

Histological evaluation of the effect of petroleum ether extract ointment of *Onosma dichroanthum* Boiss root on open skin wound healing in rat

Amirkhani Z^{1*}, Norouzian M², Piryaee A², Ayatollahi SA³, Saremi S³, Dadpay M⁴

1- Faculty of Medicine, International Branch of Shahid-Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Shahid-Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Shahid-Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Pathology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received 26 June, 2014; Accepted May 12, 2015

Abstract:

Background: *Onosma dichroanthum* Boiss. belongs to the Boraginaceae family and is one of the most important medicinal plants in north of Iran. This study aimed to examine the effect of the petroleum ether root extract ointment of *Onosma dichroanthum* Boiss. on healing of a surgically induced open skin wound in rats.

Materials and Methods: In this study, 54 male adult Wistar rats were randomly allocated into control, vehicle, and experimental groups. A 20-mm cephalocaudal incision was made on the back skin of rats. Rats were sacrificed on days 4, 7 and 14 and histological examination (the number of fibroblasts, neutrophil, blood vessel sections and thickness of epiderm) was performed on skin samples.

Results: On day 4, the number of fibroblasts was significantly increased in the experimental group compared to the vehicle ($P<0.003$) and control ($P<0.001$) groups. On day 7, no significant difference was seen in the number of fibroblasts in the experimental group compared to the vehicle group ($P<0.680$) and fibroblasts were significantly increased in the experimental and vehicle groups compared to the control ($P<0.001$). On day 14, fibroblasts were significantly increased in the experimental and control groups compared to the vehicle ($P<0.001$) and there was no significant difference in the number of fibroblasts in the experimental group compared to the control ($P<0.843$). Also, no significant difference was seen in the number of neutrophils, blood vessel sections and thickness of epiderm on days 4, 7 and 14 among the groups.

Conclusion: Topical application of the petroleum ether root extract of *onosma dichroanthum* Boiss. has no significant effect on the healing of skin wound in rats.

Keywords: *Onosma dichroanthum* Boiss, Wound healing, Cell count, Histology, Rat

* Corresponding Author.

Email: amirkhani_z@yahoo.com

Tel: 0098 21 238 72555

Fax: 0098 21 224 39976

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2015; Vol. 19, No 3, Pages 190-196

Please cite this article as: Amirkhani Z, Norouzian M, Piryaee A, Ayatollahi SA, Saremi S, Dadpay M. Histological evaluation of the effect of petroleum ether extract ointment of *Onosma dichroanthum* Boiss root on open skin wound healing in rat. *Feyz* 2015; 19(3): 190-6.

ارزیابی بافت شناختی اثر پماد حاوی عصاره پترولیوم اتری ریشه گیاه *Onosma dichroanthum* Boiss بر التیام زخم باز پوستی در موش صحرایی

زهرا امیرخانی^{*۱}، محسن نوروزیان^۲، عباس پیریایی^۳، سیدعبدالمجید آیت اللهی^۴، ثریا سارمی^۵، معصومه دادبی^۶

خلاصه:

سابقه و هدف: *Onosma dichroanthum* Boiss متعلق به خانواده بوراژیناسه است و یکی از مهمترین گیاهان دارویی در شمال ایران به شمار می‌آید. هدف این مطالعه تعیین اثر پماد عصاره پترولیوم اتری ریشه گیاه مذکور بر التیام زخم باز پوستی ایجاد شده به شیوه جراحی در موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۵۴ سر موش صحرایی نر بالغ به سه گروه شاهد، حامل و تجربی تقسیم شدند. در همه موش‌ها زخم برشی با ضخامت کامل پوست در جهت سری-دمی به طول ۲۰ میلی‌متر در ناحیه پشت ایجاد شد. موش‌ها در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ قربانی شدند. ارزیابی بافت شناختی (تعداد فیبروبلاست، نوتروفیل، مقاطع عروق و ضخامت اپیدرم) روی نمونه‌ها انجام شد.

نتایج: در روز ۴ تعداد فیبروبلاست‌ها در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه حامل ($P < 0/003$) و شاهد ($P < 0/001$) افزایش داشت. در روز ۷ تعداد فیبروبلاست‌ها در گروه تجربی با حامل تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0/680$) و در گروه‌های تجربی و حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد بود ($P < 0/001$). در روز ۱۴ تعداد فیبروبلاست‌ها در گروه تجربی و شاهد به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه حامل بود ($P < 0/001$) و در گروه تجربی با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0/843$). تعداد نوتروفیل، مقاطع عروق و ضخامت اپیدرم در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: پماد حاوی عصاره پترولیوم اتری ریشه این گیاه تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر التیام زخم نداشت.

واژگان کلیدی: *Onosma dichroanthum* Boiss، التیام زخم، شمارش سلولی، بافت شناسی، موش صحرایی

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۴، صفحات ۱۹۶-۱۹۰

مقدمه

ترمیم زخم را به سه فاز التهاب، نکثیر و تجدید ساختار تقسیم می‌کنند. در فاز التهاب طی ۲۴ ساعت اول پس از آسیب نوتروفیل‌ها به حداکثر رسیده و پس از ۳ روز کاهش می‌یابند. در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت ماکروفاژها به حداکثر می‌رسند و در روز پنجم اکثریت سلول‌های زخم را تشکیل می‌دهند. فاز پرولیفراسیون از انتهای دیررس فاز التهاب شروع می‌شود که روز سوم پس از آسیب است. فیبروبلاست کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان را می‌سازد. میزان سنتز کلاژن تا سه هفته به‌طور مداوم زیاد می‌شود تا یک نقطه تعادل به‌دست آید؛ یعنی نقطه‌ای که سنتز و تجزیه کلاژن برابر است [۳]. فاز تجدید ساختار سه هفته بعد از آسیب شروع می‌شود که در آن تعادل بین سنتز و تجزیه کلاژن وجود دارد [۴]. باتوجه به اهمیت ترمیم زخم و این که عدم درمان زخم‌های باز ممکن است منجر به عفونت موضعی [۵] و در نهایت سرطان شود، پژوهش‌های مختلفی روی ترمیم زخم انجام شده و در نتیجه‌ی آن، مواد مختلفی به‌صورت مرهم زخم‌ها تهیه و معرفی شده‌اند که اغلب این مواد به‌صورت ترکیبات گیاهی و گاهی شیمیایی بوده‌اند، ولی تا این زمان هیچ‌کدام نتوانسته‌اند به‌عنوان یک داروی موثر توصیه شوند [۶]. امروزه گرایش مجددی به مصرف گیاهان دارویی به دلیل کم‌بودن عوارض سوء جانبی، گوناگونی ترکیبات موثر موجود در گیاهان، توسعه‌ی صنایع وابسته به کشت گیاهان

زخم پوستی روندی است که با هماهنگی بافت‌ها، سلول‌ها و فاکتورهای مختلف التیام می‌یابد [۱]. ترمیم زخم عبارت است از پاسخ‌های ترمیمی هماهنگ سلول‌های خونی ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های پارانشیمال که پس از اعمال جراحی و یا آسیب‌های حاصل از ضربه (که منجر به پارگی بافت گردند) در بدن انجام می‌شود [۲].

^۱ کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، شعبه بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ دانشیار، گروه علوم تشریحی و زیست شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۳ استادیار، گروه علوم تشریحی و زیست شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۴ استاد، گروه فارماکوتوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۵ کارشناس رشته زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۶ پزشک عمومی، گروه آسیب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران

*نشانی نویسنده مسئول:

تهران، اوین، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی

دوره‌نویس: ۰۲۱ ۲۲۴۳۹۹۷۶

تلفن: ۰۲۱ ۲۳۸۷۲۵۵۵

پست الکترونیک: amirkhani_z@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۲/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۵

دارویی، جلوگیری از خروج ارز به خارج از کشور، ایجاد کار مفید [۷] و به خصوص پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) [۸] و بسیاری از دلایل دیگر به وجود آمده است. از سوی دیگر، با توجه به عدم معرفی یک داروی موثر برای درمان زخم، مطالعه‌ی اثر گیاهان دارویی برای زخم ضرورت دارد. یکی از این گیاهان *Onosma dichroanthum* Boiss *thum* Boiss متعلق به خانواده Boraginaceae است [۹]. در برخی منابع و مقالات به آثار و خواص درمانی متنوع و جالب گونه‌های *Onosma* اعم از خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدان [۱۰-۱۲]، ضد التهابی، ضد آلرژی و ضد درد [۱۳، ۱۴]، ضد تومور و ضد سرطان [۱۵-۱۸] اشاره شده است. در طب سنتی ریشه این گیاه برای درمان سوختگی و التیام زخم و بریدگی‌های سطحی پوست و همچنین در درمان برخی از بیماری‌های پوستی به کار برده شده است [۱۹-۲۲]. مطالعات نشان داده است که ریشه گونه‌های خانواده بوراژیناسه از جمله گیاه مذکور، غنی از نفتاکنون (Naphthoquinone)، شیکونین (Shikonin) و آلکانا-نین (Alkanin) است [۲۳]. آلکانین و شیکونین و مشتقات آن‌ها که در عصاره‌ی ریشه‌ی انواع گونه‌های *Onosma* [۲۰، ۲۲، ۲۴] وجود دارد، دارای اثرات ضد میکروبی [۲۵]، ضد التهابی [۲۶، ۲۷] و آنتی‌اکسیدان [۳۱-۳۲] می‌باشند. شیکونین و مشتقات آن بر فعالیت فیبروبلاست‌ها و افزایش تولید کلاژن مؤثر است [۳۲، ۳۳]. براساس مطالعات فوق و باتوجه به اینکه مطالعات انجام شده به‌طور عمده بر روی زخم‌های ناشی از سوختگی صورت گرفته است و مطالعه کافی بر روی زخم‌های ناشی از بریدگی (که معمولاً پس از اعمال جراحی ایجاد می‌شوند) و یا آسیب‌های حاصل از ضربه (که منجر به پارگی بافت می‌گردند) انجام نشده است و از سوی دیگر مطالعات انجام شده در مناطق مختلف بیشتر بر روی گونه‌هایی از *Onosma* صورت گرفته است که بیشترین فراوانی را در آن مناطق داشته و راجع به گونه *dichroanthum* مطالعات کمی صورت گرفته است و در شمال ایران به‌طور سنتی از ریشه این گونه گیاهی در ترکیب با چربی بز برای درمان سوختگی و التیام زخم استفاده می‌شود، لذا مطالعه حاضر به‌منظور بررسی بافت شناختی اثر پماد حاوی عصاره پترولیوم اتری ریشه گیاه *Onosma dichroanthum* Boiss بر التیام زخم باز پوستی ایجاد شده در موش‌های صحرایی نر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۵۴ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar با وزن تقریبی 250 ± 30 گرم تهیه شده از انستیتو

پاستور ایران استفاده شد. موش‌ها در قفس‌های انفرادی و تحت شرایط استاندارد و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. ریشه‌های گیاه *Onosma dichroanthum* Boiss در تیرماه سال ۱۳۹۱ از منطقه حفاظت‌شده جهان‌نما (جنوب شرقی شهرستان کردکوی در ارتفاعی بین ۶۰۰ تا ۳۰۸۶ متر از سطح دریا) جمع‌آوری شدند. این گیاه در بخش هرباریوم دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی توسط دکتر احمدرضا محرابیان مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت و سپس به آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شد. ریشه‌ها پس از شستشو در دمای آزمایشگاه خشک شدند و سپس با استفاده از آسیاب برقی پودر گردید. مقدار ۵۰ گرم از پودر ریشه گیاه به‌روش سوکسله با ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال پترولیوم اتر عصاره‌گیری شد و توسط دستگاه روتاری (Rotary evaporator, Heidolf 4000) تغلیظ گردید و مابقی در دمای آزمایشگاه خشک شد. عصاره حاصل به فرم روغنی بود. عصاره تهیه شده پس از رقت‌سازی با حجم یک میکرولیتر به دستگاه GC-MASS (Agilent 7890A) تزریق گردید و کروماتوگرام آن مورد بررسی قرار گرفت. ترکیباتی که با دستگاه موجود قابل شناسایی بودند، در این مقاله گزارش شدند. عصاره مورد نظر با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ تهیه گردید و میزان شیکونین آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری (Multispec-1501 SHIMADZU) تعیین گردید. برای تهیه پماد حاوی عصاره پترولیوم اتری ۱ درصد، یک گرم عصاره را با صد گرم پایه پماد که از ترکیب ۵۰ گرم وازلین، ۳۱ گرم گلیسرین و ۶ گرم Mct oil و ۱۲ گرم اوسرین تشکیل شده بود، مخلوط نمودیم. در این تحقیق از مدل Incisional زخم استفاده شد. موش‌ها به‌وسیله تزریق داخل عضلانی کتامین به‌میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دیازپام به‌میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند، سپس موهای ناحیه پشت حیوان در سمت راست ستون فقرات تراشیده شد و پوست به‌وسیله بتادین و الکل طبی ۷۰ درجه ضدعفونی شد. سپس، حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه شاهد، حامل و تجربی تقسیم شدند. در همه موش‌ها یک برش پوستی روی پوست ناحیه پشت حیوان در جهت محور سری-دمی در سمت راست ستون فقرات و با فاصله ۲ سانتی‌متر از آن داده شد. برش‌ها به‌طول ۲۰ میلی‌متر، با ضخامت کامل پوست و به‌وسیله اسکالپل نمره ۱۵ ایجاد شد و فاصله دو لبه برش به‌وسیله بخیه زدن در حدود ۳ میلی‌متر حفظ شد تا بافت ترمیمی جای کافی برای شکل گرفتن داشته باشد و بتوان نمونه، برای آزمایش‌های تحقیق، تهیه نمود [۳۴]. لازم به‌ذکر است که روز

روش میکروسکوپی و ارزیابی این پارامترها در ناحیه زخم در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ پس از ایجاد زخم جهت بررسی و مقایسه زخم‌های موش‌های گروه‌های شاهد، حامل و تجربی استفاده شد. ضخامت اپیدرم، در روز ۴، در گروه حامل در سطح $P=0/001$ و در گروه شاهد در سطح $P<0/002$ به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه تجربی بود و در گروه حامل با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0/828$). تعداد نوتروفیل در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۴، در گروه‌های تجربی، حامل و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). تعداد فیبروبلاست در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۴، در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه حامل در سطح $P<0/003$ و گروه شاهد در سطح $P=0/001$ بود و در گروه حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد بود ($P=0/001$) (جدول شماره ۱). تعداد مقاطع عروق در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۴، در گروه تجربی و گروه حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد بود ($P=0/001$) و در گروه تجربی با گروه حامل تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0/302$) (جدول شماره ۱). ضخامت اپیدرم، در روز ۷، در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه تجربی در سطح $P<0/026$ بود و در گروه تجربی در سطح $P<0/962$ و در گروه شاهد در سطح $P<0/051$ با گروه حامل تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول شماره ۲). تعداد نوتروفیل در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۷، در گروه حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه تجربی در سطح $P=0/001$ و گروه شاهد در سطح $P=0/001$ بود و در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد در سطح $P=0/004$ بود (جدول شماره ۱). تعداد فیبروبلاست در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۷، در گروه حامل تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0/680$) و در گروه‌های تجربی و حامل در سطح $P<0/001$ به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد بود (جدول شماره ۲). تعداد مقاطع عروق در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۷، در گروه حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه تجربی و گروه شاهد در سطح $P<0/001$ بود و در گروه تجربی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0/939$) (جدول شماره ۲). ضخامت اپیدرم، در روز ۱۴، در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). تعداد نوتروفیل در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۱۴، در گروه تجربی در سطح $P<0/001$ و حامل در سطح $P<0/004$ به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد بود و در گروه تجربی با حامل تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0/441$). تعداد فیبروبلاست در یک

جراحی به‌عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. بر روی زخم‌های جراحی ایجاد شده در گروه تجربی پماد حاوی عصاره پترولیوم اتری ۱ درصد ریشه گیاه *Onosma dichroanthum* Boiss روزانه ۱/۲ گرم در دو نوبت (صبح و بعدازظهر) تا هنگام قربانی کردن حیوان در زمان‌های تعریف شده مالیده شد. بر روی زخم‌های جراحی ایجاد شده در گروه حامل پایه پماد مالیده شد و بر روی زخم‌های جراحی ایجاد شده در گروه شاهد هیچ ماده‌ای مالیده نشد. تجویز پماد و پایه پماد از روز صفر شروع شد و تا ۱۴ روز ادامه داشت. پس از بیهوشی موش‌ها و قربانی شدن آنها به وسیله استنشاق کلروفرم درون فضای بسته، از محل زخم‌های گروه‌های تجربی، حامل و شاهد در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ بعد از ایجاد زخم، یک نمونه به‌طول ۱۰ میلی‌متر و به‌عرض ۵ میلی‌متر (که از محل زخم و پوست سالم در دو طرف آن تهیه شده بود) جهت مطالعه به‌وسیله میکروسکوپ نوری تهیه شد. به‌منظور ثبوت بافت، نمونه‌های تهیه شده، به‌مدت ۴۸ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از آنکه بافت ثابت گردید، برای قالب‌گیری آن‌ها در پارافین پاساژ بافت انجام شد. با استفاده از میکروتوم LEICA و با تیغه ثابت، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون به‌صورت متوالی تهیه گردید. برش‌ها به بن ماری منتقل شده و بر روی لام آغشته به چسب آلومین قرار داده شد. نمونه‌ها در دمای معمولی اتاق خشک شده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت لام‌ها آماده رنگ آمیزی بود. در این تحقیق از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین استفاده شد. تعداد نمونه برای هر زیر گروه ۶ سر موش بود و از هر موش تعداد ۵ لام تهیه شد. سپس، برش‌ها از نظر متغیرهای ضخامت اپیدرم، تعداد نوتروفیل، تعداد فیبروبلاست و تعداد مقاطع عروق خونی مورد ارزیابی بافت شناسی قرار گرفتند. شمارش سلول‌ها و مقاطع عروق خونی به‌وسیله میکروسکوپ نوری معمولی (Nikon YS100) در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی $\times 400$ انجام شد و ضخامت اپیدرم با لنز مدرج بر حسب میلی‌متر محاسبه شد و میانگین داده‌ها در جداول مربوطه ثبت شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ به‌روش Mann-Whitney, kruskal-wallis آزمون شد و $P<0/05$ معنی‌دار تلقی شد. نتایج به‌صورت $\bar{X} \pm SD$ ارائه گردید.

نتایج

از آنجا که در طول روند التیام زخم، عواملی چون ضخامت اپیدرم، تعداد نوتروفیل، فیبروبلاست و مقاطع عروق دچار تغییراتی می‌شود که نشان‌دهنده روند التیام زخم می‌باشد، از

نداشت ($P < 0/001$). تعداد مقاطع عروق در یک میدان میکرو- سکویی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۱۴، در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$) (جدول شماره ۳).

میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰، در روز ۱۴، در گروه تجربی و گروه شاهد در سطح $P < 0/001$ به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه حامل بود و در گروه تجربی با شاهد تفاوت معنی‌داری

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار پارامترهای بافت شناسی مطالعه شده در روز ۴ مطالعه

پارامترها	ضخامت اپیدرم بر حسب میلی‌متر	تعداد نوتروفیل در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰	تعداد فیبروبلاست در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰	تعداد مقاطع عروق در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰
تجربی	۰/۷۳±۱/۶۸	۱۴/۲۰±۷/۸۷	۴۱/۵۳±۱۸/۳۵	۴/۰۳±۰/۹۲
حامل	۳/۲۷±۲/۴۲	۱۴/۸۳±۹/۳۹	۳۰/۹۰±۸/۴۴	۴/۵۰±۱/۵۰
شاهد	۲/۹۰±۲/۹۸	۹/۹۳±۱۰/۸۱	۱۰/۸۳±۴/۳۸	۲/۷۳±۱/۱۴

جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار پارامترهای بافت شناسی مطالعه شده در روز ۷ مطالعه

پارامترها	ضخامت اپیدرم بر حسب میلی‌متر	تعداد نوتروفیل در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰	تعداد فیبروبلاست در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰	تعداد مقاطع عروق در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰
تجربی	۳/۶۳±۰/۴۹	۳۴/۱۳±۲۵/۲۹	۳۴/۳۷±۶/۷۲	۵/۶۰±۱/۳۰
حامل	۳/۵۷±۰/۵۰	۵۳/۲۷±۲۰/۳۵	۳۵/۹۰±۷/۵۱	۱۰/۱۰±۴/۵۴
شاهد	۲/۹۷±۱/۵۴	۱۷/۱۳±۱۱/۲۴	۲۳/۸۰±۶/۹۶	۵/۲۷±۴/۶۵

جدول شماره ۳- میانگین و انحراف معیار پارامترهای بافت شناسی مطالعه شده در روز ۱۴ مطالعه

پارامترها	ضخامت اپیدرم بر حسب میلی‌متر	تعداد نوتروفیل در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰	تعداد فیبروبلاست در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰	تعداد مقاطع عروق در یک میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰
تجربی	۳/۸۷±۲/۹۵	۵۳/۸۰±۵۴/۲۵	۳۰/۳۷±۶/۲۵	۷/۹۳±۷/۲۱
حامل	۳/۲۳±۲/۸۶	۴۰/۸۰±۴۵/۶۴	۲۲/۱۷±۵/۸۰	۵/۷۰±۶/۱۴
شاهد	۳/۳۰±۱/۶۶	۵/۸۳±۵/۳۱	۳۱/۲۳±۶/۰۰	۷/۵۰±۳/۷۰

بحث

شاهد بود که می‌تواند بیان‌کننده عدم تاثیر عصاره گیاه بر التیام زخم و ادامه روند‌های التهابی باشد. خلیلی و همکارانش اثر درمانی گیاه *Onosma stenosphon* Boiss را بر سوختگی درجه دو پوست ناحیه پشت و کیسه بیضه موش صحرائی مورد بررسی قرار دادند [۱۹]. در این مطالعه پماد تهیه شده از گیاه مذکور جهت بررسی تغییرات بافتی در بهبود زخم‌ها به ترتیب در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از سوختگی در ۳ گروه تجربی استفاده شد، سپس نمونه‌های تهیه شده از گروه‌های تجربی با نمونه‌های تهیه شده از موش صحرائی شاهد به صورت کیفی از نظر میزان آسیب و بهبود بافت در ناحیه پشت و تغییرات در بافت بیضه مقایسه گردیدند. در نهایت با بررسی میکروسکوپی مشخص گردید که تفاوت مشخصی از نظر مورفولوژیک بین پوست‌های در معرض پماد قرار گرفته و پوست‌های بدون کاربرد پماد از نظر میزان ترمیم، سرعت تشکیل بافت گرانوله بافت سوخته و شدت فیبروز یا شدت التهاب وجود ندارد. هم‌چنین، هیچ‌گونه تأثیر پاتو-

مطابق نتایج این بررسی ضخامت اپیدرم در گروه‌های حامل و شاهد به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه تجربی بوده و تعداد مقاطع عروق در گروه تجربی و گروه حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد می‌باشد. تعداد فیبروبلاست در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه حامل و گروه شاهد می‌باشد که نشان می‌دهد عصاره این گیاه در روز ۴ سبب افزایش تعداد فیبروبلاست شده است. ارزیابی‌های میکروسکوپی روز ۷ نشان می‌دهد که ضخامت اپیدرم در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه تجربی می‌باشد. تعداد فیبروبلاست در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد، ولی در گروه تجربی با گروه حامل تفاوت معنی‌داری نداشت. تعداد نوتروفیل در گروه حامل به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه‌های تجربی و شاهد بود و در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه شاهد بود. در روز ۱۴ تعداد نوتروفیل، به‌طور معنی‌داری بزرگتر از گروه

ارزیابی باشد.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد استعمال موضعی پماد حاوی عصاره پترولیوم اتری ریشه گیاه *Onosma dichroanthum* Boiss در بهبود التیام زخم قابل توجهی نداشته است. مطالعات بیشتری برای بررسی اثر عصاره های دیگر این گیاه با حلال‌های مختلف بر التیام زخم ایجاد شده به شیوه جراحی مورد نیاز است. جهت انجام مطالعات تکمیلی پیشنهاد می‌شود برای سنجش ترکیبات عصاره مورد نظر از تکنیک‌های مختلف HPTLC, HPLC جهت ارزیابی مقدار مواد موثره گیاه استفاده شود و توصیه می‌شود عصاره‌های مختلف که توسط حلال‌هایی با درجه قطبیت بیشتر تهیه گردیده، مثل عصاره دی‌کلرومتانی ریشه این گونه گیاهی، جهت تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. نویسندگان این تحقیق مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای دکتر محرابیان جهت همکاری ایشان در شناسایی گونه گیاهی اعلام می‌دارند.

References:

- [1] Brunicaardi FC, Schwartz SI. Schwartz's principles of surgery. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2005. p. 87-107.
- [2] Cohen K, Peacock EE. Keloid and hypertrophic scars in MC Carthy plastic surgery. Philadelphia: Saunders; 1990. p. 732.
- [3] Izadyar B. Effect of fundermol ointment on skin wound healing process in rat in compare withnormalsalin. Thesis 1995. p. 42. [in Persian]
- [4] Wayne K, Alexander G, Gordon G. Physiology and Healing Dynamics of Chronic CotaneousWound. *AMJ Surg* 1998; 176(2): 26S-38S.
- [5] Adzick NS. Wound Healing, Biological and clinical features. In: Sabiston DC, Iyerly HK, Editors. Textbook of surgery: the Biological Basis of Modern Surgical Practice. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997. p. 207-20.
- [6] Cohen IK, Dieglemann RF, Yager Dr. Wound care and Wound healing. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC, Editors. Principles of surgery, companion handbook. New York: McGraw-Hill professional; 1998. p. 263-95.

لوژیکی ناشی از پماد بر روی پوست دیده نشد. آنچه در این مطالعه مشخص شد، عدم تاثیر پماد این گیاه در بهبود سوختگی درجه دو می‌باشد [۱۹]. نتایج مطالعه کنونی در روز ۴، ۷ و ۱۴ که عدم تاثیر پماد حاوی عصاره گیاه را بر التیام زخم در زمان‌های مذکور نشان می‌دهد، با نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی خلیلی و همکارانش مطابقت دارد. در مطالعه Kumar و Kumar Gupta موش‌های صحرایی درمان شده با پماد حاوی *Onosma hispidum* گونه‌ای دیگر از *Onosma* و کرم آلوتورا (استاندارد) بهبود زخم و افزایش اپیتلیزاسیون در ناحیه زخم موش‌های نرمال و دیابتی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد [۳۵]. در مطالعه Chaudhary اثر پماد حاوی عصاره اتانولی *Onosma bracteatum* بر التیام زخم‌های انسزیون و اکسزیون در موش‌های صحرایی آلبینو بررسی شد و بر التیام هر دو نوع زخم در مقایسه با گروه شاهد موثر بود [۲۲]. نتایج مطالعه Akkol و همکاران نشان داد که استفاده موضعی پماد عصاره هگزان ۱ درصد ریشه‌های *Arnebia densiflora* در داروی Madecassol در مقایسه با داروی *Centallaasiatica* 1% عصاره حاوی اکسزیون موش موثر بوده است [۳۶]. در یک مطالعه دیگر اثرات التیام بخش گیاهان خانواده بوراژیناسه بر زخم‌ها نشان داده شده است [۳۷]. نتایج مطالعات فوق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد. دلیل احتمالی عدم تطابق می‌تواند تفاوت در روش‌های

- [7] HadadadelA. Medicine tradition in Iran. Tehran: Study's and research institute; 1983. p. 18-53. [in Persian]
- [8] Amin Gh. Popular medicine plants in Iran. Proceeding of International Congress of Medical History of Islam and Iran. Tehran, Iran. 1992. p. 15-6.
- [9] Mehrabian AR, Sheidai M, Noormohammadi Z, Mozafarian V, Asrei Y. Palynological diversity in the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) of Iran. Scholars Research library. *Ann Biol Res* 2012; 3(8): 3885-93.
- [10] Ozgen U, Houghton PJ, Ogundipe Y, Coskun M. Antioxidant and antimicrobial activities of *onosmaargentatum* and *Rubia peregrine*. *Fitoferapia* 2003; 74(7-8): 682-5.
- [11] Naz S, Ahmad S, AjazRasool S, Asadsayeed S, Siddiqi R. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *onosmahispidium*. *Microbiol Res* 2006; 161(1): 43-8.
- [12] Zarghami Moghaddam P, Mazandarani M, Zolfaghari MR, Badeleh MT, Ghaemi EA. Antibacterial and antioxidant activities of root extract of *onosmadichroanthum* Boiss. In north of Iran. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6(8): 1776-81.

- [13] Tosun A, Akkol EK, Bahadir O, Yesilada E. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of some onosma L. species growing in Turkey. *J Ethnopharmacol* 2008; 120(3): 378-81.
- [14] Patel KG, Detroja JR, Shah TA, Patel KV, Gandhi TR. Evaluation of the effect of onosmabraceatum, wall (Boraginaceae) using experimental allergic and inflammatory model S. *Global J Pharmacol* 2001; 5(1): 40-9.
- [15] Sharma S, Khan N, Sultana S. Effect of onosmaechioides on DMBA/cotton oil mediated carcinogenic response, hyperproliferation and oxidative damage in murine skin. *Life Sci* 2004; 75(20): 2391-410.
- [16] Kretschmer N, Rinner B, Deutsch AJ, Lohberger B, Knausz H, Kunert O, et al. Naphthoquinones from onosmapaniculata induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. *J Nat Prod* 2012; 75(5): 865-9.
- [17] Rinner B, Kretschmer N, Knausz H, Mayer A, Boechzelt H, Hao XJ, et al. Petrol ether extract of the roots of onosmapaniculatum induces cell death in a caspase dependent manner. *J Ethnopharmacol* 2010; 129(2): 182-8.
- [18] Ahmad VU, Kousar F, Khan A, Zubair M, Iqbal S, Tareen RB. A new ketone and a known anticancer Triterpenoid from the leaves of onosmalimitaneum. *Helvetica Chimica Acta* 2005; 88(2): 309-11.
- [19] Khalili MA, Miresmaeili SM, Hekmati-Moghadam H, Rezai SH, Vahidi AR. [Study of the therapeutic effect of onosmastenosiphon Boiss. Against grade 2 burning on back and testis of rat]. *Herbal Drugs* 2010; 1: 29-34.
- [20] Ozgen U, Ikbali M, Hacimuftuoglu A, Haughton PJ, Gocer F, Dogan H, Coskun M. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of onosmaargentatum roots. *J Ethnopharmacol* 2006; 104(1-2): 100-3.
- [21] Ozgen U, Miloglu FD, Bulut G. Quantitative determinative determination of shikonin derivatives with UV-Vis spectrophotometric methods in the roots of onosmanigrical. *Rev Anal Chem* 2011; 30(2): 59-63.
- [22] Choudhary GP. Wound healing activity of the ethanolic extract of onosmabraceatum wall. *Int J Pharm Chem Sci* 2012; 1(3): 1035-7.
- [23] Sharma RA, Singh B, Singh D, Chandawat P. Ethnomedicinal, pharmacological properties and chemistry of some medicinal plants of Boraginaceae in India. *J Med Plant Res* 2009; 3(13): 1153-75.
- [24] Ozgen U, Coskun M, Kazaz C, Secen H. Naphthoquinones from the roots of Onosmaargentatum Hub.-Mor. (Boraginaceae) *Turk J Chem* 2004; 28(4): 451-4.
- [25] Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin and Related Naphthazarin Natural products. *Angew Chem Int Ed* 1999; 38: 270-300.
- [26] Kourounakis AP, Assimopoulou AN, papageorgiou VP, Gavalas A, Kourounakis PN. Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and in inflammation—a preliminary pharmacochemical investigation. *Arch Pharm* 2002; 335(6): 262-6.
- [27] Assimopoulou AN, papageorgiou VP. Radical scavenging activity of alkannatinctoria root extracts and their main constituents, hydroxynaphthoquinones. *Phytother Res* 2005; 19(2): 141-7.
- [28] Wang Z, Liu T, Gan L, Wang T, Yuan X, Zhang B, Chen H, Zheng Q. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/ reperfusion injury through its antioxidant activity. *Eur J Pharmacol* 2010; 643(2-3): 211-7.
- [29] Assimopoulou AN, Boskou D, Papageorgiou VP. Antioxidant activities of alkannin, Shikonin and Alkannatinctoria root extracts in oil substrates. *Food Chem* 2004; 87: 433-8.
- [30] Kim SH, Kang IC, Yoon TJ. Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyime-DMNQS-33. *Cancer Lett* 2001; 172(2): 171-5.
- [31] Sekine T, Masumizu T, Maitan Y, Nagai T. Evaluation of superoxide anion radical scavenging activity of shikonin by electron spin resonance. *Int J Pharm* 1998; 174: 133-9.
- [32] Sakaguchi I, Tsujimura M, Ikeda N, Minamino M, Kato Y, Watabe K, Yano I, Kaneda K. Granulomatous tissue formation of shikonin and shikonin by air pouch method. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(6): 650-5.
- [33] Kaith BS, Kaith NS, Chauhan NS. Anti-inflammatory effect of Arnebiaeuchroma root extracts in rats. *J Ethnopharmacol* 1996; 55(1): 7-80.
- [34] Assimopoulou AN, Karapanagiotis I, Vasiliou A, Kokkini S, papageorgiou VP. Analysis of alkannin derivatives from Alkanna species by high-performance liquid chromatography photodiode array/ mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2006; 20(12): 1359-74.
- [35] Kumar N, Kumar Gupta A. Wound-healing activity of onosmahispium (Ratanjot) in normal and diabetic rats. *J Herbs Spices Med Plants* 2009; 15: 342-51.
- [36] Akkol EK, Kocaa U, Pesin I, Yilmazer D, Toker G, Yesilada E. Exploring the wound healing activity of Arnebiadensiflora (Nordm) Ledeb. By in vivo models. *J Ethnopharmacol* 2009; 124(1): 137-41.
- [37] Reddy JS, Rao PR, Reddy MS. Wound healing effects of Heliotropium-indicum, plumbagozeylanicum and Acalypha indica in rats. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(2): 249-51.