نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۳، پائیز ۱٤۰٤، صفحات ۲٤- ۳۹

بررسی بهبود زخم تلقیح شده با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط عصاره گیاه گل راعی و روغن شترمرغ

رکسانا سرابندی[۱]، محمدرضا آقچه لو[۲*]، داریوش سعادتی[۳]، عباس جمشیدیان[۴]

۱- دانش‌آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۶ اردیبهشت ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۱ تیر ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۲ تیر ۱۴۰۴

10.22034/nfvm.2025.521711.1285

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی عفونت زخم‌های پوستی است. در طب مکمل، استفاده از گیاهان دارویی به‌دلیل خواص ضد باکتری، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانی مورد توجه قرار می‌گیرد. در این مطالعه، اثر ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ بر التیام زخم باز تلقیح‌شده با *استافیلوکوکوس اورئوس* در رت مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۴۰ رت بالغ در چهار گروه شامل کنترل منفی، کنترل مثبت (وازلین+ اوسرین)، و دو گروه درمانی با پمادهای حاوی ۲ و ۵ درصد ترکیب مذکور مورد مطالعه قرار گرفت. زخم‌ها در روزهای ۰، ۳، ۷ و ۱۴ از لحاظ درصد بهبود و تغییرات هیستوپاتولوژیک بررسی شدند. یافته‌ها نشان داد که درصد بهبود زخم در روز ۷ به‌طور معنی‌داری در دو گروه درمانی بیشتر از گروه کنترل مثبت بود، همچنین میانگین رتبه هیستوپاتولوژی زخم‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ در گروه‌های درمانی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل منفی بود. نتایج نشان می‌دهد ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ سبب کاهش التهاب و تسریع در بهبودی زخم عفونی می‌شود و اثر پماد ۵ درصد بیشتر از پماد ۲ درصد است.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، عصاره گل راعی، روغن شترمرغ، هیستوپاتولوژی، التیام زخم*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: aghchelou@uoz.ac.ir

مقدمه

زخم‌های عفونی درمانی‌های طولانی‌تر و مشکلات بیشتری را هنگام التیام ایجاد می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن گرم مثبت است و به‌عنوان مهم‌ترین عامل عفونت‌های پوست و بافت‌های زیرین آن در انسان می‌باشد (۱). یکی از مشکلات استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌های موضعی، ایجاد مقاومت‌های باکتریایی و واکنش‌های آلرژیک است. به‌عنوان مثال، تماس با موپیروسین می‌تواند منجر به ظهور سویه‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* شود (۲). بنابراین استفاده از ترکیبات طبیعی جایگزین، نظیر گیاهان دارویی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

گل راعی در طب سنتی اسلامی، یونانی و چینی کاربرد داشته است. این گیاه حاوی مواد فعالی مثل هایپرفورین و هایپریسین بوده که دارای خواصی نظیر ضد افسردگی و اضطراب (۳) و تسریع التیام و خواص ضد باکتریایی می باشد (۴، ۵، ۶). هایپرفورین موجود در گل راعی با تحریک تمایز کراتینوسیت‌ها و ساخته شدن کراتین موجب بازیابی ساختار آسیب دیده اپیدرم شده و هایپریسین و سودوهایپریسین موجود در عصاره گل راعی باعث افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست و سنتز بیشتر کلاژن می‌شود. عصاره روغنی گل راعی سبب تسریع روند بهبود ترک خوردگی پا می‌شود (۷). اثر درمانی عصاره گل راعی در درماتیت آتوپیک نیز تأیید شده است (۸).

روغن شترمرغ دارای سطوح متفاوتی از اجزایی شامل کارتنوئیدها، فلاون‌ها، پلی‌فنول‌ها، توکوفرول و فسفولیپیدها است که ممکن است فواید درمانی مانند خصوصیات آنتی‌اکسیدانی داشته باشد (۹). در طب سنتی سودان روغن شترمرغ در موارد شکستگی استفاده می شود (۱۰). امو مانند شترمرغ در گروه سینه پهنان قرار می‌گیرد ولی ترکیبات روغن آن با شترمرغ از نظر اسیدهای چرب کاملا یکسان نیست (۱۱). روغن امو اثرات ضد التهابی (۱۲) درمان زخم‌های گوارشی (۱۳) و ترمیم زخم (۱۴) دارد.

بر اساس مطالعات موجود تا کنون از ترکیب روغن شترمرغ و عصاره گل راعی جهت درمان زخم‌های باز و یا عفونی استفاده نشده است. با توجه به خواص ذکر شده برای گل راعی و روغن شترمرغ و اهمیت التیام سریع‌تر و بهتر زخم‌ها به‌خصوص زخم‌های عفونی، در این مطالعه، با هدف بهره‌گیری از خواص درمانی ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ، اثربخشی این ترکیب در بهبود زخم عفونی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در مدل حیوانی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه: در این مطالعه از ۴۰ موش رت نژاد ویستار با جنسیت نر و محدوده وزنی بین ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه ده‌تایی تقسیم شدند و در ظرف‌های جداگانه مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی قرار داده شدند. موش‌ها در محیط بدون استرس، تمیز و در دمای اتاق نگهداری و با غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی که به‌صورت پلت (خوراک موش، شرکت بهپرور، تهران، ایران) تغذیه می‌شدند و آب به‌طور آزادانه در اختیار آنها بود. گروه اول یا گروه کنترل منفی شامل ده موش بدون درمان بوده است، گروه دوم یا گروه کنترل مثبت شامل ده موش مورد درمان قرار گرفته با پایه پماد (ترکیب وازلین و اوسرین) بود، گروه سوم یا گروه درمانی یک، یا ۲ درصد، شامل ده موش مورد درمان قرار گرفته با پماد درمانی ترکیب عصاره گل راعی ۲ درصد و روغن شترمرغ ۲ درصد و گروه چهارم یا گروه درمانی دو، یا ۵ درصد، شامل ده موش مورد درمان قرار گرفته با پماد درمانی ترکیب عصاره گل راعی۵ درصد و روغن شترمرغ۵ درصد بودند.

آماده‌سازی پمادها: وازلین و اوسرین به‌صورت جداگانه در فور قرار گرفت تا به حالت مایع درآیند سپس ۷۰ گرم از وازلین را با ۳۰ گرم از اوسرین در یک بشر استریل مخلوط کردیم. ۲۰ گرم از ترکیب حاصل شده در یک ظرف نمونه‌گیری دربدار به‌عنوان پایه پماد، برای گروه کنترل مثبت جدا گردید.

برای تهیه پماد ۵ درصد، از پایه پماد تهیه‌شده در همان

حالت مایع ۱۸ گرم جدا گردید و در ظرف مخصوص نمونه‌گیری ریخته شد و سپس ۱ گرم از روغن شترمرغ که آن هم استریل شده و به‌صورت مایع درآمده بود به آن اضافه گردید و در آخر نیز ۱ گرم از عصاره گل راعی به ترکیب فوق اضافه شد. ترکیب حاصله به‌منظور روانتر شدن به مدت ۴-۳ دقیقه در فور قرار گرفت و پس از خروج از دستگاه تا لحظه کامل سرد و بسته شدن با انتهای یک سوآپ استریل همزده می‌شد.

برای تهیه پماد ۲ درصد نیز از پایه پماد تهیه‌شده در حالت مایع ۱۹/۲ گرم برداشت شد و در ظرفی ریخته شد و سپس ۰/۴ گرم از روغن شترمرغ استریل و مایع به آن اضافه گردید و در آخر نیز ۰/۴ گرم از عصاره گل راعی به ترکیب فوق اضافه شد. برای همگن شدن ترکیب نهایی به مدت ۴-۳ دقیقه در فور گرم شد و پس از خروج از دستگاه تا لحظه کامل سرد و بسته شدن با انتهای یک سوآپ استریل همزده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، در ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت نوترینت آگار برده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از رشد کلنی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شسته و سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل دربدار حاوی نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن با اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول نیم مک‌فارلند، با نرمال سالین رقیق و سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml ×۱ تهیه گردید (۱۵).

ایجاد زخم و تلقیح باکتری: موش‌ها در همه گروه‌ها با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (40mg/kg, Ketamin 10% , alfasan, Woerden, Holland) و زایلازین (5mg/kg, Xylazine2% , alfasan, Woerden, Holland) بی‌هوش شدند (شکل ۱- الف). پس از بی‌هوشی پشت موش‌ها به‌طور کامل تراشیده شد و پوست آن ناحیه به‌طور کامل با الکل اسکراب شد. سپس در حد فاصل دو شانه با استفاده از پانچ بیوپسی ۶ میلی‌متری زخم دایره‌ای شکل و تمام ضخامت بر پشت هر موش ایجاد گردید (شکل ۱- ب). از محلول حاوی باکتری رقیق‌سازی شده با استفاده از قطره‌چکان بر روی زخم هر موش ۴ قطره در روز ایجاد زخم (روز صفر) ریخته شد تا موش‌ها توسط باکتری آلوده گردند.

الف

ب

شکل ۱- الف: تزریق داروی بیهوشی به روش داخل صفاقی، ب: نحوه ایجاد زخم با پانچ

درمان محل زخم از روز اول (روز بعد ایجاد زخم) تا روز ۱۴ به‌صورت روزی یک‌بار انجام می‌شد. قبل از انجام درمان در هر روز به استثنای روز صفر (روز ایجاد زخم) محل زخم با استفاده از یک تامپون و محلول سدیم کلراید ایزوتونیک در همه گروه‌ها تمیز می‌شد تا محل زخم پاک و برای درمان آن روز آماده شود. برای گروه کنترل منفی فقط شستشو داده می‌شد و درمان موضعی انجام نمی‌شد. درمان زخم‌ها بر اساس گروه‌بندی انجام شد و از یک چوب بستنی استریل

برای پوشاندن کامل سطح زخم‌ها با پمادها استفاده شد. تمام روند مطالعه از نظر اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظر شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده بوده است.

ارزیابی ماکروسکوپیک: در روزهای ۰، ۳، ۷ و ۱۴ از زخم‌های ایجاد شده عکس‌برداری انجام شد. عکس‌برداری با یک دوربین با رزولوشن ۱۳ مگاپیکسل انجام شد به این صورت که پس از مقید کردن موش یک خط‌کش مدرج در کنار زخم هم سطح با زخم قرار می‌گرفت و سپس عکس‌برداری با یک زاویه عمود بر زخم انجام می‌شد.

برای انجام اندازه‌گیری‌های ماکروسکوپیک در این مطالعه از نرم‌افزار image tool استفاده شد. با استفاده از این نرم‌افزار در هر تصویر مساحت کلی زخم اندازه‌گیری شد. روش اندازه‌گیری به این صورت بود که پس از انتقال تصاویر به نرم‌افزار ابتدا مقیاس سیستم اندازه‌گیری نرم‌افزار با انتخاب فاصله دو نقطه (از روی خط‌کش مدرج که در هنگام تهیه عکس دیجیتالی در کنار زخم قرار گرفته بود) تعریف شد و سپس با استفاده از ابزاری که نرم‌افزار در اختیار قرار داده بود لبه‌های زخم مشخص شد و سپس مساحت ناحیه انتخاب شده اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه درصد مساحت زخم در هر روز مساحت اندازه‌گیری شده تقسیم بر مساحت زخم در روز صفر شده و در ۱۰۰ ضرب شد، سپس برای به‌دست آوردن درصد بهبودی زخم، درصد مساحت زخم در هر روز از ۱۰۰ درصد کم شد. درصد مساحت زخم مطابق با فرمول‌های زیر انجام شد:

$$\text{درصد مساحت زخم در روز x} = \frac{\text{مساحت سطح زخم در روز x}}{\text{مساحت سطح زخم در روز صفر}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد بهبودی زخم در روز x} = ۱۰۰ - \text{درصد مساحت زخم در روز x}$$

ارزیابی میکروسکوپیک: در روز ۳ از هر گروه به‌صورت تصادفی دو موش انتخاب گردید و در روزهای ۷ و ۱۴ از هر گروه به‌صورت تصادفی چهار موش انتخاب گردید. این موش‌ها به‌منظورتهیه نمونه‌های بافتی، جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژی با رعایت اصول اخلاقی بی‌هوش شدند. موهای روییده در ناحیه زخم قبل از انجام نمونه‌برداری تراشیده شد و سپس با استفاده از یک اسکالپل برش تمام ضخامت در پوست ایجاد شد و نمونه مورد نیاز جهت بررسی آسیب‌شناسی برداشته شد. در هنگام برداشت نمونه کمی هم از بافت پوست سالم و همه بافت زخم نمونه‌برداری شد تا امکان مقایسه بافت سالم و زخم وجود داشته باشد. بعد از برداشت نمونه، بافت زیر جلد از لحاظ حضور چسبندگی بررسی شد. نمونه‌های تهیه شده در ظرف‌های نمونه‌گیری حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و مشخصات هر نمونه بر روی ظرف نمونه‌گیری یادداشت شد. پس از گذراندن مراحل ابتدایی تهیه برش بافتی، مقاطع تهیه شده و بر روی لام قرار گرفتند و پس از آن با رنگ هماتوکسیلین– ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

در این مطالعه ارزیابی هیستوپاتولوژیک به دو روش انجام شد:

روش اول ارزیابی هیستوپاتولوژی: این روش ارزیابی توسط Adam و همکاران به‌گونه‌ای طراحی‌شده است که تمام ساختارهای اپیتلیالی، مزانشیمی و همین‌طور عمق اسکار را به‌طور همزمان مد نظر قرار می‌دهد. امتیاز کل در نمره ۱۰ نشان‌دهنده ظاهر طبیعی پوست بدون هیچ شواهدی از اسکار است و نمره صفر نشان‌دهنده اسکاری عمیق است که تمام اجزای پوست را درگیر می‌کند. به همه موارد طبیعی به غیر از رشته‌های کلاژن، امتیاز ۱ و به موارد غیر طبیعی امتیاز صفر داده می‌شود. امتیاز هیستوپاتولوژیک مجموع کل این امتیازها است و در حضور ساختارهای طبیعی باعث کسب امتیاز بیشتر می‌شود (جدول ۱) (۱۶).

این موارد شامل هایپرپلازی اپیدرم، هایپرکراتوز اپیدرم و ضمایم اپیدرم مانند فولیکول‌های مو و غدد عرق می‌شود. اثرات التیامی بر روی ساختارهای مزانشیمی نیز با تعیین حضور یا عدم حضور عضلات صاف، تزاید عروقی، فیبروپلازی و سازمان‌یافتگی (موازی بودن) رشته‌های کلاژن با هم ارزیابی می‌شود. به‌دلیل ارتباط بین توزیع

کلاژن با ساختار درم و بافت اسکار امتیاز بیشتری به آن داده می‌شود. سازمان یافتگی کلاژن درمی بر اساس سازمان یافتگی رشته‌های کلاژن به‌صورت زیر نمره‌دهی می‌شوند: نمره (۰) برای عدم سازمان یافتگی رشته‌های کلاژن درکل قسمت عمقی درم، نمره (۱) عدم سازمان یافتگی کلاژن در قسمت پاپیلاری عمقی درم (Papillary dermal layer) می‌باشد، نمره (۲) نیمه بالایی قسمت عمقی درم (Reticular dermal layer) را نیز شامل سازمان یافتگی می‌شود و نمره (۳) به الیاف کلاژن که به‌صورت طبیعی هم نیمه‌ی بالایی و هم نیمه‌ی پایینی قسمت عمقی درم منظم باشند.

جدول ۱- سیستم امتیازدهی هیستوپاتولوژیک به روش Adam . در این روش بیشترین امتیاز ممکن ۱۰ (نشان‌دهنده ظاهر طبیعی پوست بدون هیچ شواهدی از زخم) و کمترین امتیاز صفر (نشان‌دهنده زخم عمیق که تمام اجزا پوست را درگیر می‌کند) می‌باشد.

موارد ارزیابی شده	هایپرکراتوز	هایپرپلازی اپیدرم	فولیکول مو	غدد عرق	عضلات صاف	جهت‌گیری رشته‌های کلاژن	فیبروپلازی	تزاید عروقی
	عدم حضور (۱)	عدم حضور (۱)	حضور (۱)	حضور (۱)	حضور (۱)	طبیعی (۳) عدم سازمان‌یافتگی کلاژن در قسمت سطحی درم (۲)	عدم حضور (۱)	عدم حضور (۱)
وضعیت (امتیاز)	حضور (۰)	حضور (۰)	عدم حضور (۰)	عدم حضور (۰)	عدم حضور (۰)	عدم سازمان‌یافتگی کلاژن در نیمه بالایی قسمت عمقی درم (۱) عدم سازمان‌یافتگی کلاژن در کل قسمت عمقی درم (۰)	حضور (۰)	حضور (۰)

روش دوم ارزیابی هیستوپاتولوژی: در روش دوم نیز لایه‌های پوست به‌طور جداگانه و با جزئیات بیشتر بررسی شد. معیارهایی که در قسمت اپیدرم مورد توجه قرار گرفت شامل منظم بودن و تقسیمات میتوزی سلول‌های لایه‌ی بازال، تکثیر و تمایز سلول‌های خاردار، لایه سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیالین، تغییرات کلی اپیدرم از نظر هایپرپلازی، فرورفتگی اپیدرم در درم (Rete Ridges) و بالعکس (Retepags) می‌باشد.

تغییرات درم در دو ناحیه سطحی و عمقی به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و در هر کدام از نواحی، میزان و جهت رشته‌های کلاژن، موازی بودن رشته‌های کلاژن با هم و با اپیدرم و عمود بودن آنها بر عروق خونی و از نظر حضور سلول‌های فیبروبلاست، فیبروسیت و عضلات صاف مورد بررسی قرار گرفت. در هر یک از قسمت‌های درم (سطح و عمق درم) رگ‌های خونی از نظر تعداد رگ‌ها و جهت آنها (عمود بودن بر اپیدرم) مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین از نظر شدت التهاب و نفوذ سلول‌های التهابی مرحله‌ی حاد (نوتروفیل، پلاکت، فیبرین) و سلول‌های التهابی مرحله‌ی مزمن (سلول‌های تک‌هسته‌ای [mononuclear MN])، شدت پرخونی، وسعت خونریزی و ایجاد ضمایم پوست (مو، غدد سباسه و عرق) در محل التیام مورد بررسی قرار گرفتند. معیارهای هیستوپاتولوژیک ذکر شده برای خیلی کم عدد ۱، کم عدد ۲، متوسط عدد ۳، زیاد عدد ۴ و خیلی زیاد عدد ۵ محاسبه شد و در نهایت به هرکدام از آنها عددی مطابق با وضعیت هیستوپاتولوژیک آنها داده شده و اطلاعات به‌دست آمده ثبت گردید.

جهت امتیازدهی به معیارهای هیستوپاتولوژیک در صورت عدم وجود خونریزی، فولیکول مو، غدد سباسه و یا غدد عرق عدد ۱ و در صورت وجود این موارد عدد ۲ در نظر گرفته شد (۱۷).

روش تجزیه و تحلیل آماری: مساحت زخم‌ها در روزهای ۷،۳ و ۱۴ اندازه‌گیری شد و با استفاده از اعداد به‌دست آمده درصد بهبود زخم برای هریک از موش‌ها در روزهای فوق محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارSPSS نسخه ۲۳ انجام شد برای مقایسه مساحت زخم و درصد بهبود زخم بین تیمارهای مختلف از آزمون آنوا و آزمون تکمیلی توکی استفاده شد و از آزمون غیر پارامتریک کروسکالوالیس برای مقایسه داده‌های به‌دست آمده از ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک استفاده شد. سطح معنی‌داری P-value کمتر از ۰/۰۵ در همه موارد در نظر گرفته شد.

نتایج

یافته‌های بررسی ماکروسکوپیک: نتایج بررسی‌های ماکروسکوپیک و بالینی که شامل مساحت زخم و درصد بهبود زخم می‌باشد به شرح زیر است:

مساحت زخم: نتایج به‌دست آمده نشان داد که مساحت زخم‌ها بر اساس میلی‌متر مربع در روزهای ۳و ۷ بین گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری دارد، اما در روز ۱۴ مساحت زخم بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت (P-value >۰/۰۵). در روز ۳، مساحت زخم در گروه پماد درمانی ۵ درصد کمتر از سه گروه دیگر بود (23/06±2/85). همچنین مساحت زخم در گروه پماد درمانی ۲ درصد از دو گروه کنترل کمتر بود (25/16±2/19). مساحت زخم در گروه کنترل منفی بیشتر از سه گروه دیگر بود (۲۹/۹۲±۴/۵۲). بین گروه کنترل منفی و گروه‌های پماد درمانی ۵ درصد و پماد درمانی ۲ درصد تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت (P-۰/۰۵ > value) اما گروه کنترل مثبت با هیچ‌کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول۲).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) مساحت زخم (میلی‌متر مربع) در گروه‌های درمانی در روزهای مختلف. حروف انگلیسی مختلف در هر سطر تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها را نشان می‌دهد.

زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	گروه درمانی ۲٪	گروه درمانی ۵٪	P_{value}
روز ۳	۲۷/۱۲±۵/۹۲ **ab**	۲۹/۹۲±۴/۵۲**b**	۲۵/۱۶±۲/۱۹ **a**	۲۳/۰۶±۲/۸۵**a**	۰/۰۱۰
روز ۷	۱۰/۲۴±۹/۰۶ **b**	۷/۴۳±۳/۳۷**ab**	۴/۳۶±۰/۹۴**a**	۲/۸۶±۱/۳۴**a**	۰/۰۳۶
روز ۱۴	۰/۱۵±۰/۲۵ **a**	۰/۶۰±۰/۸۳ **a**	۰/۰۰±۰/۰۰ **a**	۰/۰۰±۰/۰۰ **a**	۰/۲۴۰

در روز ۷، مساحت زخم در گروه پماد درمانی ۵درصد کمتر از سه گروه دیگر بود (2/86±1/34) و بعد از آن کمترین مساحت زخم را گروه پماد درمانی ۲درصد داشت (4/36±0/94). مساحت زخم در گروه کنترل مثبت بیشتر از باقی گروه‌ها بود (10/24±9/06). در روز ۷ بین گروه کنترل مثبت و گروه‌های پماد درمانی ۵ درصد و پماد درمانی ۲ درصد تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت، ولی گروه کنترل منفی با هیچ‌کدام از گروه‌های دیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۲). در گروه کنترل مثبت زخم یکی از موش‌ها کاملاً ملتهب و پرخون شده بود که احتمالاً به‌علت عفونی شدن زخم باشد و با بررسی هیستوپاتولوژی نیز تأیید شد. در روز ۱۴، زخم در گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد کاملاً بهبود پیدا کرده بود. اما در گروه کنترل مثبت و کنترل منفی همچنان مساحت کمی از زخم مشاهده می‌شد که این مساحت در گروه کنترل مثبت (0/15±0/25) از گروه کنترل منفی (0/60±0/83) کمتر بود اما هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد. اعداد بر اساس میانگین به میلی‌متر مربع و انحراف معیار می‌باشند. تصاویر بالینی زخم‌ها در روزهای مختلف در (شکل۲) قابل مشاهده است.

شکل ۲- نمونه تصاویر بالینی محل زخم‌ها در روزها و گروه‌های مختلف

درصد بهبود زخم: نتایج به‌دست آمده در مورد درصد بهبود زخم که به متغیر مساحت زخم در روز صفر بستگی دارد، نشان می‌دهد که در روز ۳، درصد بهبود زخم در گروه درمانی ۵ درصد بیشتر از سه گروه دیگر است (۵/۹۲ ± ۲۷/۷۶)و به صورت معنی‌داری با هر سه گروه تفاوت دارد (P-value =۰/۰۰).

در روز ۷، میزان درصد بهبود زخم به‌ترتیب در گروه‌های درمانی ۵ درصد (۳/۰۸ ± ۹۱/۰۰)، ۲ درصد (۲/۴۱ ± ۸۵/۳۴)، کنترل منفی (۷/۴۴ ± ۷۷/۶۸) و کنترل مثبت (۲۲/۰۳ ± ۶۸/۷۷) می‌باشد و دو گروه درمانی با گروه کنترل مثبت اختلاف آماری معنی‌دار دارند (۰/۰۱۰ = P-value). در روز ۱۴، درصد بهبود زخم در گروه‌های درمانی ۵ و ۲ درصد کامل بوده (۰/۰۰ ±۱۰۰) و بیشتر از گروه‌های کنترل مثبت (۰/۵۵ ± ۹۹/۷۲) و کنترل منفی (۲/۱۲ ± ۹۸/۴۲) است اما بین گروه‌ها تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد. تغییرات درصد بهبود زخم در روزهای مختلف در (جدول ۳) قابل مشاهده است.

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) درصد بهبود زخم در گروه‌های درمانی در روزهای مختلف

زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۲٪	عصاره ۵٪	P_{value}
روز ۳	۱۰/۲۳± ۷/۰۸ **a**	۷/۹۵± ۴/۹۶ **a**	۱۳/۴۶± ۴/۳۵ **a**	۲۷/۷۶± ۵/۹۲ **b**	۰/۰۰۰
روز ۷	۶۸/۷۷± ۲۲/۰۳**b**	۷۷/۶۸± ۷/۴۴**ab**	۸۵/۳۴± ۲/۴۱ **a**	۹۱/۰۰± ۳/۰۸ **a**	۰/۰۱۰
روز ۱۴	۹۹/۷۲± ۰/۵۵ **a**	۹۸/۴۲± ۲/۱۲ **a**	100/00± 0/00**a**	100/00± 0/00**a**	۰/۲۰۲

یافته‌های ارزیابی میکروسکوپیک

روش اول: در این روش از یک سیستم ده امتیازی که توسط Adam و همکاران طراحی شده بود، استفاده شد. تست آماری آنوا برای امتیازات پاتولوژی در روز هفتم تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل منفی با سایر گروه‌ها نشان داد (P-value =۰/۰۰۱). در روز چهاردهم گروه‌های درمانی ۲ درصد و ۵ درصد از لحاظ آماری امتیازهای پاتولوژی تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی نشان دادند (P-۰/۰۰۶ = value) و تفاوت امتیاز در گروه‌های درمانی ۵ و ۲ درصد بیشتر بوده است که نشان‌دهنده التیام بهتر می‌باشد. میانگین و انحراف معیار امتیازها برای هریک از گروه‌ها در این روش در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- نتایج امتیاز کلی هیستوپاتولوژیک به روش Adam و همکاران، میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) نمره هیستوپاتولوژیک در تیمارهای مختلف در روزهای ۷ و ۱۴. حروف انگلیسی نامتشابه در هر سطر تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها را نشان می دهد.

زمان	کنترل منفی	کنترل مثبت	درمانی ۲٪	درمانی ۵٪
روز ۷	۰/۰±۶۷/۵۸ a	۲/۳۳± ۰/۵۸ b	۲/۳۳± ۰/۵۸ b	۲/۳۳± ۰/۵۸ b
روز ۱۴	۵/۵۰± ۰/۵۸ a	۷/۵۰± ۰/۵۸ab	۹/۰۰± ۰/۵۸ b	۹/۰۰± ۰/۵۸ b

روش دوم: در روش دوم، معیارهای هیستوپاتولوژی تعیین شده در بین گروه‌های آزمایشی در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) امتیازات هیستوپاتولوژی در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم

معیارهای پاتولوژی	زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۲٪	عصاره ۵٪	P_{value}
نظم سلول‌های بازال	روز هفتم	1/00 ± 0/00	-	2/00 ± 0.00	3/00 ± 0/00	۰/۰۱۸
	روز چهاردم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	4/50 ± 0/71	۰/۱۶۱
تقسیمات سلول‌های بازال	روز هفتم	4/67 ± 0/58	-	4/00± 0/00	۳/۳۳ ± ۰/۵۸	۰/۰۶۹
	روز چهاردم	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	1/50 ± 0/71	1/50 ± 0/71	۰/۱۰۱
تکثیر سلول‌های خاردار	روز هفتم	5/00 ± 0/00	-	5/00± 0/00	4/00± 0/00	۰/۰۱۸
	روز چهاردم	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
تمایز سلول‌های خاردار	روز هفتم	1/67± 0/58	-	2/00 ± 0.00	3/00 ± 0/00	۰/۰۳۰
	روز چهاردم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	5/00 ± 0/00	۰/۱۰۴
سلول های دانه‌دار	روز هفتم	2/67 ± 0/58	-	3/00 ± 0/00	3/67 ± 0/58	۰/۱۱۰
	روز چهاردم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	5/00 ± 0/00	۰/۱۰۴
هایپرپلازی اپیدرم	روز هفتم	5/00 ± 0/00	-	4/67 ± 0/58	4/00± 0/00	۰/۰۶۱
	روز چهاردم	4/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	۰/۱۶۲
Rete ridges	روز هفتم	3/00 ± 0/00	-	3/67 ± 0/58	3/67 ± 0/58	۰/۲۰۲
	روز چهاردم	3/00 ± 0/00	2/50 ± 0/71	5/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	۰/۰۸۴
میزان تشکیل اپیدرم	روز سوم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	5/00± 0/00	1/00 ± 0/00	4/67 ± 0/58	4/00± 0/00	۰/۰۲۰
	روز چهاردم	3/50 ± 0/71	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۰/۵۰۶

معیارهای پاتولوژی	زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۲٪	عصاره ۵٪	P_{value}
میزان رشته‌های کلاژن	روز سوم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	2/00± 0/00	3/00± 0/00	۰/۰۷۲
	روز هفتم	2/67± 0/58	2/00 ± 0.00	3/00 ± 0/00	3/67 ± 0/58	۰/۰۳۷
	روز چهاردم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	۰/۱۶۲
جهت رشته‌های کلاژن	روز سوم	2/00± 0/00	2/00± 0/00	2/00± 0/00	1/50± 0/71	۰/۳۹۲
	روز هفتم	1/67 ± 0/58	2/00 ± 0.00	1/67± 0/58	1/67± 0/58	۰/۷۴۸
	روز چهاردم	2/00 ± 0/00	1/50 ± 0/71	2/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	۰/۹۳۲
فیبروسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها	روز سوم	4/00± 0/00	4/00± 0/00	4/50± 0/71	5/00± 0/00	۰/۱۶۲
	روز هفتم	3/00 ± 0/00	2/67 ± 0/58	4/00 ± 0/00	4/33± 0/58	۰/۰۱۹
	روز چهاردم	2/50 ± 0/71	2/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۰/۱۶۲
عضلات صاف	روز سوم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز چهاردم	3/00 ± 0/00	1/00± 0/00	3/50 ± 0/71	4/00 ± 0/00	۰/۱۰۸
تعداد رگ‌های خونی	روز سوم	3/50± 0/71	3/00± 0/00	3/50± 0/71	4/00 ± 0/00	۰/۳۲۱
	روز هفتم	2/67 ± 0/58	2/33 ± 0/58	2/67 ± 0/58	3/00 ± 0/00	۰/۴۳۲
	روز چهاردم	2/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	1/50 ± 0/71	2/00 ± 0/00	۰/۱۱۲
جهت رگ‌های خونی	روز سوم	2/50± 0/71	2/00± 0/00	3/00± 0/00	3/00± 1/41	۰/۴۳۲
	روز هفتم	2/67 ± 1/15	3/33 ± 1/15	3/67 ± 0/58	3/33 ± 0/58	۰/۶۲۲
	روز چهاردم	4/00 ± 0/00	3/50 ± 0/71	3/50 ± 0/71	4/00 ± 0/00	۰/۵۰۶
شدت سلول‌های التهابی	روز سوم	4/50± 0/71	4/50± 0/71	4/50± 0/71	4/00± 0/00	۰/۷۰۶
	روز هفتم	2/33 ± 0/58	3/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/33 ± 0/58	۰/۰۲۵
	روز چهاردم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
شدت پرخونی	روز سوم	3/50± 0/71	4/00± 0/00	4/50± 0/71	3/00± 0/00	۰/۱۶۱
	روز هفتم	3/00 ± 0/00	2/67 ± 0/58	2/00 ± 0.00	1/67± 0/58	۰/۰۴۰
	روز چهاردم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
خونریزی	روز سوم	2/00± 0/00	2/00± 0/00	2/00± 0/00	2/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	1/00 ± 0/00	2/00 ± 0.00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۰/۰۱۲
	روز چهاردم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
فولیکول‌های مو	روز سوم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
	روز چهاردم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	۰/۰۷۲
غدد سباسه	روز سوم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
	روز چهاردم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	۰/۰۷۲
غدد عرق	روز سوم	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
	روز چهاردم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰

در روز ۳، به علت عدم تشکیل لایه اپیدرم امتیازدهی و مقایسه‌ای از لحاظ معیارهای این لایه بین گروه‌های آزمایشی صورت نگرفت. در همه ارزیابی‌های انجام شده در روز سوم در ناحیه درم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در لایه درم امتیاز مربوط به میزان رشته‌های کلاژن (3/00± 0/00)، فیبروبلاست‌ها (5/00± 0/00) و تعداد رگ‌های خونی (4/00 ± 0/00) در گروه درمانی ۵ درصد بیشتر از سایر گروه‌ها بود. از لحاظ جهت رشته‌های کلاژن نیز هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مقایسه نشد (شکل ۳- الف).

عضلات صاف در هیچ‌کدام از نمونه‌ها قابل مشاهده نبود. از لحاظ شدت التهاب نیز هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نشد. سلول‌های التهابی مشاهده شده بیشتر شامل نوتروفیل‌ها بودند. سلول‌های التهابی و خونریزی در نمونه کنترل مثبت روز سوم در شکل۳- ب مشاهده می‌شود. از لحاظ شدت

پرخونی و خونریزی نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد.

در روز ۷، همه تفاوت‌های معنی‌دار مطالعه حاضر از نظر هیستوپاتولوژی در این روز بین گروه‌ها وجود داشت. همچنان لایه اپیدرم در گروه کنترل منفی تشکیل نشده بود در نتیجه از لحاظ میزان تشکیل اپیدرم بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشت. گروه پماد با غلظت ۵ درصد از لحاظ نظم سلول‌های بازال افزایش معنی‌داری را نشان داد (0/00 ± 3/00). در این روز از لحاظ معیار تقسیمات میتوزی سلول‌های بازال کمترین امتیاز مربوط به پماد با غلظت ۵ درصد بود (۰/۵۸ ± ۳/۳۳) ولی بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. از لحاظ تکثیر و تمایز سلول‌های خاردار بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت که از نظر معیار تمایز سلول‌های خاردار گروه پماد با غلظت ۵ درصد بیشترین امتیاز (0/00 ± 3/00) را در بین گروه‌های مختلف داشت (شکل۴- الف و ب).

سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیالین در همه نمونه‌های سه گروهی که لایه اپیدرم در آنها تشکیل شده بود قابل مشاهده بود. هایپرپلازی لایه‌ی اپیدرم در نمونه‌های گروه کنترل مثبت (0/00 ± 5/00) نسبت به گروه‌های دیگر افزایش غیر معنی‌داری داشت (شکل۴- ج).

در بررسی‌های مربوط به لایه درم میزان رشته‌های کلاژن در بین گروه‌های مختلف تفاوتی معنی‌دار وجود داشت و بیشترین امتیاز مربوط به گروه پماد با غلظت ۵درصد بود (0/58 ± 3/67) اما از لحاظ جهت رشته‌های کلاژن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف دیده نشد. از لحاظ معیار فیبروسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها بیشترین امتیاز مربوط به گروه پماد درمانی ۵ درصد (0/58 ±4/33) و کمترین امتیاز مربوط به گروه کنترل منفی (± 2/67 0/58) بود و بین گروه‌های مختلف از لحاظ این معیار تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

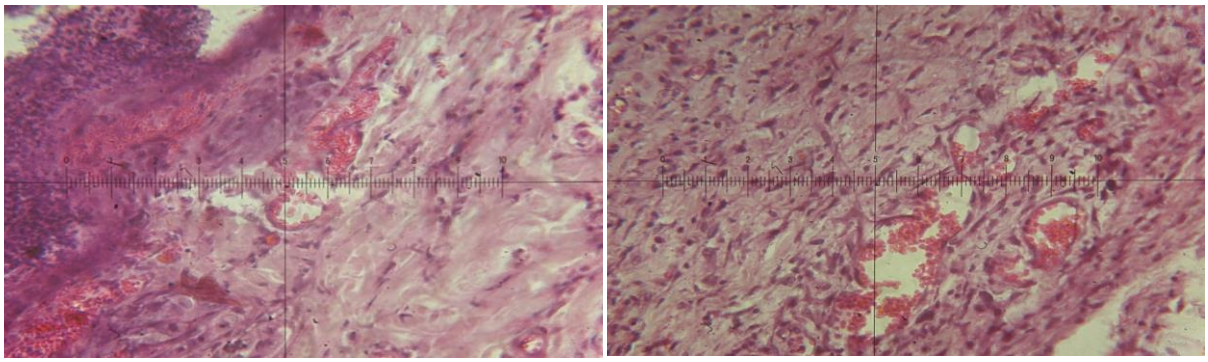
عضلات صاف در روز هفت در هیچ‌کدام از گروه‌ها مشاهده نشد. از لحاظ تعداد رگ‌های خونی بیشترین امتیاز مربوط به گروه پماد درمانی ۵ درصد بود (0/00 ± 3/00) ولی هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از لحاظ تعداد و جهت رگ‌های خونی مشاهده نشد. از لحاظ شدت سلول‌های التهابی بیشترین تفاوت معنی‌دار مربوط به گروه کنترل منفی (0/00 ± 3/00) و کمترین امتیاز مربوط به گروه پماد با غلظت ۲ درصد (0/00 ± 1/00) بود.

از لحاظ شدت پرخونی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد و بیشترین امتیاز مربوط به گروه کنترل مثبت (0/00 ± 3/00) و کمترین امتیاز مربوط به گروه پماد با غلظت ۵ درصد (0/58 ±1/67) بود. در روز هفت تنها در گروه کنترل منفی خونریزی بود و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود داشت. فولیکول‌های مو، غدد سباسه و غدد عرق نیز در هیچ‌کدام از گروه‌های مختلف در روز هفت تشکیل نشده بودند.

در روز ۱۴، معیارهای هیستوپاتولوژی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. بیشترین امتیاز از لحاظ نظم سلول‌های بازال مربوط به گروه درمانی ۵ درصد (0/71 ± 4/50) و بعد از آن گروه درمانی ۲ درصد (0/00 ± 4/00) بود و کمترین امتیاز را گروه کنترل منفی (0/00 ± 3/00) داشت. از لحاظ تقسیمات میتوزی در این روز کمترین امتیازها متعلق به گروه‌های درمانی ۵ و ۲ درصد (0/71 ± 1/50) بود. مقایسه سلول‌های لایه خاردار نیز از لحاظ تکثیر و تمایز و همچنین معیار هایپرپلازی اپیدرم هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نشان نداد. سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیالین نیز از لحاظ آماری فاقد تفاوت معنی‌دار بودند.

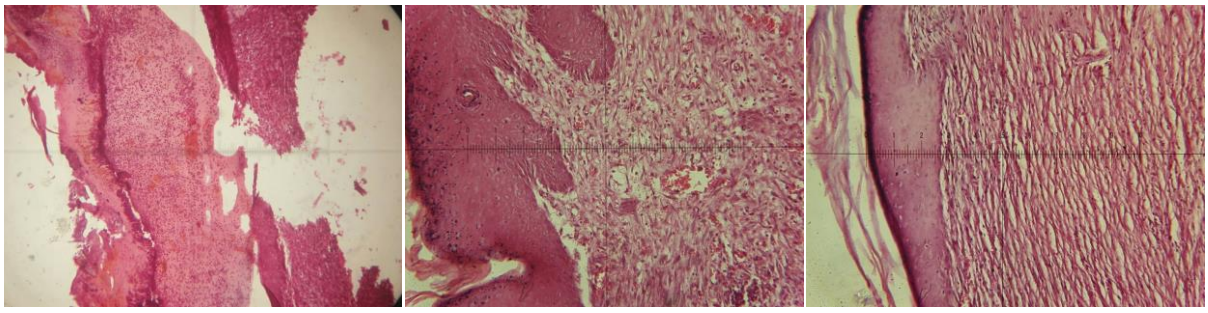
مورد دیگری که در لایه‌ی اپیدرم مورد مقایسه قرار گرفت حضور Rete ridges بود که از نظر این معیار گروه درمانی ۲ درصد بیشترین امتیاز (0/00 ± 5/00) را داشت. از لحاظ میزان تشکیل اپیدرم تفاوت‌ها غیر معنی‌دار بود. گروه‌های درمانی ۵ درصد و ۲ درصد (بیشترین امتیاز 4/00 ± 0/00) را از لحاظ میزان رشته‌های کلاژن بین گروه‌های مختلف نشان دادند. از لحاظ حضور سلول‌های فیبروسیت‌ها و فیبروبلاست گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد حاوی مقادیر بیشتری (0/00 ± 3/00) از این نظر بودند.

در گروه کنترل منفی عضله صاف مشاهده نشد (±1/00 0/00) و بیشترین میزان تشکیل عضلات صاف مربوط به گروه پماد با غلظت ۵ درصد بود (0/00 ± 4/00). عروق خونی نیز از لحاظ تعداد و جهت تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نداشتند. در روز چهارده در هیچ‌کدام از گروه‌ها سلول‌های التهابی، پرخونی و خونریزی مشاهده نشد. فولیکول‌های مو فقط در گروه‌های درمانی با غلظت ۵ و ۲ درصد در روز چهاردهم تشکیل شده بود. در گروه درمانی با غلظت ۵ درصد غدد سباسه نیز مشاهده شد اما در هیچ‌کدام از گروه‌ها غدد عرق در روز چهاردهم تشکیل نشده بود (شکل ۵- الف، ب و ج).



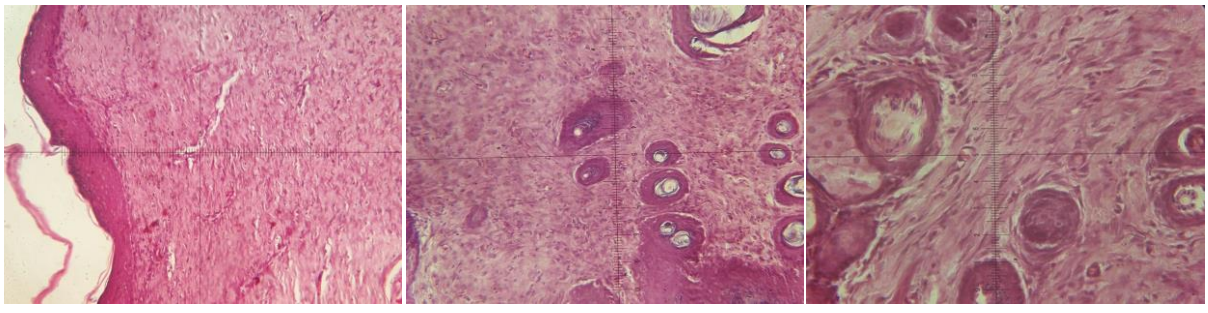
الف ب

شکل ۳- تصاویر پاتولوژی در روز ۳ الف: پرخونی و بافت همبند سرشار از فیبروبلاست مربوط به گروه درمان ۵٪ در روز سه با بزرگنمایی ۴۰، ب: سلول‌های التهابی و خونریزی در مقطع مربوط به گروه درمانی کنترل مثبت در روز سه با بزرگنمایی ۴۰



الف ب ج

شکل ۴- تصاویر پاتولوژی در روز ۷ الف: موازی بودن رشته‌های بافت همبند و سلول‌های فیبروبلاست در مقطع مربوط به گروه درمان ۵٪ در روز هفت با بزرگنمایی۲۰، ب: هایپرپلازی سلول‌های اپیدرم و پرخونی در مقطع مربوط به گروه درمان ۲٪ در روز هفت با بزرگنمایی ۲۰، ج: شروع تشکیل و پیشروی بافت پوششی و تجمع بافت نکروزه و سلول‌های التهابی فراوان در مقطع مربوط به زخم عفونت کرده در گروه کنترل مثبت در روز هفت با بزرگنمایی ۱۰



الف ب ج

شکل ۵- تصاویر پاتولوژی در روز ۱۴ الف: تشکیل فولیکول‌های مو و غدد سباسه در مقطع مربوط به گروه درمانی ۵٪ در روز چهارده با بزرگنمایی ۴۰، ب: تشکیل فولیکول های مو در مقطع مربوط به گروه درمانی ۲٪ در روز چهارده با بزرگنمایی ۲۰، ج: مقطع بافت شناسی مربوط به گروه درمان کنترل مثبت در روز چهارده با بزرگنمایی ۲۰

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ، به‌ویژه در غلظت ۵ درصد موجب کاهش معنی‌دار مساحت زخم در مقایسه با گروه‌های کنترل مثبت و منفی گردید. مساحت زخم در روز سه در گروه‌های عصاره گل راعی و روغن شترمرغ ۲ و ۵ درصد با گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشت (P-value <۰/۰۵) و در روز هفت مساحت زخم بین گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد با گروه کنترل مثبت، کاهش معنی‌داری داشت. علت این اختلافات از روز ۳ تا روز ۷، احتمالاً ایجاد التهاب و عفونت در بعضی نمونه‌های مربوط به گروه کنترل مثبت که توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده در روز صفر آزمایش بود، که می‌تواند سرعت التیام و کاهش مساحت زخم را در گروه کنترل مثبت به‌صورت قابل توجهی کم کند.

به نظر می‌رسد استفاده روزانه از ترکیب وازلین و اوسرین در گروه کنترل مثبت به‌دلیل مرطوب نگه‌داشتن زخم شرایط بهتری را برای رشد باکتری تلقیح شده، نسبت به گروه کنترل منفی فراهم کرده بود و در گروه‌های درمانی عصاره گل راعی و روغن شترمرغ التهاب و عفونت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت که این مورد با مطالعات قبلی عصاره گل راعی (۱۸) و روغن شتر مرغ (۱۹) مطابقت دارد. تشخیص التهاب و عفونت بر اساس یافته‌های بالینی و هیستوپاتولوژی بوده است.

در آخرین روز بررسی مساحت زخم‌ها (روز ۱۴)، در نمونه‌های مربوط به گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد مساحت زخم‌ها به صفر رسیده بود و هیچ‌گونه بافت زخمی در ارزیابی بالینی مشاهده نگردید، این در حالی بود که در بعضی نمونه‌های مربوط به گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی زخم کوچکی بر پشت حیوان قابل مشاهده و اندازه‌گیری بود. البته این تفاوت در روز ۱۴ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

در این تحقیق، درصد بهبود زخم که یک متغیر وابسته به مساحت زخم در روز ایجاد آن (روز صفر) است نیز محاسبه شده است. اگرچه زخم‌ها به‌صورت استاندارد و هم اندازه با یک پانچ ۶ میلی‌متری ایجاد شده بودند ولی به دلایل مختلفی مثل کشیده شدن پوست در زمان ایجاد زخم و یا تفاوت‌های فردی در میزان کشیده شدن پوست اطراف زخم ممکن است مساحت ایجاد شده زخم‌ها در روز صفر متفاوت باشد و به این دلیل از درصد بهبود زخم برای بررسی بیشتر استفاده شده است.

درصد بهبود زخم در روز سه در گروه درمانی ۵ درصد افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. به علت مشاهده التهاب و عفونت در گروه کنترل مثبت، تفاوت در درصد بهبود زخم در گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد با گروه کنترل مثبت در روز هفت از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری را نشان داد.

در مطالعه سندگل و همکاران (۲۰۲۱) از عصاره دو گیاه گل راعی و آلوئه‌ورا استفاده شده است و مساحت زخم‌ها در طی مطالعه تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در مطالعه حاضر تفاوت مساحت زخم‌ها در روزهای ۳ و ۷ معنی‌دار شده است. تفاوت درصد التیام زخم در روز سوم آن مطالعه معنی‌دار شده است در حالی که در مطالعه حاضر تفاوت‌های دو روز ۳ و ۷ معنی‌دار است و این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده اثرات بهتر ترکیب گل راعی و روغن شتر مرغ باشد. گل ایکن و همکاران (۲۰۲۱) از روغن گل راعی همراه با عصاره آلوئه‌ورا در پوشش زیست تخریب‌پذیر پلی ا-کاپرولاکتون و ژلاتین در زخم دیابتی استفاده کردند که روغن گل راعی بهتر از آلوئه‌ورا در التیام زخم‌های دیابتی مؤثر بوده است. در مطالعه آلتان و همکاران (۲۰۱۸) از روغن گل راعی به‌صورت موضعی در جراحات ایجاد شده به‌صورت جراحی مخاط دهان موش‌های دیابتی شده استفاده شده است. در روز سوم مطالعه تغییرات معنی‌داری

بین دو گروه کنترل و روغن گل راعی مشاهده نشد ولی در روز هفتم تغییرات معنی‌داری در التیام گروه روغن گل راعی مشاهده شد که از نظر زمانی التیام مشابه مطالعه حاضر است. ازون حصارکیک و همکاران (۲۰۲۱) از روغن گل راعی همراه با روغن عصاره دانه انار و زردچوبه برای التیام زخم استفاده نموده‌اند که گروه حاوی روغن گل راعی همراه با زردچوبه در مطالعه اثرات بهبود دهنده بهتری نسبت به ایبوبروفن داشته است. شمپ و همکاران (۱۹۹۹) اثرات ضد التهابی آمنتوفلاون و هیپرفورین و اثرات ضد باکتریایی هایپرفورین موجود در گل راعی را نشان داده‌اند. فرهادپور و همکاران (۲۰۱۸) از روغن شترمرغ به تنهایی و به‌صورت موضعی در درمان زخم‌هایی که به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آیروژینوزا* آلوده شده بودند بهره بردند. مساحت این زخم‌ها به‌صورت معنی‌داری در گروه‌های درمان با روغن شترمرغ کاهش یافته بود که با مطالعات ما در روز هفتم همخوانی دارد. یالسین گایا و همکاران (۲۰۲۲) تجویز موضعی عصاره گل راعی با بوویدین آیودان، تنتور بنزوئین و ترتینوئین را در التیام زخم‌های جراحی مورد مقایسه قرار داده‌اند. عصاره گل راعی به‌صورت معنی‌داری بیشترین میزان از اپیتلیالیزیشن مجدد، تجمع کلاژن و کمترین میزان تعداد سلول‌های التهابی و بافت جوانه‌ای را نسبت به سایر مواد نشان داده است که با نتایج ما همخوانی دارد. تامسون و همکاران (۲۰۰۷) مطالعه‌ای بر روی تأثیر گل راعی در روند درمان زخم‌های موش‌های دیابتی و بررسی پارامترهایی مانند جمعیت فیبروبلاست‌ها، سنتز رشته‌های کلاژن و عروق‌زایی انجام داده‌اند که نشان می‌دهد گل راعی بعضی از این پارامترها را تعدیل می‌کند و در نتیجه باعث سرعت بخشیدن به روند بازسازی بافت می‌شود.

علت احتمالی دیگر برای تسریع التیام زخم به‌وسیله ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ به‌خصوص در مقادیر بالاتر (۵ درصد)، می‌تواند افزایش تکثیر و تعداد فیبروبلاست‌ها و همچنین افزایش میزان رشته‌های کلاژن باشد که در این موارد در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ در گروه‌های درمانی بیشتر از گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی بوده و حتی این تفاوت‌ها در روز هفتم معنی‌دار بوده است (P-value <۰/۰۵). نفوذ بیشتر فیبروبلاست‌ها و افزایش میزان رشته‌های کلاژن با ایجاد بافت جوانه‌ای موجب تسریع روند تشکیل بافت پوششی می‌شود و از این طریق به روند التیام سرعت می‌بخشد.

سندگل و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند در روز هفت در گروه عصاره دو گیاه گل راعی و آلوئه‌ورا ، میزان سلول‌های فیبروبلاست در طی مطالعه افزایش غیر معنی‌داری داشته است. البته میزان رشته‌های کلاژن در آن گروه درمانی در روز هفت افزایش معنی‌دار داشته، که یافته‌های حاضر را تأیید می‌کند. دمیران و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند هیدروژل کیتوزان و پلی‌ونیل الکل حاوی روغن گل راعی در کاهش اندازه زخم مؤثر بوده است که از این نظر مشابه مطالعه حاضر می‌باشد.

هایپریسین و سودوهایپریسین موجود در عصاره گل راعی سبب افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست و همچنین میزان کلاژن موجود در آنها و کاهش سلول‌های پیر و مرده می‌شوند. در نتیجه عصاره روغنی این گیاه می‌تواند سبب تسریع روند بهبود ترک‌خوردگی پا شود (۷) که با یافته‌های ما همخوانی دارند.

روغن شترمرغ به تنهایی و به‌صورت موضعی در درمان زخم‌هایی که به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آیروژینوزا* آلوده شده بودند استفاده شده است. میزان رگ‌های جدید، شمارش فیبروبلاست‌ها و ذخیره کلاژن در گروه‌های درمان شده با روغن شترمرغ افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود (۱۹).

امولسیون روغن شترمرغ در آب بر روی فیبروبلاست‌های پوست انسان اثرات سیتوتوکسیک نداشته و علاوه بر آن اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد باکتری بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است (۲۷).

در مطالعه حاضر در روز ۱۴ در گروه درمانی پماد با غلظت ۵ درصد فولیکول مو و غدد سباسه مشاهده شد همچنین در روز ۱۴ در گروه پماد با غلظت ۲ درصد نیز

فولیکول مو در مقاطع پاتولوژی تهیه شده دیده شد، در صورتی که در گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی هیچ فولیکول مو و غدد سباسه‌ای تشکیل نشده بود که می‌تواند این موارد نشان‌دهنده التیام کامل زخم باشد که با مطالعه سندگل و همکاران در سال ۲۰۲۱ همخوانی دارد که احتمالاً ناشی از وجود عصاره گل راعی می‌باشد.

در مطالعه دیگری روغن شترمرغ همراه با عسل، موم و برموم زنبور عسل، عصاره اتانولی سیاه‌دانه و سنای هندی به‌صورت پماد برای درمان زخم‌های موش‌های دیابتی استفاده شده است در گروهی که از پماد حاوی آنها استفاده شده است التیام زخم و میزان تجمع کلاژن افزایش یافته و در بررسی هیستوپاتولوژی فولیکول‌های مو و غدد چربی در آنها مشاهده شده است (۲۸) که نتایج آن با مطالعه حاضر همخوانی دارد. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند روغن شترمرغ خاصیت نفوذپذیری بیشتری نسبت به وازلین برای انتقال سینومنین از پوست رت داشته است با توجه به این موضوع احتمال نفوذ مواد درمانی گل راعی در گروه درمانی ۵ درصد ممکن است بیشتر شود که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیرات التیام بخشی ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ و مقایسه دو غلظت مختلف از این ترکیب بر زخم جلدی تلقیح شده با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب عصاره گل راعی۵ درصد و روغن شترمرغ ۵ درصد نتایج معنی‌دار بهتری جهت التیام زخم از خود نشان می‌دهد. همچنین در صورت آلوده شدن زخم با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، ترکیب استفاده شده نشان داد که می‌تواند از ایجاد عفونت در زخم جلوگیری کند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همه همکارانی که در انجام این کار با ما مساعدت نمودند خصوصاً شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

References

1- Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press Inc. *Boca Raton*. 2002; P: 374- 375.

2- Simor AE, Phillips E, McGeer A, *et al.* Mupirocin resistance in Staphylococcus aureus from a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9): 2877-2880.

3- Ghaderi R, Zardast M, Hosseini M, Delgir B, Hassanpour M. Comparison of Antibacterial Effect of Cichorium Intybus L. with Vancomycin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin and Penicillin (In Vitro). *Clin Exp Pharmacol*. 2012; 2(2): 1000113. [In persian]

4- Morton LM, Phillips TJ. Wound Healing Update. *Semin Cutan Med Surg.* 2012; 31(1): 33-7.

5- Shiu WKP, Malkinson JP, Rahman MM, Curry J, Stapleton P, Gunaratnam M, *et al.* A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in Staphylococcus aureus. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 42(6): 513-8.

6- Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of Hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry*. 2001; 34(1): S116 - S118.

7- Wölfle U, Seelinger G, Schempp CM. Topical Application of St. John's Wort (Hypericum perforatum). *Planta Medica.* 2014; 80(2- 3): 109-20.

8- Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream–a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine*. 2003; 10(4): 31-37.

9- Gavanji S, Larki B, Taraghian AH. A review of Application of Ostrich oil in Pharmacy and Diseases treatment. *JNAS.* 2013; 2013-2-11: 650-654.

10- El-Kamali HH. Folk medicinal use of some animal products in Central Sudan. *J Ethnopharmacol. 2000;* 72: 279-282.

11- Grompone MA, Irigaray B, Gil M. Composition and thermal properties of Rhea oil and its fractions. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2005; 107: 762-766.

12- Snowden JM, Whitehouse MW. Anti-in-

flammatory activity of emu oils in rats. *Inflammopharmacology*. 1997; 5: 127-132.

13- Abimosleh SM, Tran CD, Howarth GS. Emu Oil: A novel therapeutic for disorders of the gastrointestinal tract? J G*astroenterol hepatol.* 2012; 27: 857-861.

14- Politis MJ, Dmytrowich A. Promotion of second intention wound healing by emu oil lotion: comparative results with furasin, polysporin, and cortisone. *Plast Recon Surg*. 1998; 102: 2404– 2407.

15- Winn WC, Allen SD, Allen S. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*.London: Lippincott Williams & Wilkins 1997; 200: 211-94.

16- Singer AJ, Thode HC, McClain SA. Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. *Acad Emerg Med. 2000;* 7: 1083- 1088.

17- Sanadgol S, Aghchelou MR, Darush S, Jamshidian A. Effects of Hypericum perforatum and Aloe vera extracts in rat open wounds inoculated with Staphylococcus aureus: clinical and histopathology aspects. *NFVM*. 2021; 4 (1): 1-22. [In persian]

18- Sherif MM, Elshikh HH, Abdel-Aziz MM, Elaasser MM, Yosri M. In Vitro Antibacterial and Phytochemical Screening of Hypericum perforatum Extract as Potential Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant (MDR) Strains of Clinical Origin. *Biomed Res Int*. 2023; 2023: 6934398.

19- Farahpour MR, Vahid M, Oryan A. Effectiveness of topical application of ostrich oil on the healing of Staphylococcus aureus- and Pseudomonas aeruginosa-infected wounds. *Connect Tissue Res*. 2018; 59(3): 212-222. [In persian]

20- Guleken Z, Depciuch J, Ege H, İlbay G , Kalkandelen C, Ozbeyli D, et al., Spectrochemical and biochemical assay comparison study of the healing effect of the Aloe vera and Hypericum perforatum loaded nanofiber dressings on diabetic wound. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* .2021; 254: 119639.

21- Altan A, Aras MH, Damlar İ, Gökçe H, Özcan O, Alpaslan C. The effect of Hypericum Perforatum on wound healing of oral mucosa in diabetic rats. *Eur Oral Res*. 2018; 52(3): 143-149.

22- Uzunhisarcıklı E, Yerer MB. Role of Hypericum perforatum oil and pomegranate seed oil in wound healing: an in vitro study. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2021; 77(5-6): 189-195.

23- Schemp CM, Pelz K, Wittmer A, Sch¨opf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin fromSt John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. *The Lancet*.1999.

24- Yalcınkaya E, Mert Basaran M, Tunckasık ME, Yazici GN, Elmas C, Kocaturk S. Efficiency of hypericum perforatum, povidone iodine, tincture benzoin and tretinoin on wound healing. *Food Chem Toxicol*. 2022; 166: 113209.

25- Thomson Healthcare. *PDR for Herbal Medicines.* 4th ed. Montvale; NJ, USA; 2007.

26- Demirhan I, Korkmaz A, Oner E, Gumuscu N, Erbil Y, Babaarslan O, *et al.* Synthesis, characterization, and antibacterial effect of St. John's wort oil loaded chitosan hydrogel. *Int J Biol Macromol*. 2024; 260(Pt 1): 129444.

27- Ponphaiboon J, Limmatvapirat S, Limmatvapirat C. Development and Evaluation of a Stable Oil-in-Water Emulsion with High Ostrich Oil Concentration for Skincare Applications. *Molecules*. 2024; 29(5): 982.

28- Khodabakhshi D, Vaseghi G, Mirzaee A, Eskandarinia A, Zargar Kharazi A. Antimicrobial activity and wound healing effect of a novel natural ointment: an in vitro and in vivo study. *J Wound Care*. 2023; 32(6): S18-S26. [In persian]

29- Liu X, Chen T, Liu X, Chen Y, Wang L. Penetration effect of ostrich oil as a promising vehicle on transdermal delivery of sinomenine. *J Oleo Sci.* 2013;62: 657-664.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Quarterly - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 3, Autumn 2025, pages: 24-39

Evaluation of Wound Healing Inoculated with *Staphylococcus aureus* by St. John's Wort Extract and Ostrich Oil

Roxana Sarabandi[1], Mohammad Reza Aghchelou[2*], Dariush saadati[3], Abbas Jamshidian[4]

1- Gradated student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Assistant professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Associated professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: May 06, 2025; Revise: July 02, 2025; Accept: July 03, 2025

10.22034/nfvm.2025.521711.1285

Summary

Abstract: *Staphylococcus aureus* is one of the most significant bacterial agents in skin wound infections. In complementary medicine, medicinal plants are of interest due to their antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. This study investigates the effect of a combination of *St. John's Wort* extract and ostrich oil on the healing of open wounds inoculated with *S. aureus* in rats. Forty adult rats were divided into four groups: a negative control, a positive control (Vaseline + Eucerin), and two treatment groups with ointments containing 2% and 5% of the mentioned combination. The wounds were examined on days 0, 3, 7, and 14 for healing percentage and histopathological changes. Findings showed that the healing percentage on day 7 was significantly higher in the two treatment groups compared to the positive control group. Additionally, the mean histopathology scores of the wounds on days 7 and 14 significantly better in the treatment groups than in the negative control group. The results indicate that the combination of *St. John's Wort* extract and ostrich oil reduces inflammation and accelerates the healing of infected wounds, with the 5% ointment showing greater efficacy than the 2% ointment.

Keywords: *Staphylococcus aureus, St. John's Wort extract, ostrich oil, histopathology, wound healing*