



بررسی تأثیر عصاره متانولی برگ، گل و ساقه گیاه دافنه ماکروناتا بر ترمیم زخم پوستی در رت

کاتیا جزایری^۱، احمد قارزی^۲، حمزه امیری^۳، محسن عباسی^۴، محمدرضا غلامی^{۵*}

۱- دانشگاه لرستان - دانشکده علوم پایه - گروه زیست‌شناسی - کارشناسی ارشد بیوسستماتیک جانوری.

۲- دانشگاه رازی کرمانشاه - دانشکده علوم پایه - گروه زیست‌شناسی - دانشیار.

۳- دانشگاه لرستان - دانشکده علوم پایه - گروه زیست‌شناسی - دانشیار.

۴- دانشگاه لرستان - دانشکده دامپزشکی - گروه دامپزشکی - دانشیار.

۵- دانشگاه علوم پزشکی لرستان - مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی - استادیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۰

چکیده

مقدمه: دافنه ماکروناتا (*Daphne mucronata*) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بوده و می‌تواند فرآیند ترمیم زخم را تسهیل نماید. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر دافنه ماکروناتا بر روی ترمیم زخم پوستی موش صحرائی بالغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۵ سر رت نر مورد استفاده قرار گرفت که به‌طور تصادفی در چهار گروه عصاره متانولی ۹۸٪ (گل، ساقه، برگ) و شاهد به مدت بیست و دو روز تیمار شدند. برای این منظور زخمی به‌صورت دایره‌ای به قطر ۱ سانتی‌متر در ناحیه پوست پشت گردن ایجاد و نمونه‌هایی در روزهای سوم، هفتم، چهاردهم و بیست و دوم بعد از تیمار برای مطالعه میکروسکوپی گرفته شد. توسط نرم‌افزار SPSS نسبت به تجزیه و تحلیل داده‌ها اقدام و نتایج به‌وسیله آزمون کروسکالوالیس و فریدمن با هم مقایسه شدند.

نتایج: از نظر میکروسکوپی و اندازه سطح زخم در نمونه‌های درمانی (یا عصاره گل، ساقه و برگ) روند ترمیم و بهبودی زخم به‌طور چشمگیری روبه افزایش بود، به‌طوری‌که در چهاردهمین روز ایجاد زخم، بهبودی کامل حاصل گردید و در روز بیست و دوم حتی جای زخم قابل تشخیص نبود. همچنین درصد بهبودی زخم در روز چهاردهم و بیست و دوم بین گروه‌های تیمار با شاهد، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P > 0.05$). نتایج هیستوپاتولوژیک نشان داد که عصاره دافنه (گل، برگ و ساقه) می‌تواند بر ترمیم زخم پوستی مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی تهیه شده از گل، ساقه و برگ گیاه دافنه ماکروناتا در بهبودی و افزایش سرعت ترمیم زخم‌های پوستی مؤثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دافنه ماکروناتا، عصاره متانولی، گیاهان دارویی، ترمیم زخم پوست.

*نویسنده مسئول: خرم‌آباد - دانشگاه علوم پزشکی لرستان - مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، تلفن: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۳۳، نمابر: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۳۳

Email: rezagholami57@gmail.com

ارجاع: جزایری کاتیا، قارزی احمد، امیری حمزه، عباسی محسن، غلامی محمدرضا. بررسی تأثیر عصاره متانولی برگ، گل و ساقه گیاه دافنه ماکروناتا بر ترمیم زخم پوستی در رت. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۵؛ ۱۱(۲): ۹-۱۶.

مقدمه

طب گیاهی یکی از رایج‌ترین روش‌های درمان در پزشکی سنتی است. همچنین امروزه بسیاری از داروهای مدرن پزشکی، از منابع طبیعی استخراج می‌گردند که بسیاری از آنها ریشه در طب باستانی دارند. امروزه به دلیل مشکلاتی که طب مدرن به دنبال دارد، گرایش زیادی برای جایگزین کردن آن با طب سنتی و منابع طبیعی دارد (۱). درمان‌های گیاهی و به‌طور کلی فرآورده‌های طبیعی به‌ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهمترین عامل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک سو و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی که زمین را تهدید می‌کند از سوی دیگر است (۲). باتوجه به نیاز روز افزون دنیای امروزه به داروهای گیاهی جدید و باتوجه به صنعتی شدن این بخش، به‌نظر می‌رسد شناسایی و برنامه‌ریزی جهت استفاده بهتر از منابع طبیعی کشور امری ضروری است. گمان می‌رود که بسیاری از گیاهان دارویی از جمله دافنه ماکروناتا برای درمان زخم‌ها مفید باشند. گونه *Daphne mucronata* با نام فارسی برگ‌بویی زاگرسی - خوشک (Khaveshk) و خیش شناخته می‌شود (۳) و از مهمترین ترکیبات شیمیایی موجود در آن بتولین است. بتولین از ترکیبات تری‌ترپنوئیدی می‌باشد که علیه برخی از انواع سرطان مؤثرند. بتولین می‌تواند به بتولینیک اسید تبدیل گردد که از نظر زیستی فعال‌تر از بتولین است. پوست، برگ، میوه، ساقه، دانه و ریشه این گیاه دارای خاصیت دارویی می‌باشند (۴). پوست دافنه برای درمان بیماری‌های استخوان و شستن مو استفاده می‌شود. برگ دافنه سمی است و برای درمان آبسه (دمل چرکی) کاربرد دارد و جوشانده برگ برای بیماری‌های التهابی، آرتروز، آنفلونزا و ورم عضله مورد استفاده قرار می‌گیرد. عصاره آن دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و بیولوژیکی است. میوه دافنه قابل خوردن است. دانه دافنه در درمان بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. عصاره ریشه دافنه دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و بیولوژیکی است. عصاره ساقه دافنه دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و بیولوژیکی است و همچنین این گیاه دارای خاصیت ضد انگلی و ضد تکثیر سلول سرطانی است. فعالیت سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی *D. mucronata* بر روی رده‌های سلولی متفاوت گزارش شده است. بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه در زنان یافت شده است. عصاره دافنه فعالیت ضد سرطان خون را هم نشان داده است (۳).

پوست همواره اهمیت زیادی برای انسان‌ها در محافظت از بدن و ممانعت از دست رفتن آب بدن، خونریزی و تهاجم میکروارگانیسم‌ها داشته است. هدف از درمان ترمیم زخم، زمان کوتاه‌تر و عوارض

جانبی کمتر ناشی از آن می‌باشد و از گذشته دور پزشکان مصری، یونانی، هندی و اروپایی با توسعه روش‌های مؤثر در پی درمان زخم در کوتاه‌ترین مدت و با کمترین عارضه بوده‌اند.

ترمیم زخم پوستی، مکانیسمی هموستاتیک برای بازگشت تعادل فیزیولوژیک است. این روند در برگیرنده مجموعه‌ای از وقایع، شامل پاسخ التهابی، تولید مجدد اپیدرم، جمع شدن زخم و در انتها شکل‌گیری بافت همبند است. درمان زخم و مراقبت از آن جهت افزایش سرعت بهبود و همچنین جلوگیری از مزمن شدن و عفونت آن همواره مدنظر انسان بوده است (۵).

بلافاصله پس از زخمی‌شدن پوست واکنش‌های سلولی رخ می‌دهد که شامل واکنش‌های پلاکت‌ها با ترومبین و کلاژن می‌باشد و در نهایت انعقاد خونی ایجاد می‌گردد و در نتیجه، تعدادی از میانجی‌های شیمیایی آزاد می‌شوند که قسمت اعظم آن در فاز التهاب ترمیم زخم نقش دارند. تمام این وقایع با کامل شدن روند انعقاد رخ می‌دهند (۵).

اولین سلول‌هایی که در محل زخم ظاهر می‌شوند لکوسیت‌ها هستند؛ طی چند ساعت گرانولوسیت‌ها و ماکروفاژها در لبه زخم تجمع می‌کنند. با گذشت چند روز فاز تکثیر شروع شده و فیبروبلاست‌ها وارد می‌شوند. از طرفی ماکروفاژها موادی را آزاد می‌کنند که موجب جذب و تکثیر فیبروبلاست‌ها می‌شود؛ به‌تدریج فیبروبلاست‌ها جایگزین لکوسیت‌ها شده و تکثیر کلاژن هم افزایش می‌یابد. از طرفی تشکیل عروق هم در ترمیم ضروری است و توسط فاکتورهای آزاد شده از ماکروفاژها می‌باشد (۵). به‌طور کلی، فرآیند ترمیم به سه مرحله التهاب، تکثیر و تجدید ساختار تقسیم می‌شود. با وجود اینکه این مراحل به دنبال هم انجام می‌شوند، از نظر زمانی نیز ممکن است با هم همپوشانی نیز داشته باشند. هر ماده‌ای که بتواند زمان این فازها را کوتاه‌تر کند، منجر به تسریع روند ترمیم می‌شود (۶).

امروزه گرایش مجددی به مصرف گیاهان دارویی به دلیل کم بودن عوارض سوء جانبی، گوناگونی ترکیبات مؤثر موجود در گیاهان، توسعه صنایع وابسته به کشت گیاهان دارویی، جلوگیری از خروج ارز به خارج از کشور، ایجاد کار مفید و به‌خصوص پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) و بسیاری از دلایل دیگر به‌وجود آمده است (۷). از سوی دیگر باتوجه به عدم معرفی یک داروی مؤثر برای درمان زخم، مطالعه اثر گیاهان دارویی برای زخم ضرورت دارد (۸ و ۹). درمان صحیح و مراقبت از زخم جهت افزایش سرعت بهبودی، همچنین جلوگیری از مزمن شدن و عفونت آن، همواره مدنظر انسان بوده و روش‌های مختلف برای رسیدن به این هدف به‌کار گرفته شده است. علی‌رغم تلاش‌های گسترده در پایه‌گذاری و به‌کارگیری روش‌های مختلف در ترمیم زخم،

حیوانات در ابتدا برای ایجاد زخم با تزریق درون صفاقی مخلوطی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و دیازپام (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. موهای پشت حیوان کاملاً با ماشین ریش تراش تراشیده شد و پوست این ناحیه با الکل ۷۰٪ استریل گردید. سپس با کمک پانچ بیوپسی زخمی با قطر ۱ سانتیمتر و عمق ۲ تا ۸ میلی‌متر در پشت حیوان ایجاد گردید. از زخم‌ها به‌صورت باز تیمار و مراقبت شد و حیوانات مورد آزمایش نیز در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند.

سپس حیوانات به ۴ گروه تحت تأثیر عصاره (ساقه، برگ، گل) و شاهد، تقسیم شدند. گروه اول، گروهی که با عصاره ساقه تیمار می‌شدند. گروه دوم، گروهی که با عصاره برگ تیمار می‌شدند و گروه سوم که با عصاره گل تیمار می‌شدند و در نهایت گروه چهارم گروه شاهد که با متانول تیمار می‌شد. برای تمام گروه‌ها روزانه یک بار پماد استفاده می‌شد.

منای تقسیم‌بندی از نظر زمانی این بود که در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۲ حیوانات کشته شده و بعد از اندازه‌گیری بافت جراحی شده، با کولیس محاسبه درصد بهبودی زخم انجام شده و بررسی‌های مورد نظر بعد از برداشت بافت صورت گرفت. لازم به ذکر است که روز جراحی (ایجاد زخم) روز صفر در نظر گرفته شد. تیمارها تا روز ۲۲ ادامه یافت.

براساس مطالعه هیستولوژیکی، در روزهای مشخص شده (۳، ۷، ۱۴ و ۲۲) هر سه حیوان در هر گروه کشته شده و بلافاصله پوست ناحیه زخم (خود زخم و حاشیه زخم) جدا گردید و در فرمالین ۱۰٪ جهت فیکس شدن قرار داده شد.

از روز ایجاد زخم (روز صفر) تا روز ۲۲ در زمان‌های مشخص شده از شعاع زخم با کولیس اندازه‌گیری به‌عمل آمد.

بهبودی زخم از طریق اندازه‌گیری سطح زخم، در صد بهبودی زخم و مدت زمان لازم جهت بسته شدن کامل زخم ارزیابی شد. درصد بهبودی طبق فرمول زیر به‌دست آمد (۸).

در صد اندازه زخم در روز = (صفر یا x روز زخم سطح یا طول) / (صفر روز زخم سطح یا طول) × ۱۰۰

درصد بهبودی در روز x = ۱۰۰ - در صد اندازه زخم در روز
در فاصله روزهای مشخص شده (۳، ۷، ۱۴ و ۲۲) سه حیوان از هر گروه به روش استنشاق اتر در فضای بسته کشته شد و پوست ناحیه زخم در حال ترمیم جدا گردید و به‌عنوان بافت زخم و حاشیه زخم در فرمالین ۱۰٪ جهت فیکس شدن نگهداری شد. از مقاطع، برش‌های سریال به ضخامت ۶ میکرومتر تهیه گردید و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند.

مقاطع رنگ‌آمیزی شده از نظر مقدار تشکیل میزان آنژیوژنز و گرانولاسیون و ضخامت اپیدرم مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰ و ۱۱).

کلیه آزمایشات به‌صورت یک آمایش فاکتوریل در قالب طرح تصادفی در سه تکرار مستقل، انجام شد. تعیین میانگین، انحراف معیار

کنترل زخم هنوز به حد مطلوب نرسیده است (۸). در فرآیند ترمیم پوست، سلول‌های متفاوتی ایفای نقش می‌کنند. پلاکت‌ها، نوتروفیل‌ها، ماست سل‌ها، سلول‌های ماکروفاژها و همچنین اکسون‌های آسیب‌دیده حسی و اعصاب پس‌غده‌ای، در توقف خونریزی و التهاب نقش دارند. سلول‌های اپیدرم، فیبروبلاست‌های موجود در درم و سلول‌های اندوتلیال دیواره رگ، شرایط لازم برای ترمیم ساختاری فراهم می‌کنند. این نوع سلول‌ها، فرآیند ترمیم را با تولید ماتریکس خارج سلولی، پروتئازها، عوامل رشد، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌هایی که تحریک‌کننده یا بازدارنده فعالیت‌های خاص سلول هستند، هماهنگ می‌کنند (۹).

گرایش به استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان بیماری‌های مختلف از جمله زخم و نیاز به موادی با تأثیرگذاری بیشتر از یک سو و خواص و اثرات ضد میکروبی و ضدسرطانی گیاه دارویی دافنه از سوی دیگر و توجه به این مطلب که تاکنون اثرات پماد گیاه دافنه بر روند ترمیم زخم مورد ارزیابی قرار نگرفته است، باعث شد که در این مطالعه تأثیر این گیاه دارویی بر روند ترمیم زخم در رت به‌صورت استعمال خارجی و به‌صورت پماد مورد ارزیابی قرار گیرد.

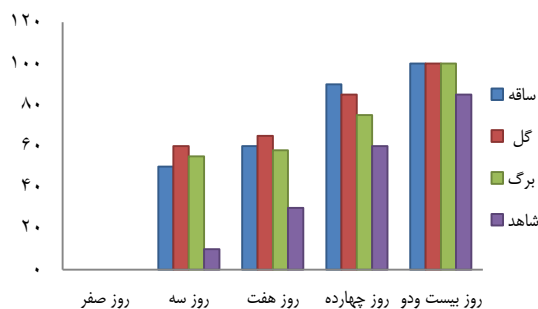
مواد و روش‌ها

نمونه‌ها در هوای آزاد به مدت ۳ روز (در فصل تابستان) خشک شده، سپس خرد گردید و در ظروف جداگانه نگهداری شدند. سپس کیسه‌هایی از جنس کتان که الکل به‌راحتی از آن عبور کند تهیه گردید، به مقدار ۵۰ گرم از هر کدام از بخش‌های گیاه موردنظر (ساقه، برگ، گل) جداگانه درون این کیسه‌ها ریخته شد و درون ظرف‌هایی که حاوی ۳۰۰ سی‌سی متانول بود قرار داده شد. به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق در حالی که درب‌های بشرها کاملاً بسته شده بود، نگهداری شد، تا سه بار این مرحله تکرار شد و محلول (متانول و عصاره گیاه) در بطری‌هایی در یخچال نگهداری شد و جهت تغلیظ و جداسازی الکل از دستگاه روتاری استفاده شد. عصاره غلیظ به‌دست آمده در انکوباتور ۴۰ درجه به مدت ۸ ساعت نگهداری گردید و سپس در هوای اتاق به مدت ۱۰ روز کاملاً خشک شد. ماده خشک حاصل اندازه‌گیری شد و در ظروف مخصوص تا تهیه پماد از عصاره در یخچال نگهداری شد.

از عصاره خشک و متانول به ازای یک سوم وزن ماده خشک جهت شل شدن ماده خشک و از مارگارین به ازای دو سوم وزن ماده خشک جهت تهیه این پماد استفاده گردید.

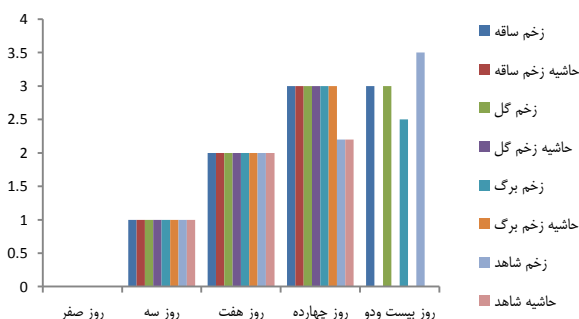
رت‌های نر در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای تقریبی ۲۲ درجه سانتی‌گراد، مورد استفاده قرار گرفت. غذا و آب به مقدار کافی در اختیار داشتند و از سلامت کامل نیز برخوردار بودند.

ترمیم در روز ۳ تشکیل نشد و در روز ۷ میزان ضخامت اپیدرم، بیشتر شد و در روزهای ۱۴ و ۲۲ ضخامت افزایش، درحالی که در گروه کنترل این میزان در روز ۲۲ نسبت به گروه‌های تیمار کمتر بود. تجزیه و تحلیل‌های هستیتولوژیکی تفاوت بین تعداد گرانولاسیون و رگزایی و میزان اپیدرم را به خوبی نشان داد (نمودار ۳ و شکل ۳).

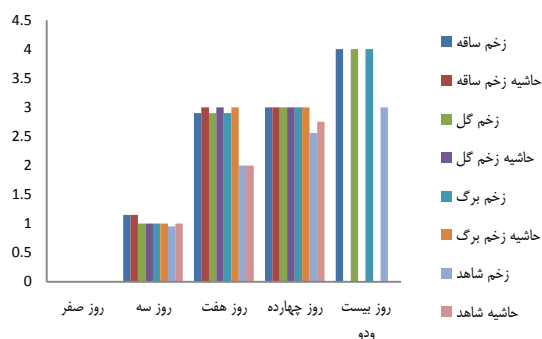


نمودار ۱- درصد بهبودی سطح زخم در چهار گروه

نمودار ۱ روند بهبودی سطح زخم در طی روزهای سوم، هفتم، چهاردهم و بیست و دوم را نشان می‌دهد. به ترتیب درصد بهبودی زخم روند روبه افزایش داشته است و در گروه‌های درمانی درصد بهبودی زخم بیشتر از شاهد بوده است.



نمودار ۲- نمودارهای میانگین بافت گرانولاسیون و در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۲ در گروه‌های گل، برگ و ساقه و شاهد



نمودار ۳- نمودار میانگین اپیدرم در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۲ در گروه‌های گل، برگ و ساقه و شاهد

و همچنین تعیین سطح معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از طریق تجزیه در بسته نرم‌افزاری SPSS و در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌های میکروسکوپی از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای تجزیه و تحلیل داده‌های میکروسکوپی از آزمون فریدمن و کروسکال والیس استفاده شد.

نتایج

باتوجه به جدول ۱ و نمودار ۱ در روزهای موردنظر (۳، ۷، ۱۴ و ۲۲) افزایش معناداری در میزان بهبودی زخم‌های پوستی رت‌های گروه تیمار با عصاره گیاه دافنه ماکروناتا در مقایسه با گروه‌های شاهد مشاهده گردید. در اینجا سطح معنی‌دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شد که اختلاف بین گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود. نمودار ۱ نشان‌دهنده افزایش روند ترمیم است که در گروه تیمار بسته شدن کامل زخم در روز ۱۴ صورت گرفت و بهبود کامل زخم در روز بیست و دوم مشاهده شد در حالی که در گروه‌های شاهد بسته شدن کامل زخم تنها پس از گذشت بیست و دو روز مشاهده گردید. باتوجه به نتایج به‌دست آمده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم پس از تیمار با عصاره گیاه دافنه ماکروناتا، میزان اپیدرم در روز سوم تفاوت معناداری در مقایسه با گروه شاهد و تیمار نشان نداد. در حالی که در روز هفتم و چهاردهم میزان ضخامت این لایه به‌صورت معناداری افزایش یافت. چنانچه گروه شاهد در این روز تفاوت معنی‌داری با گروه تیمار نشان داد.

جدول ۱- مقایسه درصد بهبودی زخم

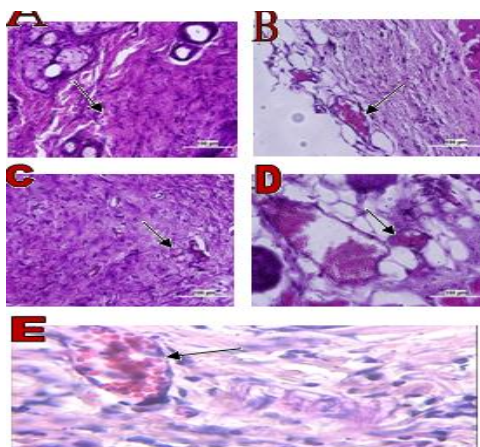
روز	صفر	سه	هفت	چهارده	بیست و دو
شاهد	۰	۱۰٪	۳۰٪	۶۰٪	۸۵٪
برگ	۰	۵۵٪	۵۸٪	۷۵٪	۱۰۰٪
ساقه	۰	۵۰٪	۶۰٪	۹۰٪	۱۰۰٪
گل	۰	۶۰٪	۶۵٪	۸۵٪	۱۰۰٪

نتایج حاصل از بررسی تعداد عروق در بافت پوست رت‌های گروه شاهد و تیمار شده با عصاره گیاه دافنه نشان داد که هیچ رگ خونی تازه در پوست در حال ترمیم در روز ۳ تشکیل نشده بود در حالی که در روز ۷ میزان ایجاد رگ افزایش یافته بود و در روز ۲۲ این تعداد کاهش، در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح معنی‌دار بودن $P < 0.05$ معنادار بود (نمودار ۴ و شکل ۲).

نتایج حاصل از بررسی میزان گرانولاسیون در بافت پوست رت‌های گروه شاهد و تیمار شده با عصاره گیاه دافنه نشان داد که میزان گرانولاسیون در پوست در حال ترمیم در روز ۳ و ۷ میزان گرانولاسیون، تشکیل فیبروبلاست افزایش و در روزهای ۱۴ و ۲۲ این تعداد کاهش یافته درحالی که در گروه کنترل این میزان در روز ۲۲ افزایش یافت. تفاوت بین گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح معنی‌دار بود (نمودار ۲ و شکل ۱).

در نتایج حاصل از بررسی ضخامت اپیدرم در بافت پوست رت‌های گروه شاهد و تیمار شده با عصاره گیاه دافنه، اپیدرم در پوست در حال

همانگونه که با فلش مشخص شده است عروق خونی در نمونه‌های گروه گل (شکل A)، برگ (شکل B) و گروه ساقه (شکل C) کمتر از نمونه‌های شاهد (شکل D) و سالم (شکل E) است و در گروه شاهد بیشتر از سالم است (H&E، بزرگنمایی ۴۰۰×)

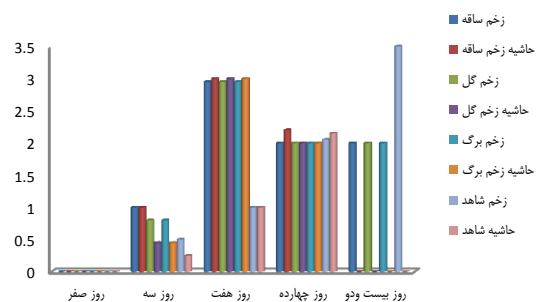


شکل ۳- اپیدرم زخم روز بیست و دوم

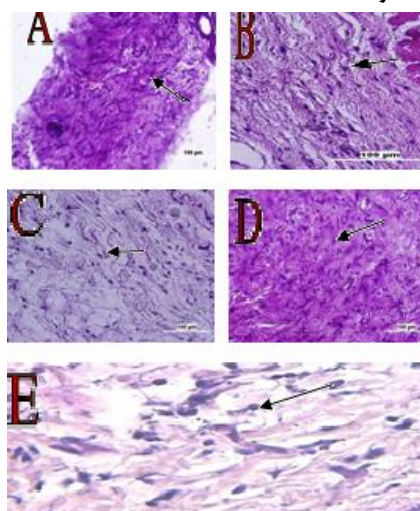
همانگونه که با فلش مشخص شده است ترمیم اپیدرم در نمونه‌های گروه گل (شکل A)، برگ (شکل B) و گروه ساقه (شکل C) بیشتر از نمونه‌های شاهد (شکل D) و سالم (شکل E) است (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰×)

بحث

التیام زخم‌ها فرآیندی پیچیده اما عمدتاً نظام‌دار است که در چهار مرحله همپوشانی‌کننده شامل مراحل انعقاد، التهاب، فیبروپلازی و تغییر آرایش بافتی صورت می‌گیرد. در فاز انعقاد، در نتیجه انقباض عروق و آزاد شدن کاتکول آمین‌ها دیابندز آغاز می‌گردد (۱۲). در فاز التهاب، زخم به وسیله سلول‌های فاگوسیتوزکننده اشغال می‌شود. در فاز فیبروپلازی فیبروبلاست‌هایی که به زخم مهاجرت کرده‌اند انواع کلاژن را سنتز و ترشح می‌کنند و در نتیجه به استحکام زخم افزوده می‌شود و آنژیوژنز در این مرحله رخ می‌دهد (۱۲). در مرحله تغییر آرایش بافتی، بافت حالت طبیعی خود را به دست می‌آورد (۱۲). در این آزمایش باتوجه به نتایج حاصل از استفاده از پماد گیاه دافنه، اختلاف معنی‌داری در درصد بهبود زخم و کاهش مساحت آن در گروه تجربی و گروه کنترل در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۲ مشاهده گردید. به هر حال دوره تکمیل فرآیند بهبودی در گروه تیمار، روز ۱۴ بود. در حالی که در گروه کنترل این زمان بیشتر از ۲۲ روز به طول انجامید. این یافته‌ها به معنی تسریع در روند کاهش سطح زخم بوده و نشان‌دهنده اثرات مثبت گیاه دافنه در ترمیم زخم‌های عمیق پوستی است. نتایج حاصل نشان داد که بهبود کامل زخم‌هایی با قطر یک سانتی‌متر در رت‌هایی که روزانه عصاره برگ، گل، ساقه گیاه دافنه را دریافت می‌کردند حدود ۲۲ روز زمان برد. در حالی که در تحقیقات ما این زمان بسیار کمتر و در حدود روز ۱۴ در گروه رت‌هایی بود که به صورت روزانه پماد گیاه دافنه را دریافت می‌نمودند.

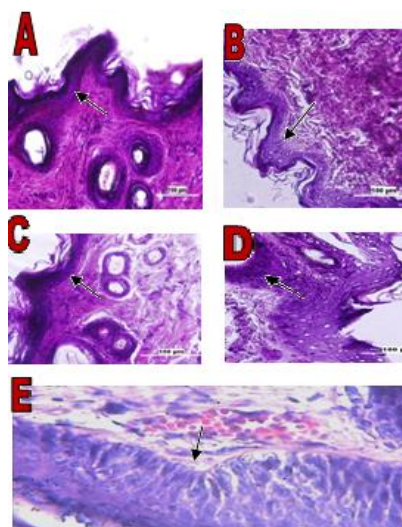


نمودار ۴- نمودار میزان رگ‌زایی در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۲ در گروه‌های گل، برگ و ساقه و شاهد



شکل ۵- گرانولاسیون روز بیست و دوم

همانگونه که با فلش مشخص شده است گرانولاسیون در نمونه‌های گروه گل (شکل A)، برگ (شکل B) و گروه ساقه (شکل C) کمتر از نمونه‌های شاهد (شکل D) و سالم (شکل E) است و در گروه شاهد کمتر از سالم است (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰×)



شکل ۶- عروق زخم روز بیست و دوم

زخم می‌باشد و باتوجه به فراوانی رویش این گیاه در ایران، می‌توان تحقیقات بیشتری برای کاربردی کردن مصرف این گیاه انجام داد. در مجموع بررسی حاضر، برای اولین بار نشان داد که عصاره متانولی دافنه ماکروناتا موجب تسریع فرآیند التیام زخم باز پوستی در رت‌ها می‌شود و البته قبل از مصرف در انسان‌ها، کار آزمایشی بالینی ضروری است و شناخت دقیق همه ساز و کارهای پیش گفته از قبیل اثر آن روی سنتز و تثبیت کلاژن، کاهش التهاب، افزایش جریان خون در موضع زخم را می‌طلبد. در این زمینه انجام تحقیقات بیشتر در ارتباط با غنی‌سازی محتویات آن، بررسی اثر بخشی سایر راه‌های مصرف آن، مدل‌های دیگر حیوانی (زخم مزمن، سوختگی و...) و بالاخره بر روی بیماران پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دانشگاه لرستان حاصل شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت‌های پژوهشی دانشگاه‌های لرستان و علوم پزشکی لرستان به‌دلیل همکاری در انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

References

1. Medicinal plants Research Network. Available from URL: http://www.mprn.ir/subject/php?sub=5/display_News/php?id=694.
 2. Naghsh N, Aboutalebi F, Karam Seychani S. Designing a new nano-plant composite of cucurbita pepo for wound repair of skin in male albino mice: a new nano approach for skin repair. Journal of Fasa University of Medical Sciences 2013;3:27-33.[Persian].
 3. Mozafarian V. Culture names of plants Iran. Culure Tehran, 1998.p.74.[Persian].
 4. Hedaiaty M, Yazdan P, Azizy F. The effect of the extract on tumor necrosis factor alpha and daphne mucronata receptors on human monocytes in vitro. Yakhteh 2011;18:152-7.[Persian].
 5. Adzick NS. Wound hetaling, biological and clinical features. In: Sabiston DC, Lyerly HK, editors. Textbook of surgery: The biological basis of modern surgical practice. Philadelphia: W.B.Saunders;1977.p.207-20.
 6. Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. Ultrasonics 1990;28:175-80.
 7. Mirazi N, Vatanchian M. Comparative study of lotus corniculatus. Hydroethanolic extract and phenytoin ointment effects on rat skin wound healing: morphometrical and histopathological studies. Journal of Cell & Tissue 2011;2:213-23.[Persian].
 8. Hadadadel A. Medicine tradition in Iran. 1st ed. Tehran: Study and Research Institute;1983.p.18-53.[Persian].
 9. Malekmohammadi M, Abdol Tehrani H, Aghdami N. Skin structure and wound healing phases. Journal of Dermatology and Cosmetic 2011;2:229-44.[Persian].
 10. Asadi SY, Parsaei P, Karimi M, Ezzati S, Zamiri A, Mohammadzadeh F, et al. Effect of green tea (Camellia sinensis) extract on healing process of surgical wounds in rat. Int J Surg 2013;11:332-7.
- تعداد عروق خونی تشکیل شده در روز ۷ در نمونه تحت تیمار با پماد دافنه نسبت به نمونه شاهد افزایش چشمگیری داشته است. براساس مشاهدات عینی میزان التهاب در زخم‌های تیمار شده با پماد گیاه دافنه در روزهای ۱ تا ۳ نسبت به نمونه‌های شاهد کمتر و التهاب در گروه کنترل با تأخیر زمانی نسبت به گروه تیمار آغاز گردید به عبارت دیگر می‌توان ادعا کرد که در گروه تیمار التهاب سریع‌تر خاتمه یافته است. بنابراین احتمالاً پماد گیاه دافنه در افزایش سرعت گذر از فاز التهابی و وارد شدن به فاز فیبروپلازی و در نهایت افزایش روند بهبود زخم تأثیرگذار است، زیرا سنتز کلاژن و عروق خونی در این مرحله روی می‌دهد. یافته‌های ما باتوجه به خواص ضد میکروبی و ضد قارچی دافنه، که در مطالعات متعدد مورد بررسی قرار گرفته است (۶-۸)، قابل توجهی می‌باشد در آزمایشات ما نیز مشاهده گردید که پماد گیاه دافنه موجب تعدیل التهاب و مانع از تخریب بیشتر بافتی و آسیب‌های دیگر ناشی از آن در بافت می‌شود. همچنین در قسمت دیگری از نتایج این پژوهش نشان داده شد که ضخامت پوست در حال ترمیم و نوسازی در نمونه تیمار، نسبت به نمونه کنترل بیشتر است که خود دلیلی بر تأثیرگذار بودن پماد عصاره برگ، ساقه و گل گیاه دافنه در افزایش روند بازسازی پوست آسیب دیده می‌باشد.
- در این مطالعه علائم ظاهری عفونت زخم، حتی در گروه شاهد مشاهده نشد، بنابراین ساز و کارهای دیگری غیر از جلوگیری از عفونت زخم برای گیاه دافنه ماکروناتا جهت تسریع روند بهبود زخم به‌نظر می‌رسد؛ عده‌ای معتقدند که خود مرطوب بودن زخم از عوامل تسریع‌کننده‌ی روند التیام زخم است (۱۳). وینتر و همکاران در ۱۹۶۲ ثابت کردند که محیط مرطوب برای بهبود زخم ضروری است و به‌نظر می‌رسد از کاهش آب سلولی جلوگیری می‌کند و مهاجرت سلولی، سنتز کلاژن و آنژیوژنز را تحریک می‌کند، که در این مطالعه نیز زخم‌ها روزانه با متانول مرطوب می‌شدند و همچنین وجود مارگارین در تهیه پماد از عصاره متانولی به‌دلیل چرب بودن مانع از خروج آب از بافت و در نتیجه حفظ رطوبت است. ساز و کار دیگر می‌تواند خاصیت ضد سرطانی دافنه ماکروناتا به‌علت وجود بتولین که یک تری‌ترین طبیعی گیاهان است باشد. بتولین می‌تواند به بتولینیک اسید تبدیل گردد که از خود بتولین فعال‌تر است.
- بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه در زنان یافت شده است. عصاره دافنه ماکرونا فعالیت ضد سرطان خون را هم نشان داده است. عصاره مذکور سبب کاهش تعداد گیرنده‌های عامل نکروزدهنده بافتی آلفا در سطح مونوسیت‌های انسانی می‌گردد و تقسیم سلولی را مهار می‌کند.
- تمام شواهد و قرائن که به آن اشاره شد دال بر تأثیرگذاری پماد عصاره متانولی برگ، ساقه و گل گیاه دافنه در افزایش روند بهبود

11. Sahraei H, Gharzi A, Amiri H, Abbasi M, Gholami M. Satureja khuzestanica and satureja rechingeri ethanolic extracts ameliorate wound healing in adult mice. Zahedan Journal of Research Medical Sciences. In press 2015.[Persian].
12. Dargaville TR, Farrugia BL, Broadbent JA, Pace S, Upton Z, Voelcker NH. Sensors and imaging for wound healing: A review. Biosens Bioelectron 2013;41:30-42.
13. Dyson M, Young S, Pedle CL, Webster DF, Lang SM. Comparison of the effects of moist and dry conditions on dermal repair. J Invest Dermatol 1988;91:434-9.



Study of Effect of Methanolic Extracts *Daphne Mucronata* (Stem, Leaves, Flowers) on Skin Wound Healing in Rat

Katia Jazayeri (M.Sc.)¹, Ahmad Gharzi (Ph.D.)², Hamzeh Amiri (Ph.D.)¹, Mohsen Abbasi (Ph.D.)³,
Mohammadreza Gholami (Ph.D.)^{4*}

1- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran.

3- Dept. of Veterinary, School of Veterinary, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

4- Razi Herbal Medicine Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

Received: 5 November 2015, Accepted: 31 December 2015

Abstract:

Introduction: *Daphne mucronata* has anti-oxidant and anti-inflammatory properties and it can have a quick effect on the recovery of the skin wound and bruises. The purpose of this research was to study the effects of *Daphne mucronata* on the cure of rat skin.

Methods: This study included 45 male rats, which were treated in four different random methanol essences groups and a control group. They were treated for twenty two days. A circular cut was produced in the neck of the rats. The samples on the third, seventh, fourteenth and twenty second days after treatment were collected for microscopic analysis. The data were analyzed using Kruskal-Wallis and freedman by the SPSS software.

Results: From a macroscopic point of view and based on the measurement of the surface of the scratches and wounds in the groups under study, the healing trend of the scratches and wounds was increased considerably, so that in the fourteenth day of the treatment, a full recovery of the wounds was obtained, and on the twenty second day, the cuts and bruises were fully cared. The results of this study also showed that on the fourteenth and twenty two days, there was a significant difference between the control and treatment groups ($P < 0.05$). Histopathologic results showed that treatment with *Daphne mucronata* can recover wound in the comparison with control considerably.

Conclusion: The results of this research showed that the methanol essential made from the flower, stem and leaves of *daphne mucronata* is effective in the recovery of the skin wound and speed of the process of healing the skin bruises.

Keywords: *Daphne mucronata*, Methanolic extract, Medicinal plants, Skin wound healing.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Gholami, Email: rezagholami57@gmail.com

Citation: Jazayeri K, Gharzi A, Amiri H, Abbasi M, Gholami M. Study of effect of methanolic extracts *daphne mucronata* (stem, leaves, flowers) on skin wound healing in rat. Journal of Knowledge & Health 2016;11(2):9-16.