مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸
DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاهان غازیاقی، گل ماهور و خارمریم بر فرایند سنتز کلاژن در ترمیم زخم دیابتی

جواد یزدانی‌نژاد[۱]، تکتم حجار[۱*]، مجید مومنی‌مقدم[۱]، عیسی کهن باغخیراتی[۱]، علیرضا قدسی[۲] و زهرا قویدل[۱]

[۱] ایران، سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[۲] ایران، سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده ریاضی و علوم کامپیوتر، گروه آمار

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۰

چکیده

نارسایی در بیوسنتز کلاژن از دلایل عدم التیام زخم در بیماران دیابتی است. افزایش قند خون مانع تکثیر سلولی و تولید کلاژن در زخم‌ها می‌شود و ممکن است منجر به قطع عضو گردد. امروزه استفاده از گیاهان دارویی، به منظور ترمیم انواع زخم‌ها از جمله زخم دیابتی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف این پروژه، بررسی اثر عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان غازیاقی، گل ماهور و خارمریم در بهبود زخم‌های دیابتی و سنتز کلاژن است. در این مطالعه، از ۵۰ سر موش سوری نر(۱۰ سر غیردیابتی و ۴۰ سر دیابتی‌شده با داروی استرپتوزوتوسین)، استفاده شد. پس از بیهوشی و ایجاد زخم در پشت موش‌ها، زخم‌های دو گروه شاهد غیردیابتی(شم) و کنترل با اوسرین و سه گروه تجربی با عصاره‌های هیدروالکلی غازیاقی، گل‌ماهور و خارمریم به مدت ۵ روز تیمار شدند. در گروه‌های تجربی زخم‌های سمت چپ و راست به ترتیب با عصاره‌های ۲۵ و ۵۰ درصد بر پایه اوسرین تیمار شدند. از زخم موش‌ها عکس‌برداری ماکروسکوپی صورت گرفت. برای اندازه‌گیری سطح زخم از نرم افزار ImageJ استفاده شد و درصد بهبود زخم محاسبه گردید. به‌منظور اندازه‌گیری سطح هیدروکسی‌پرولین برای تشخیص کلاژن، از روش رنگ‌سنجی توسط دستگاه الایزا ریدر استفاده شد. برطبق نتایج، بسته‌شدن زخم (درصد بهبودی)، در گروه‌های تحت تیمار با دوز پایین عصاره غازیاقی وگل ماهور(۲۵٪) و دوز بالای عصاره خار مریم(۵۰٪) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. اگرچه میزان کلاژن درگروه‌های تیمار نسبت به کنترل افزایش یافت اما تفاوت آن معنادار نبود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌های هیدروالکلی سه گیاه غازیاقی، گل ماهور و خارمریم می‌توانند در افزایش کلاژن و بهبود زخم دیابتی مؤثر باشند.

واژه های کلیدی: ترمیم زخم دیابتی، کلاژن، غازیاقی، گل‌ماهور، خارمریم.

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۴۴۰۱۳۳۳۷، پست الکترونیکی:t.hajjar@hsu.ac.ir

مقدمه

دیابت از شایع‌ترین بیماری‌ها در جهان است که پیش‌بینی می‌شود جمعیت بیماران دیابتی تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۳۶۰ میلیون نفر برسد (۱). دیابت یک اختلال متابولیکی سیستمیک است که در نتیجه افزایش گلوکز خون ایجاد می‌شود و می‌تواند به علت اختلال در ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس یا اختلال در عملکرد گیرنده‌های غشایی انسولین ایجاد شود (۳۰). این افزایش قند در درازمدت منجر به تخریب رگ‌های بسیار ریز(Microvascular) می‌شود. دیابت با عوارض عمده‌ای مانند بیماری‌های قلبی-عروقی، آسیب به اعصاب، قانقاریا، تغییرات پوستی مانند جراحت‌هایی در پوست، چشم، اعضای موکوسی، تغییر ماکروسکوپی در بافت پوششی نرمال افراد دیابتی و قطع عضو ناشی از زخم‌های دیابتی همراه است (۳ ، ۱۸، ۲۱). اختلال در بهبود زخم در افراد دیابتی می‌تواند به دلایل متعددی از جمله عدم خون‌رسانی مناسب به محل زخم، کاهش تغییرات التهابی، کاهش

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸
DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

پتانسیل تکثیر فیبروبلاست‌ها و اختلال در بیوسنتز کلاژن باشد (۳).

کلاژن از فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در ماتریکس خارج‌سلولی است و در سلول‌های پوششی به وسیله فیبروبلاست‌ها سنتز می‌شود. این پروتئین نقش مهمی در ترمیم زخم‌ها، تکثیر سلولی، مهاجرت و تمایز سلولی ایفا می‌کند (۸). در بیماران دیابتی، قند خون بالا موجب کاهش تولید کلاژن و جلوگیری از تکثیر سلولی در زخم پا می‌شود (۴).

مولکول کلاژن مارپیچ سه‌گانه‌ای از سه زنجیره پروتئینی (دو زنجیره یکسان (α1) و یک زنجیره ی اضافی با ترکیب شیمیایی متفاوت (α2)) است. ساختار اول پلی‌پپتیدی کلاژن توالی‌های تکراری منحصربه‌فردی به صورت Gly–Xaa–Yaa را نشان می‌دهد که Xaa و Yaa معمولا توسط پرولین و۴–هیدروکسی‌پرولین جایگزین می‌شوند (۳۴). ترکیب آمینواسیدی کلاژن عمدتا از ٪۳۳ گلایسین، ٪۱۰ پرولین و ٪۱۴ هیدروکسی پرولین تشکیل شده است (۶).

با توجه به نقش کلاژن در بافت‌های مختلف بدن وهمچنین ترمیم زخم، سال‌های زیادی است که پژوهشگران آمینواسید هیدروکسی‌پرولین را به عنوان شاخص اصلی برای تشخیص کلاژن مطرح کرده‌اند (۲۸). اندازه‌گیری هیدروکسی‌پرولین، توسط روش‌های رنگ‌سنجی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تجزیه و تحلیل تزریق جریان انجام می‌گیرد (۲۷). به طوری‌که افزایش این آمینواسید نشانه افزایش تشکیل کلاژن و روند بهبودی زخم است (۱۹).

ترمیم زخم یک پاسخ فیزیولوژیکی به درمان ضایعات بافتی است و شامل چهار مرحله اساسی هموستاز، التهاب، رشدوتکثیر و بازسازی می‌شود. تولید انواع کلاژن به ویژه کلاژن نوع III در مرحله تکثیر و تقریبا از روز چهارم شروع می‌شود (۵ ، ۱۸). در بیماران دیابتی، مکانیسم تأخیر در ترمیم زخم به طور کامل شناخته شده نیست اما تغییر در روند سنتز کلاژن، متابولیسم غیرطبیعی در رسوب کلاژن در محل زخم و تغییر نسبت مقدار کلاژن نوع III به نوع I می‌تواند از عوامل مؤثر بر آن باشد (۳).

در دهه‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه ترمیم انواع زخم‌ها از جمله لارودرمانی، لیزردرمانی، ژن‌درمانی، انتقال فاکتور رشد پلاکتی و درمان با سلول‌های بنیادی مختلف صورت گرفته است (۱۹ ، ۲۹). با این حال، استفاده از انواع عصاره های گیاهی برای التیام زخم‌های دیابتی به منظور کاهش عوارض ناشی از روش‌های درمانی مختلف مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته‌است (۱). ۳ گیاه بومی که در مقالات متعدد به عنوان گیاهان موثر بر ترمیم زخم معرفی شده‌اند می‌توان به غازیاقی با نام علمی *Falcaria vulgaris*، گل ماهور با نام علمی *Verbascum* spp. و خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* اشاره کرد (۲).

Falcaria vulgaris: گیاه غازیاقی یا پاغازه از خانواده چتریان (Apiaceae)، جز گیاهان بومی غرب و جنوب غرب ایران بوده و در مناطقی از اروپا، آسیا، آفریقا و آمریکا نیزگزارش شده‌است (۲ ، ۳۷). در طب سنتی این گیاه به صورت سبزی خوراکی و به منظور درمان التهابات گوارشی و تسریع در بهبود زخم مصرف می‌شود (۴).

***Verbascum* spp**: گل ماهور از خانواده گل میمون (Scrophulariaceae) است و در نواحی غرب و شمال غربی ایران به نام‌های علف خرگوش، علف ماهور و خرگوشک شناخته می‌شود (۲). در طب سنتی، برای درمان التهاب دهان، نای، شکم و روده و مشکلات تنفسی استفاده می‌شود (۲۴). فلاونوئیدها و پلی‌ساکاریدهای موجود در این گیاه در روند ترمیم زخم‌ها، سوختگی‌ها، بهبود التهاب‌های داخلی و اسهال به عنوان عامل مؤثّری گزارش شده‌اند (۳۷).

Silybum marianum: خارمریم گیاهی از تیره کاسنی (Asteraceae) در ایران، کشورهای اروپایی، آسیایی و

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸
DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

آمریکایی می‌روید و با نام‌های ماری تیغال، خارعلیص و عکوب شناخته می‌شود (۷).

اگرچه در یافته‌های پیشین، گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر گیاهان غازیاقی، گل ماهور و خارمریم، بر ترمیم زخم دیده می‌شود(۱۵، ۳۵، ۳۸) ، اما تاکنون پتانسیل درمانی این گیاهان بر درمان زخم‌های دیابتی مورد بررسی قرار نگرفته‌است. با توجه به اهمیت درمان زخم‌های دیابتی و قطع عضوهای ناشی از آن، در این مطالعه به طور همزمان خواص ترمیمی این سه گیاه برروی زخم موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفته و با اندازه‌گیری سایز زخم، درصد بهبودی و همچنین سنجش آمینواسید هیدروکسی‌پرولین به عنوان شاخص تشخیص کلاژن، اثر دیابت بر سنتز این پروتئین در فرآیند ترمیم زخم، ارزیابی می‌گردد.

مواد و روشها

استخراج عصاره‌های گیاهی: گیاهان غازیاقی، خارمریم و گل ماهور از فروشگاه محلی در سبزوار تهیه و به تایید گیاه‌شناس رسید. گیاهان در ارلن‌های مجزا به نسبت ۱: ۱۰ پودر خشک شده–اتانول ۷۰٪ مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر مخلوط گردیدند (۲۰۰rpm). سپس توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد و با دستگاه روتاری در دور rpm ۴۰ و دمای $45^{o}C$ تغلیظ شدند. سپس جهت تغلیظ بیشتر به آون منتقل شدند (۲۴ ساعت در ^{o}C ۵۵) و در نهایت به صورت صمغ به‌دست آمدند. سرانجام طبق دستور زیر عصاره‌های ۲۵٪ و ۵۰٪ از هر گیاه (پماد) به منظور تیمارکردن، به صورت وزنی– وزنی آماده شدند:

۱۰ گرم عصاره + ۱۰ گرم اوسرین: ۲۰ گرم عصاره ۵۰٪ (High Dose)

۵ گرم عصاره + ۱۵ گرم اوسرین :۲۰ گرم عصاره ۲۵٪ Low (Dose)

مدل جانوری: این مطالعه بر روی ۵۰ سر موش نر ۸ هفته‌ای از نژاد سوری با میانگین وزنی ۳۰–۲۵ گرم انجام شد. موش‌ها در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات در اتاق جانوران دانشکده علوم دانشگاه حکیم سبزواری، با درجه حرارت^{o}C ۲۴ و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی–تاریکی نگهداری شده و محدودیتی از نظر مصرف آب شهری و قطعات غذا (pellet) نداشتند.

روش القای دیابت: دیابت تجربی در موش‌ها با تزریق زیرجلدی ۲۰۰mg/kg استرپتوزوتوسین (STZ– Streptozotocin) به صورت درون صفاقی انجام شد. برای اطمینان از اینکه موش‌ها به صورت ارثی مبتلا نباشند، یک روز قبل از تزریق، از آنها با استفاده از دستگاه گلوکومتر تست قند گرفته شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ، موش‌هایی که قند خون آن‌ها بیش از ۲۵۰ mg/dl بود، دیابتی در نظر گرفته شدند و برای اطمینان از دیابتی شدن موش‌ها قند خون آن‌ها در دو نوبت دیگر نیز با فاصله زمانی ۴ روز اندازه‌گیری شد.

گروه‌های آزمایشی: به منظور تایید القای دیابت از ۴۰ سر از موش‌های دیابتی، یک روز قبل از ایجاد زخم، تست خون گرفته شد. موش‌های دیابتی به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۱۰تایی تقسیم شدند و یک گروه ۱۰ تایی از موش‌هایی غیردیابتی به عنوان گروه شاهد (شم) در نظرگرفته شدند. ترتیب گروه‌ها به این شرح است: گروه۱ (Healthy-Sham): موش‌های غیردیابتی تیمارشده با اوسرین (Eucerin)، گروه ۲ (Diabetic-Control): موش‌های دیابتی تیمارشده با اوسرین، گروه ۳ (FV): موش‌های دیابتی تیمارشده با عصاره‌ی غازیاقی، گروه ۴ (SM): موش‌های دیابتی تیمارشده با عصاره‌ی خار مریم، گروه۵ (VS): موش‌های دیابتی تیمار شده با عصاره‌ی گل ماهور.

روش ایجاد زخم: به منظور ایجاد زخم ابتدا موش‌ها با کتامین– زایلازین بیهوش شدند، سپس با استفاده از دستگاه الکتریکی موزن و کرم موبر، موهای قسمت پشت جانور کوتاه و تراشیده شد. بعد پشت جانور با استفاده از پنبه الکلی ضدعفونی و با استفاده از پانچ تعداد ۴ زخم (۲ زخم

DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

سمت راست و ۲ زخم سمت چپ) برروی آن ایجاد گردید.

تیمار: تیمار بلافاصله پس از ایجاد زخم در پشت موش‌ها و سپس به مدت ۵ روز تا قبل از روز بیوپسی در گروه‌های پنج‌گانه انجام گردید. با استفاده از سواپ مقدار مشخص از دوز ۲۵٪ بر روی زخم‌های سمت چپ و دوز ۵۰٪ بر روی زخم‌های سمت راست در گروه‌های تیمار (غازیاقی- خارمریم -گل ماهور) قرار داده‌شد. چون زخم‌ها سطحی هستند، استفاده از یک میزبان، تداخلی در پاسخ بافتی، ایجاد نمی‌کند و اثر زمینه‌ای را هم حذف می‌کند. به جهت مشابه‌سازی درگروه‌های شاهد (شم) و کنترل نیز از پماد اوسرین (Eucerin) استفاده شد.

روش تعیین درصد بهبودی زخم: در روزهای اول و پنجم دوره تیمار، از زخم موش‌ها عکس‌برداری صورت گرفت. مساحت زخم‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ V 1.52 براساس واحد میلی‌مترمربع، اندازه‌گیری شد و سپس درصد بهبودی زخم با استفاده از فرمول (مساحت زخم در روز اول – مساحت زخم در روزX) ×۱۰۰/ مساحت زخم در روز اول محاسبه گردید.

روش نمونه‌گیری از محل زخم: تولید کلاژن از حدود ۱۰ ساعت بعد از ایجاد زخم، آشکار و بعد از ۵ تا ۷ روز به حداکثر می‌رسد. در روز ششم پس از جراحی و بعد از ۵ روز تیمار، ابتدا موش‌ها به نوبت با روش آسان کشی، کشته شدند و بلافاصله بافت ترمیم شده محل زخم، به همان اندازه اولیه ۵ میلی‌متری با پانچ برداشته و به فالکون حاوی ۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار، جهت هموژنیزه شدن منتقل شدند. سپس فالکون ها به مدت ۱۴ تا ۱۶ ساعت درون آون با درجه حرارت ^{o}C ۹۵ جهت انجام مراحل بعدی قرار داده شد.

روش انجام مطالعات بیوشیمیایی : اندازه‌گیری هیدروکسی‌پرولین با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از آمینواسید L – هیدروکسی‌پرولین به عنوان استاندارد، انجام می‌شود. دو معرف کلرامین-T (Chloramine-T) و ارلیخ (Ehrlich) در حضور هیدروکسی‌پرولین، رنگی تولید می‌کنند که در طول موج مشخص (nm ۵۶۰-۵۴۰) دارای بیشترین جذب نوری می‌باشد (۳۰). به منظور سنجش میزان کلاژن، هیدروکسی پرولین بایستی استخراج گردد. بدین منظور ابتدا محلول‌های معرف کلرامین T (0.07 g/ml)، بافر استات – سیترات (pH= 6 و 0.1 g/ml) و معرف ارلیخ (0.13 g/ml) آماده شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق‌شده با آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر معرف فنل‌فتالئین اضافه گردید. همراه با ورتکس، نمونه‌ها با افزودن تدریجی NaOH 6 M ارغوانی شدند و با افزودن تدریجی HCL 1M بی‌رنگ شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ازمعرف کلرامین T و ۱ میلی‌لیتر معرف ارلیخ اضافه گردید و در داخل آون و در دمای ^{o}C ۶۰ قرار داده‌شد. در نهایت با استفاده از دستگاه الایزاریدر میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۵۴۳ نانومتر خوانده شد.

محاسبه غلظت نمونه‌ها و رسم منحنی استاندارد هیدروکسی‌پرولین: ابتدا با خوانش جذب غلظت‌های استاندارد هیدروکسی‌پرولین (۶µg/ml، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰) در دستگاه الایزا ریدر درطول موج ۵۴۳ نانومتر، منحنی کالیبراسیون استاندارد هیدروکسی‌پرولین با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel۲۰۱۳ رسم شد و معادله خط و ضریب رگرسیون آن به دست آمد. سپس با استفاده از جذب نمونه‌های مجهول در دستگاه الایزا ریدر و معادله خط منحنی استاندارد هیدروکسی‌پرولین، غلظت‌های هر یک از نمونه‌ها از طریق فرمول Y= 0.01X+0.0533 محاسبه گردید. در این فرمول Y عدد جذبی خوانده شده از دستگاه الایزا ریدر و X بیانگرغلظت نمونه‌ها است. آزمون شاپیرو- ویلک نشان داد که داده‌های غلظت در تمام گروه‌ها نرمال هستند.

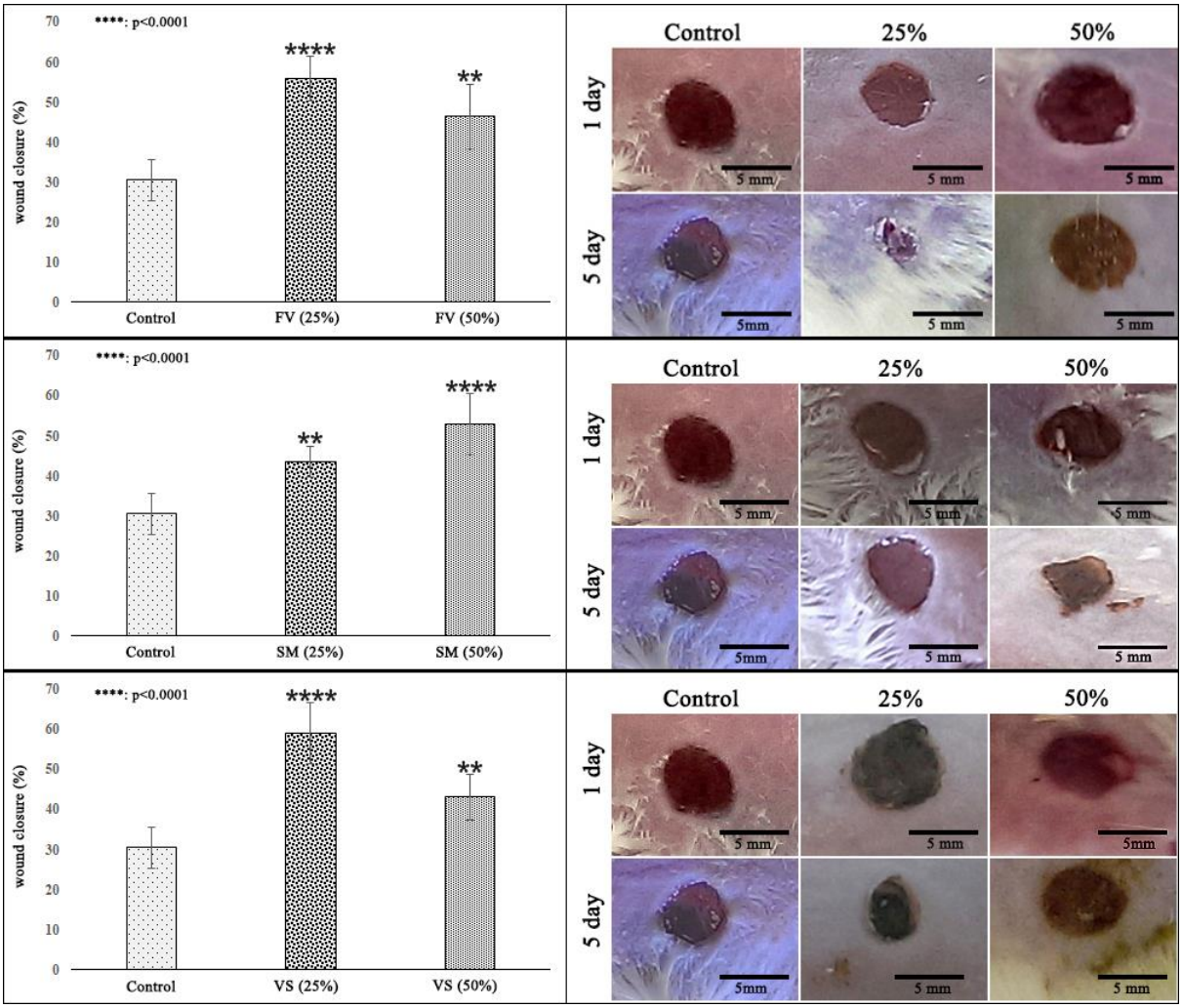
مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸
DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

روش آنالیز آماری: داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS21 و با آزمون ANOVA با یکدیگر مقایسه و نتایج آن‌ها به صورت Mean±SD گزارش شد.

نتایج

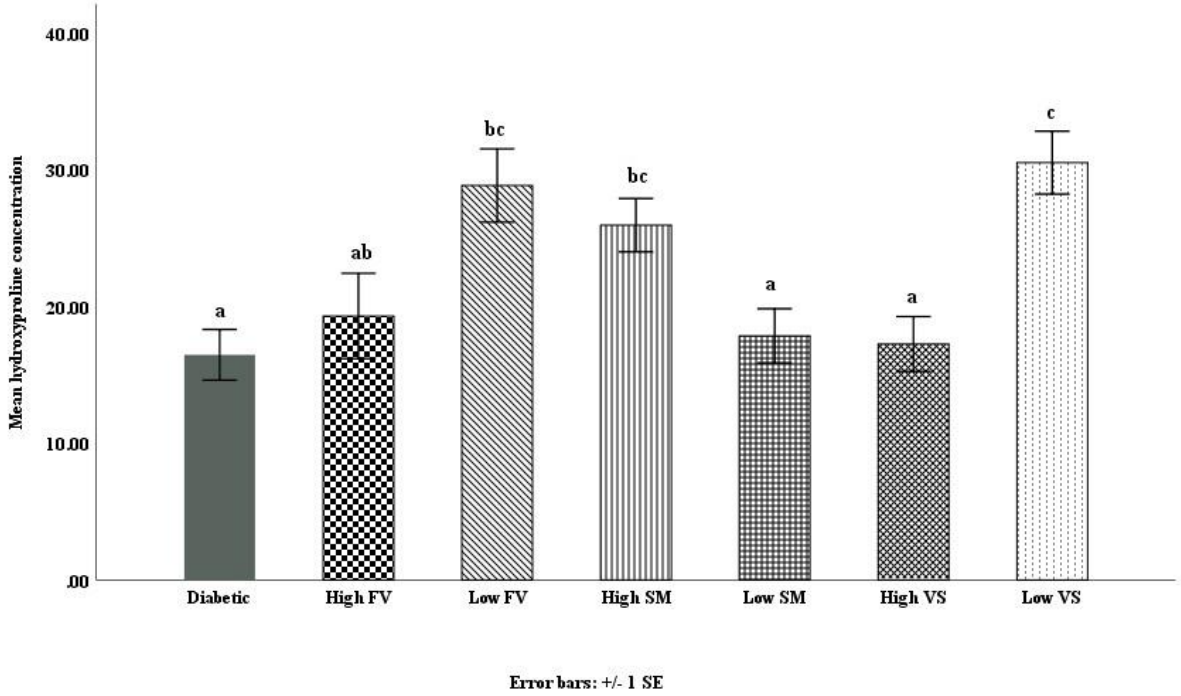
مقایسه تأثیر عصاره‌های گیاهی بر ترمیم زخم موش‌های دیابتی: نتایج آزمون آنوا با اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که درصد بسته شدن زخم با گذشت زمان به طور معنی‌داری افزایش یافته‌است. در حالت طبیعی درصد بهبودی، در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل بیشتر است. میزان بهبودی در گروه‌های تیمارشده با دوز کم غازیاقی (Low FV) و دوز کم گل ماهور (Low VS) و دوز بالای خارمریم (High SM) با اختلاف معنی‌دار، بیشتر از گروه کنترل شد ($p<0.0001$)(شکل ۱).

سنجش و مقایسه غلظت هیدروکسی‌پرولین: غلظت هیدروکسی‌پرولین در گروه تیمار با دوز پایین غازیاقی (Low FV) و دوز پایین گل ماهور (Low VS) نسبت به گروه کنترل افزایش بیشتری داشته‌است، همچنین این غلظت درگروه تیمار با دوز بالای خارمریم (High SM) نسبت به گروه کنترل بیشتر شده‌است.



شکل ۱. مقایسه میزان بهبودی در دوزهای بالا و پایین گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل. بررسی‌های نشان می‌دهد که پس از گذشت زمان درصد بسته شدن زخم به طور معنی‌داری افزایش یافته‌است. میزان بهبودی و بسته شدن زخم، در گروه‌های تیمارشده با دوز کم غازیاقی (*Low FV-25%*) ، دوز بالای خارمریم (*High SM-50%*) و دوز کم گل ماهور (*Low VS-25%*) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است .

DOI: 10.22034/CMR.2024.2213 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸



شکل ۲. مقایسه غلظت هیدروکسی‌پرولین در گروه‌های تیمارشده با دوز بالا و پایین عصاره‌ها با یکدیگر و با گروه کنترل. حروف ناهمسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح ۵٪ است.

بحث و نتیجه گیری

با وجود مشکلات مربوط به بهبود و درمان زخم در بیماران دیابتی، در جهت ایجاد راهکار درمانی مناسب مطالعه حاضر انجام شد. اختلال در فرآیند ترمیم زخم و متعاقبا تاخیر در روند بهبود زخم از عوارض عمده دیابت می‌باشد که می‌تواند در نتیجه اختلال در بیوسنتز کلاژن ایجاد گردد و امروزه در مطالعات بسیاری در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است (۱۵، ۲۲). به طور مثال، در مطالعه ووها و همکاران(۱۳۷۵) گزارش شده است هنگامی که فیبروبلاست‌های پوستی انسان به مدت ۲۴ ساعت در ۱۵ میلی‌مولار گلوکز قرار گرفتند، میزان بیوسنتز کلاژن و پروتئین‌ها کمترشده و هنگامی که سلول‌های عضلات صاف با غلظت بالای گلوکز تیمار شدند، افزایش قابل‌توجهی در تولید کلاژن نوع I و نوع III مشاهده شد (۱۳).

در دهه‌های اخیر با پیشرفت روش‌های نوین در ترمیم زخم مانند زخم‌های دیابتی و توجه به خاصیت ترمیمی گیاهان دارویی، چالش جدیدی در زمینه ترمیم زخم‌های پوستی ایجاد شده‌است (۲۲). در کشورمان ایران نیز، مطالعات بسیاری در مورد اثرات گیاهان دارویی مختلف بر بهبود انواع زخم از جمله زخم‌های دیابتی انجام شده‌است (۲۲، ۲۴). در پژوهشی که اثر پماد عصارهٔ برگ گیاه مورد *Myrtus communis* (Myriaceae)، بر روند ترمیم زخم در رت‌های نژاد ویستار بررسی شده است، گزارش شده که تیمار زخم با این پماد در گروه تجربی، منجر به افزایش معنی‌دار درصد بهبود زخم، تعداد فولیکول‌های مو، رگ‌های خونی، ضخامت پوست و قطر کلاژن رسوب‌گذاری شده گردیده‌است. این نتایج دلیلی بر تسریع روند بهبود زخم در نمونه‌های تحت تیمار بود (۲۵). همچنین در پژوهش‌های دیگری، اثرعصاره‌های گیاه علف جوش(*Lotus corniculatus*) و هسته انگور (*Vitis vinifera*)

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸
DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

بر تسریع روند ترمیم زخم‌های دیابتی موش صحرائی نر گزارش شده‌است (۱۰، ۳۳).

در مطالعه گورانی و همکاران (۱۳۹۷)، اثر عصاره هیدروالکلی گیاه غازیاقی برافزایش تعداد فیبروبلاست‌ها و تحریک آن‌ها در ساخت کلاژن و در نتیجه افزایش در سرعت ترمیم زخم پوستی بررسی شده‌است (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای، تیمار زخم گروه‌های تجربی رت، با دوز کم عصاره گل ماهور میزان کلاژن را در برش‌های بافتی افزایش داده‌است (۲۶). در پژوهشی نیز نشان داده‌شده است که عصاره هیدروالکلی خارمریم به طور معنی‌داری موجب تسریع روند بهبود زخم بر روی زخم بازپوستی مدل‌های حیوانی شده‌است . احتمال می‌رود که اجزا مؤثّر گیاه خارمریم، موجب تحریک ساخت کلاژن و انقباض سریع‌تر زخم، رگ‌زایی، اتساع عروقی و همچنین کاهش التهاب، خونریزی و ادم زخم می‌شود (۹).

با وجود مطالعات بسیاری در این زمینه، مکانیسم‌های ملکولی اثرات عصاره‌های گیاهی بر ترمیم زخم به خصوص فرآیند سنتز کلاژن در شرایط هایپرگلیسمی کمتر بررسی شده‌است. در مطالعه حاضر، اثرات گیاهان غازیاقی، گل ماهور و خارمریم بر فرآیند ترمیم زخم در موش‌های نر سوری دیابتی شده با داروی استرپتوزوتوسین، به طور جداگانه مورد بحث و بررسی قرارگرفت. همانطور که ذکر شد اثرات زخم درمانی این گیاهان و تاثیر آن‌ها بر سنتز کلاژن در زخم‌های باز مدل‌های حیوانی، توسط محققین مختلف تایید شده است (۱۱، ۱۹، ۳۱)؛ در حالی که تاثیر عصاره این گیاهان بر درمان زخم‌های دیابتی بررسی نشده است و لذا مطالعه حاضر می‌تواند اولین پژوهش باشد. این نکته هائز اهمیت است که تاثیرعصاره هیدروالکلی این گیاهان بر روی زخم باز به دلیل استخراج ترکیبات موثره، از پودر خشک آن‌ها بیشتر است. از طرفی با توجه به تاثیرپذیری فعالیت بیولوژیک عصاره گیاهان دارویی از عوامل محیطی و ژنتیکی و پیچیدگی ساختار شیمیایی آن‌ها، تعیین مکانیسم ملکولی این اثرات سخت خواهد بود(۱۲، ۳۵).

اندازه‌گیری سایز زخم و سپس محاسبه درصد بسته شدن زخم (بهبودی)، شاخصی برای تعیین میزان اثرگذاری عوامل مختلف در پژوهش مورد نظر است. در این روش باعکس‌برداری ماکروسکوپی از فواصل معین همراه با درج مقیاس و با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف، می‌توان سایز زخم و سپس درصد بهبودی را تعیین نمود (۳۶). در این مطالعه با روش مذکور و با استفاده از نرم افزار ImageJ سایز زخم برحسب mm^2 و درصد بهبودی محاسبه گردید. پیرو نتایج مطالعات پیشین(۱۵)، نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که زخم‌های موش‌های دیابتی دیر ترمیم می‌شوند ولی در گروه‌های دیابتی تیمار شده با دوزهای متفاوت عصاره‌های مذکور، تفاوت معنی داری دیده شد. براساس مطالعات ماکروسکوپی سرعت ترمیم زخم در گروه‌های تیمارشده با عصاره غازیاقی و گل ماهور (دوزهای ۲۵ ٪ عصاره) بیشتر از زخم‌های تیمارشده با دوز بالاتر بود. در حالی که گروه تیمارشده با عصاره خارمریم (دوز ۵۰ ٪) درصد بهبودی بیشتری را نسبت به دوز پایین با سطح معنی‌داری $P\leq0.0001$ را نشان داد. همچنین می توان نتیجه گرفت در فرایند ترمیم زخم، پاسخ بافتی به دوزهای متنوع از انواع عصاره‌های گیاهی متفاوت است، زیرا احتمال دارد نوع و میزان ماده موثره در هر گیاه و در دوزهای مختلف، متفاوت باشد .

در مطالعه حاضر، برای بررسی سنتز کلاژن از آمینواسید هیدروکسی‌پرولین، به عنوان شاخص تشکیل کلاژن در بافت‌های بیوپسی شده استفاده گردید. نتایج حاصل از سنجش هیدروکسی‌پرولین با نتایج فوق مطابقت داشت، به‌طوری که در گروه‌های تیمار با دوز پایین عصاره غازیاقی و گل ماهور و دوز بالای عصاره خارمریم، افزایش غلظت هیدروکسی‌پرولین مشاهده شد و بالعکس گروه‌های تیمار با دوز بالای عصاره غازیاقی وگل ماهور و دوز پایین

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸
DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

عصاره خارمریم، کاهش غلظت هیدروکسی‌پرولین را نشان دادند($p<0.05$). تصور می‌شود که دیابت با اختلال در سنتز کلاژن، موجب تاخیر در بسته‌شدن زخم در گروه دیابتی شده‌است، اما در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌های گیاهی میزان کلاژن افزایش یافته‌است و بهبودی در زخم حاصل شده‌است.

با توجه به اهمیت درمان زخم‌های دیابتی با داروهایی با عوارض جانبی کمتر، این پژوهش انجام شد ونتایج نشان داد که عصاره‌های هیدروالکلی سه گیاه غازیاقی، گل ماهور و خارمریم در بهبود زخم دیابتی می‌توانند مؤثر باشند، که همخوانی مطالعات ماکروسکوپی در شرایط in vivo، تست رنگ سنجی و سنجش غلظت هیدروکسی‌پرولین به عنوان شاخص تشخیص کلاژن، این موضوع را تأیید کرد. با این حال می‌توان ترکیبات موثره گیاهان را جداگانه استخراج نمود و اثرات آنها را بر مکانیسم ملکولی مسیر بیوسنتز کلاژن بررسی کرد.

منابع

1. Abdollahi M (2015). Role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-2 (NGAL) in poor wound healing in diabetes. The University of Sydney, Sydney.
2. Afshar M, Fard HS, Shadi M, Ghaderi R (2015). Repairing effects of Iran flora on wound healing. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 22(1): 1-18.
3. Apikoglu-Rabus S, Izzettin F, Turan P, Ercan F (2010). Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology, 35(2):180-185. https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03419.x
4. Choobkar N, Kakoolaki S, Mohammadi F, (2017). The biological effects of herbal medicine, *Falcaria vulgaris*: An article review. Iranian Journal of Aquatic Animal Health, *3*(1), https://doi.org/74-83. 10.18869/acadpub.ijaah.3.1.74
5. Diegelmann RF, Evans MC (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front biosci, *9*(1): 283-289. https://doi.org/10.2741/1184.
6. Edwards C, O'Brien JrW (1980). Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. Clinica chimica acta, 104(2):161-167. https://doi.org/10.1016/0009-8981(80)90192-8.
7. Fallah Huseini H, Hemati AR, Alavian SM (2004). A review of herbal medicine: *Silybum marianum*. Journal of Medicinal Plants, 3(11), 14-24.
8. Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced drug delivery reviews, 55(12): 1531-1546. https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002.
9. Ghorbani RA, Varzandian S, Zarei A, Asmarian S, Jouibar F (2014). Investigation of hydralcoholic extract of *Silybum marianum* on open wound healing in mice.
10. Gomar A, Hosseini A, Mirazi N (2014). Effect of *Lotus corniculatus L.* Extracts on Wound Healing In Male Diabetic Rats Induced With Streptozocin. *Medical Journal of* Tabriz University of Medical Sciences, 36(4):94-101.
11. Goorani S, Zangeneh MM, Koohi MK, Seydi N, Zangeneh A, Souri N, Hosseini MS (2019). Assessment of antioxidant and cutaneous wound healing effects of *Falcaria vulgaris* aqueous extract in Wistar male rats. Comparative Clinical Pathology, 1-11. https://doi.org/10.1007/s00580-018-2866-3.
12. Gushiken LF, Beserra FP, Rozza AL, Bérgamo PL, Bérgamo DA, Pellizzon CH (2016). Chemical and Biological Aspects of Extracts from Medicinal Plants with Antidiabetic Effects. The review of diabetic studies : RDS, 13(2-3): 96–112. https://doi.org/10.1900/RDS.2016.13.96.
13. Ha SW, Seo YK, Kim JG, Sohn KY, Lee BH, Kim BW (1997). Effect of high glucose on synthesis and gene expression of collagen and fibronectin in cultured vascular smooth muscle cells. Experimental & Molecular Medicine, 29(1): 59. https://doi.org/10.1038/emm.1997.9.
14. Hansen SL, Myers CA, Charboneau A, Young DM, Boudreau N (2003). HoxD3 accelerates wound healing in diabetic mice. The American journal of pathology, 163(6):2421-2431. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63597-3.
15. Jafari NH, Taghavi M, Shariati M, Rezvani A (2012). Skin Wound Healing of Chronic Diabetic Rats Using Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids.

DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

16. Kalashnikova I, Das S, Seal S (2015). Nanomaterials for wound healing: scope and advancement. Nanomedicine, 10(16): 2593-2612. https://doi.org/10.2217/nnm.15.82

17. Kayır S, Demirci Y, Demirci S, Ertürk E, Ayaz E, Doğan A, Şahin F (2018). The in vivo effects of *Verbascum speciosum* on wound healing. South African Journal of Botany, 119: 226-229. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.013.

18. Li D, Peng C, Xie X, Mao Y, Li M, Cao Z, Fan D (2014). Antidiabetic effect of flavonoids from *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes leaves in diabetic mice and rats. Journal of ethnopharmacology, 153(3): 561-567. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.026.

19. Lin YK, Kuan CY (2010). Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. Food chemistry, 119(3):1271-1277. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.009.

20. Martin P, (1997). Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. Science, 276(5309): 75-81. https://doi.org/10.1126/science.276.5309.7.

21. McLennan S, Min D, Yue D (2008). Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association, 16(3): 116-121.

22. Miroliaei M, Aminjafari A. A histopathological evaluation of wound healing action of extracts from Glaucium corniculatum (L.) Curt. Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology). 2018 Mar 21;31(1):58-66.

23. Momeni Moghaddam M, Vatandoost J (2017). Mouse skin wound healing using Lucilia sericata maggot extract. Cellular and Molecular Research. Iranian Journal of Biology, 30(1):26-39.

24. Moradi M, Nazeri V, Hassandokht MR, Soorni A (2014). Evaluation morphological diversity and essential oil content of Thymus transcaspicus Klokov. in Iran.

25. Nabiuni M, Mousavi R., Ramezani T (2014). The effect of *Myrtus communism* leave extract cream on wound healing process in Wistar rats. Complementary Medicine Journal, 4(3): 854-864.

26. Nabiuni M, Oryan S, Ayyobipor M, Bagheri M (2011). Histochemical study of *Verbascum speciocum* extract's effects on the wound healing in rats.

27. Qiu B, Wei F, Sun X, Wang X, Duan B, Shi C, Mu W (2014). Measurement of hydroxyproline in collagen with three different methods. Molecular medicine reports, 10(2): 1157-1163.

28. Reddy GK, Enwemeka CS (1996). A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. Clinical biochemistry, 29(3): 225-229. https://doi.org/10.1016/0009-9120(96)00003-6.

29. Riki S, Sabokkhiz MA, Hajar T, Momeni-Moghaddam M (2019). Galectin 1 and Superoxide Dismutase are Involved in Wound Healing by Larval Therapy. Journal of Genetic Resources, 5(2): 130-135.

30. Romano G, Moretti G, Di Benedetto A, Giofre C, Di Cesare E, Russo G, Cucinotta D (1998). Skin lesions in diabetes mellitus: prevalence and clinical correlations. Diabetes research and clinical practice, 39(2): 101-106. https://doi.org/10.1016/S0168-8227(97)00119-8.

31. Sharifi R, Pasalar P, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M, Akbari, M (2013). The effect of silymarin (*Silybum marianum*) on human skin fibroblasts in an in vitro wound healing model. Pharmaceutical Biology, 51(3): 298-303. https://doi.org/10.3109/13880209.2012.721789.

32. Sharifi R, Rastegar H, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M, Pasalar P (2012). Effect of topical application of silymarin (*Silybum marianum*) on excision wound healing in albino rats. Acta Medica Iranica, 583-588. https://doi.org/10.3109/13880209.2012.721789.

33. Shiravi A, Hojati V (2016). Effect of alcoholic extract of grape (*Vitis vinifera*) on wound healing diabetic male Wistar rats. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism, 15(3):177-182.

34. Sibilla S, Godfrey M, Brewer S, Budh-Raja A, Genovese L (2015). An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific background and clinical studies. The Open Nutraceuticals Journal, *8*(1).

35. Sitarek P, Merecz-Sadowska A, Śliwiński T, Zajdel R, Kowalczyk T (2020). An in vitro evaluation of the molecular mechanisms of action of medical plants from the Lamiaceae family as effective sources of active compounds against human cancer cell lines. Cancers, 12(10): 2957. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111556.

36. Varzaneh R, Moshtaghian S, Talebi A, Abedini F (2015). The effects of polyvinyl pyrrolidone hydrogel dressing on open-wound healing in rats. Journal of Isfahan Medical School, *32*(313): 2134-2138.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۳-۱۶۸ DOI: 10.22034/CMR.2024.2213

37. Vatanchian M, Delavar A, Shahsavand S, Kamali H (2015). Teratogenic effects of aqueous extract of aerial part of *Verbascum cheiranthifolium* in mouse embryo. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, *6*(4): 957-967.

38. Zangeneh MM, Ghaneialvar H, Akbaribazm M, Ghanimatdan M, Abbasi N, Goorani S, Zangeneh A (2019). Novel synthesis of *Falcaria vulgaris* leaf extract conjugated copper nanoparticles with potent cytotoxicity, antioxidant, antifungal, antibacterial, and cutaneous wound healing activities under in vitro and in vivo condition. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 197: 111-556. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111556.

Investigating the Effect of Sickleweed, mullein and cardus marianus extracts on collagen synthesis in diabetic wound healing

Yazdaninejad J.[1], Hajjar T.[1], Momeni-Moghadam M.[1], Kohan Baghkheirati I.[1], Ghodsi A.R.[2] and Ghavidel Z.[1]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

[2] Dept. of Statistics, Faculty of Mathematics and Computer Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

Abstarct

Defect in collagen synthesis is one of the reasons for Failure to heal wounds in diabetic patients. Hyperglycemia inhibits cell proliferation and collagen production in wounds and may lead to amputation. Today, using herbs to heal wounds such as diabetic wounds is very important. This project aims to investigate the effect of hydroalcoholic extracts of *Falcaria vulgaris*, *Verbascum spp* and *Silybum marianum* plants on the healing of diabetic wounds and collagen synthesis. 50 male mice (10 non-diabetic and 40 diabetics with Streptozotocin) were used in this study. After anaesthesia and wounding on the backs of mice, the wounds of both sham and control groups were treated with Eucerin and three experimental groups were treated with hydroalcoholic extracts of *Falcaria vulgaris*, *Verbascum spp* and *Silybum marianum* for 5 days. The left and right wounds were treated with 25% and 50% Eucerin-based extracts in the experimental groups, respectively. Macroscopic imaging of mice wounds was performed. ImageJ software was used to measure the wound surface and the wound healing rates were calculated. Chromatography and ELISA test were used to measure the level of hydroxyproline to detect collagen. The results were analyzed by SPSS statistical software. The results showed that the wound closure rate (healing) was significantly increased in the treated groups with a low dose of Sickleweed and mullein extract (25%) and a high dose of cardus marianus extract (50%) compared to the control. Collagen level, although increased in the treatment groups relative to control, was not significant. The present study results showed that the hydroalcoholic extracts of the three plants Sickleweed, mullein and cardus marianus could be effective in increasing collagen and healing diabetic wounds.

Keywords: Diabetic wound healing, collagen, Falcaria vulgaris, Verbascum spp, Silybum marianum.