation, its role in initiating more collagen and glycosaminoglycan production and decreasing oxidative stress.

Keywords: Wound healing; *Heracleum persicum*; Hydroxyproline; Glycosaminoglycans; Oxidative stress

Citation: Davoudi A, Hoseinpour F, Hashemnia M. Investigation of the Healing Effects of Hydroethanolic Extract of *Heracleum Persicum* on Full-thickness Incisional Cutaneous Wounds in Rats. J Isfahan Med Sch 2025; 43(802): 30-45.

1- Graduated in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

Corresponding Author: Fatemeh Hoseinpour, Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran; Email: fhoseinpour@razi.ac.ir