

اثر القا کنندگی ژل آلوئه ورا بر بیان ژن رسپتور فاکتور رشد اپی تلیالی در زخم های پوستی موش های نر *Balb/c*

نرگس نجفی M.Sc.، مهرا ن عربی Ph.D.*، حمیرا جعفرزاده M.Sc.

- بخش فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، صندوق پستی ۱۱۵، شهرکرد، ایران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mehranarabi@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۸

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره ژل گیاه آلوئه ورا بر برخی روندهای مولکولی در فرآیند ترمیم پوست آسیب دیده موش به انجام رسیده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش نر سوری *Balb/c* استفاده گردیدند. موش ها به سه گروه کنترل منفی (پوست سالم)، کنترل کاذب (شم، زخم با تیمار سرم فیزیولوژیک) و تجربی (زخم با تیمار عصاره ژل آلوئه ورا) تقسیم گردید. بر روی پشت موش ها دو زخم یکسان با برداشت کامل پوست ایجاد گردید. در گروه تجربی، روزانه یک بار مقدار ۲ گرم از ژل آلوئه ورا به صورت یک لایه نازک بر روی سطح زخم ها (بدون بانداز) به مدت ۱۶ روز قرار داده شد. پس از روزهای هشتم و شانزدهم از ایجاد زخم، جهت بررسی میزان بیان ژن رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و نیز محتوی پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)، به ترتیب از پوست و سرم خون موش ها نمونه برداری شد و از روش آماری Repeated measures ANOVA با سطح معنی داری $p < 0.05$ استفاده گردید.

نتایج: عصاره ژل آلوئه ورا سبب افزایش بیان ژن رسپتور EGF در زخم پوستی گردید. درصد بهبودی زخم های گروه تجربی افزایش معنی داری را نسبت به گروه شم نشان داد. تیمار با آلوئه ورا به طور معنی داری موجب کاهش محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها در سرم خون موش ها گردید.

نتیجه گیری: عصاره ژل آلوئه ورا قادر به القا بیان ژن رسپتور EGF در پوست آسیب دیده موش ها شده و قادر به ایفای یک نقش محوری در فرآیند ترمیم زخم می باشد.

واژگان کلیدی: عصاره ژل آلوئه ورا، ترمیم زخم، ژن رسپتور EGF، پراکسیداسیون لیپیدها

مقدمه

ترمیم زخم پوستی روند پیچیده‌ای است که در پاسخ به زخم شروع شده و تا اصلاح بافت آسیب دیده ادامه می‌یابد. این فرآیند به وسیله آبشاری از وقایع سلولی و مولکولی رخ می‌دهد. پس از ایجاد زخم در پوست، پاسخ‌های التهابی و افزایش تولید کلاژن توسط سلول‌های ناحیه درم آغاز شده و به دنبال آن، بافت اپی تلیالی باز آرای می‌گردد. فاکتورهای رشد، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی زیاد بوده که توسط بسیاری از سلول‌ها تولید شده و به محض ترشح با عمل کرده‌های اتوکراین و پاراکراین می‌توانند آبشاری از فرآیندهای سلولی را آغاز کنند. رسپتورهای فاکتورهای رشد گلیکوپروتئین‌هایی غشایی بوده که از طریق فعالیت تیروزین کینازی و یا فسفریلاسیون تاثیر خود را بر جای می‌گذارند. فاکتورهای رشد مختلفی بر روند ترمیم زخم اثر گذاشته که از آن جمله می‌توان به فاکتور رشد اپی‌درمی EGF و رسپتور آن اشاره کرد.

فاکتورهای رشد خانواده EGF برای عمل کرد خود، به رسپتورهایی از همین خانواده متصل شده و به دنبال آن با اثر بر خانواده پروتئین کینازهای درون غشایی مراحل ترمیم را آغاز می‌کنند. بیشتر رسپتورهای EGF بر روی سلول‌های اندوتلیالی بوده ولی بر روی فیبروبلاست‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف نیز مشاهده می‌شوند. هم‌زمان با ایجاد زخم تعداد این رسپتورها در اپی‌درم افزایش یافته که این موضوع نقش EGF را در بازسازی اپی‌تلیوم نشان می‌دهد (۱، ۲، ۳) EGF ها باعث افزایش تکثیر در سلول‌های اپی‌تلیالی، اندوتلیالی و فیبروبلاست‌ها می‌شوند همچنین باعث افزایش فرایند آنژیوژنز و تولید کلاژن در بافت آسیب دیده می‌شوند.

رسپتور EGF در کراتینوسایت‌های حاشیه‌ای در محل زخم بیان شده و همچنین باعث افزایش فولیکول مو، مجرای عروقی و غدد چربی می‌شود. لذا مهم‌ترین نقش رسپتورهای EGF در مهاجرت کراتینوسایت‌هاست که به دنبال آن باعث بازسازی اپی‌تلیوم می‌شود (۴ و ۵).

آلوئه‌ورا یا صبر زرد گیاهی از سرده سِگل‌ها (Aloe)، راسته مارچوبه‌ای‌ها و تیره سریشیان بوده که بومی آفریقای شمالی است. گیاه آلوئه‌ورا به‌طور عمده در مناطق خشک رشد نموده و با اینکه به خانواده زنبق تعلق داشته اما در ظاهر شباهت بسیار زیادی به کاکتوس دارد. برگ‌های گوشتی این گیاه حاوی ژلی است که تمام خواص گیاه در آن نهفته است به‌طوری‌که از ژل

(موسیلاژ) آن در درمان زخم‌های درونی و بیرونی بدن انسان می‌توان استفاده نمود. ژل آلوئه ورا حاوی برخی گلیکوپروتئین‌ها بوده که از تورم و درد جلوگیری و روند بهبود را تسریع نموده همچنین حاوی پلی‌ساکاریدهایی بوده که رشد و ترمیم پوست را تحریک می‌نمایند (۶ و ۷). خاصیت ترمیم کنندگی آن مربوط به ترکیبی به نام گلوامانان که غنی از پلی‌ساکاریدهای مانند مانوز است، می‌باشد. گلوامانان بر گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاست‌ها اثر گذاشته و فعالیت و تکثیر این سلول‌ها را تحریک نموده که به نوبه خود موجب افزایش تولید و ترشح کلاژن خواهد شد. ژل آلوئه ورا نه تنها میزان کلاژن را در محل زخم‌ها افزایش داده، بلکه ضمن ایجاد تغییر در ساختار کلاژن، اتصالات عرضی بین این رشته‌ها را افزایش داده و در نتیجه بهبود زخم را تسریع می‌کند (۶ و ۸). با این اوصاف و با توجه به خاصیت ترمیم کنندگی گیاه آلوئه ورا، در پژوهش حاضر تاثیر ژل این گیاه بر روند ترمیم زخم و به‌ویژه تاثیر آن بر میزان بیان ژن رسپتور EGF در پوست موش مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش نر سوری نژاد Balb/c در محدوده وزنی 22 ± 2 گرم مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها در سه گروه کنترل منفی (دست نخورده/ بدون زخم)، کنترل کاذب (شم، زخم با تیمار روزانه سرم فیزیولوژیک) و تجربی (زخم با تیمار روزانه عصاره ژل آلوئه ورا) تقسیم گردیدند. در هر گروه ۱۲ سر موش مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و در رطوبت ۵۰ درصد و سیکل ۱۲ ساعته روشنایی- تاریکی با تغذیه معمولی و آب شهری در قفس‌های مجزا نگهداری شدند. در ادامه موش‌ها به کمک ترکیب دارویی شامل کتامین، زایلازین، آسپارامازین و دیازپام بی‌هوش شده و بر روی پشت هر موش دو زخم مساوی به قطر 2 ± 10 میلی‌متر با برداشت ضخامت کامل پوست (Full-thickness) در ناحیه خاجی و در دو طرف ستون مهره‌ها ایجاد گردید. روز ایجاد زخم‌ها، روز صفر در نظر گرفته شد. در گروه تجربی، روزانه یک بار مقدار ۲ گرم از عصاره ژل آلوئه ورا به‌صورت یک لایه نازک بر روی سطح زخم‌ها (بدون بانداژ) به مدت ۱۶ روز قرار داده می‌شد. پس از روزهای هشتم و شانزدهم پس از ایجاد زخم، جهت بررسی میزان بیان ژن رسپتور EGF (به کمک RT-PCR) و نیز محتوی پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) با اندازه‌گیری

رقیق گردیده و به کمک دستگاه ورتکس به مدت دو دقیقه به خوبی مخلوط شدند. در مرحله بعد به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ با دور $2500 \times g$ مورد استفاده قرار گرفت. سوپرناتانت حاصله به نسبت ۱:۱ با محلول یک درصد TBA رقیق گردید. مجموعه به دست آمده در درون لوله‌های آزمایش جدید و در دمای حدود ۹۰ درجه سانتی‌گراد در داخل دستگاه بن‌ماری برای مدت ده دقیقه قرار داده شد. پس از خارج نمودن و سرد کردن لوله‌ها در دمای اتاق محتوی هر لوله به کیووت منتقل گردیده و میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر و به کمک روش اسپکتروفوتومتری، اندازه‌گیری شد.

برای بررسی میزان تغییرات سطح زخم و درصد بهبود آن، پس از ایجاد زخم به فاصله یک روز در میان با به‌کارگیری کولیس دیجیتالی قطر هر زخم بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به این که زخم‌های ایجاد شده مدور و با قطر اولیه 10 ± 2 میلی‌متر بودند، مساحت زخم بر اساس میلی‌متر مربع در روزهای مختلف مورد محاسبه قرار گرفت. سپس درصد ترمیم زخم‌ها در روزهای متفاوت از دو فرمول زیر برای این منظور استفاده گردید:

$$100 \times (\text{مساحت زخم در روز } X \div \text{مساحت زخم در روز صفر}) = \text{درصد مساحت زخم در یک روز مشخص}$$

$$\text{درصد مساحت زخم} - 100 = \text{درصد ترمیم زخم در یک روز مشخص}$$

در این پژوهش تمامی داده‌ها به صورت $\text{Means} \pm \text{Standard Deviation (SD)}$ نمایش داده شده‌اند. جهت مقایسه میانگین داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measures ANOVA) در نرم افزار، SPSS (ویراست ۱۶) استفاده گردید. سطح $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی‌های مولکولی نشان داد که تیمار آلونده ورا در دو دوره زمانی ۸ و ۱۶ روزه و در مقایسه با گروه شام و کنترل منفی، افزایش معنی‌داری را در میزان بیان ژن رسپتور EGF باعث گردیده است ($p < 0.05$) (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

میزان تغییرات مالون دی‌آلدید (MDA)، به ترتیب از پوست و سرم خون موش‌ها نمونه‌برداری‌های لازم به عمل آمد. همچنین در طول دوره‌های تیمار به صورت یک روز در میان میزان درصد بهبودی زخم‌ها در گروه‌های مختلف محاسبه گردید.

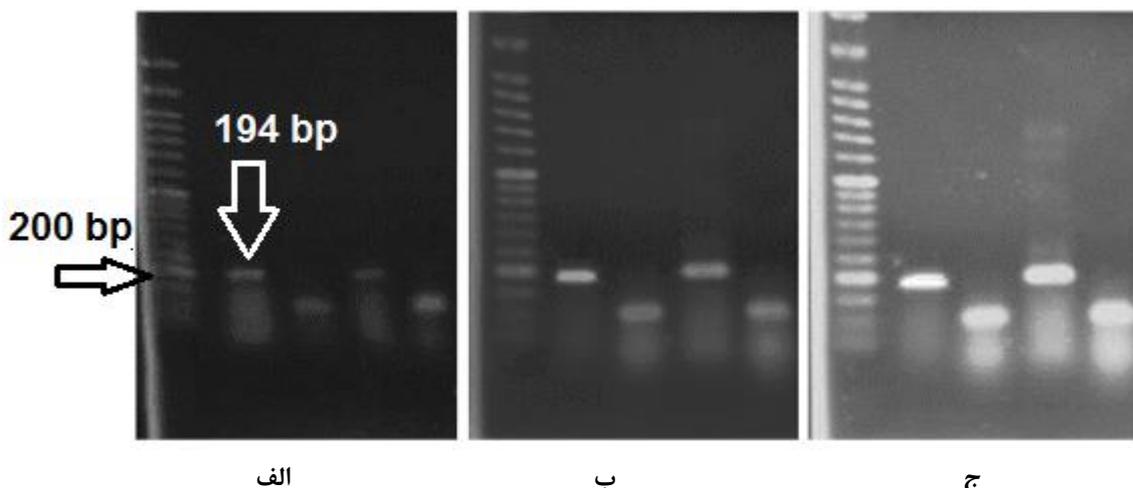
در این مطالعه به منظور بررسی‌های مولکولی از تکنیک RT-PCR جهت ارزیابی میزان بیان ژن EGF استفاده گردید به‌طور خلاصه، در ابتدا کل RNA سلولی محل زخم‌ها با استفاده از کیت RNX-plus (سازنده شرکت سیناکلون) استخراج گردید. پس از بررسی کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگاروز و انجام UV اسپکتوفتومتری (دستگاه Herolab مدل UVT-20 M/L ساخت کشور آلمان)، cDNA (سازنده شرکت سیناکلون) ساخته شد. از RNAهای استخراج شده با استفاده از کیت RT-universal نسخه برداری معکوس به انجام رسید. cDNAهای تولید شده به‌عنوان الگو برای انجام PCR با استفاده از دستگاه حرارتی TECHNE مدل TC-512 مورد استفاده قرار گرفتند. دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، و دنا تورا سیون بعدی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد، و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه انجام گرفت. در این تحقیق جهت بررسی میزان بیان رسپتور ژن EGF از پرایمرهای اختصاصی این ژن با مشخصات زیر و طول باند ۱۹۴ جفت باز استفاده گردید.

F-EGFR: 5-CGAATAATCATCCAGGAGAG-3

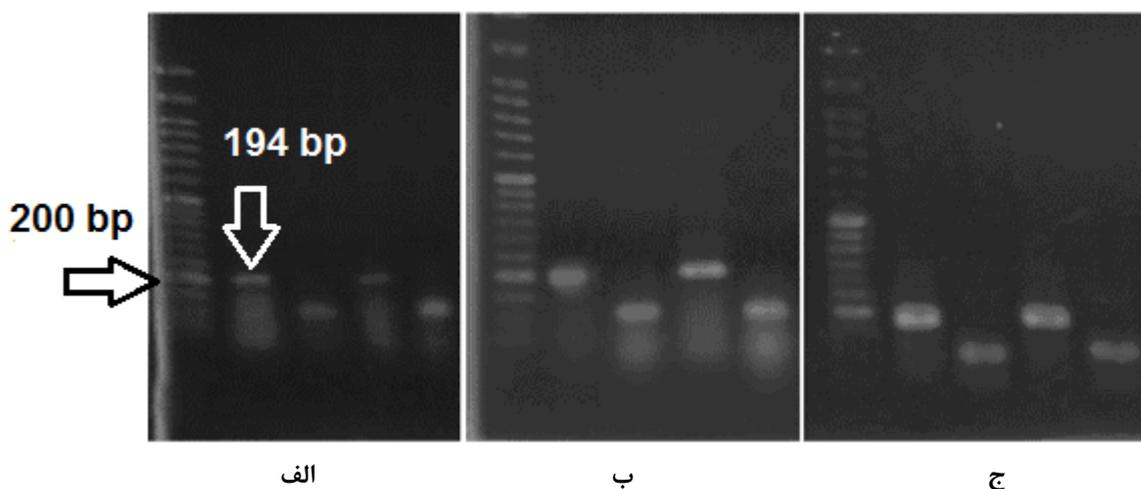
R-EGFR: 5-GTCTGTAAAGTAGTCAATCGTG-3

در انتهای کار محصول PCR روی ژل آگاروز جدا و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده و تصویر برداری به انجام رسید. به منظور بررسی میزان بیان ژن مورد نظر از نرم افزار UV-TEACH استفاده گردید. این نرم افزار پس از شناسایی باند‌ها به ارزشیابی شدت باندها پرداخته و میزان شدت باند را به کمک یک عدد مشخص می‌سازد.

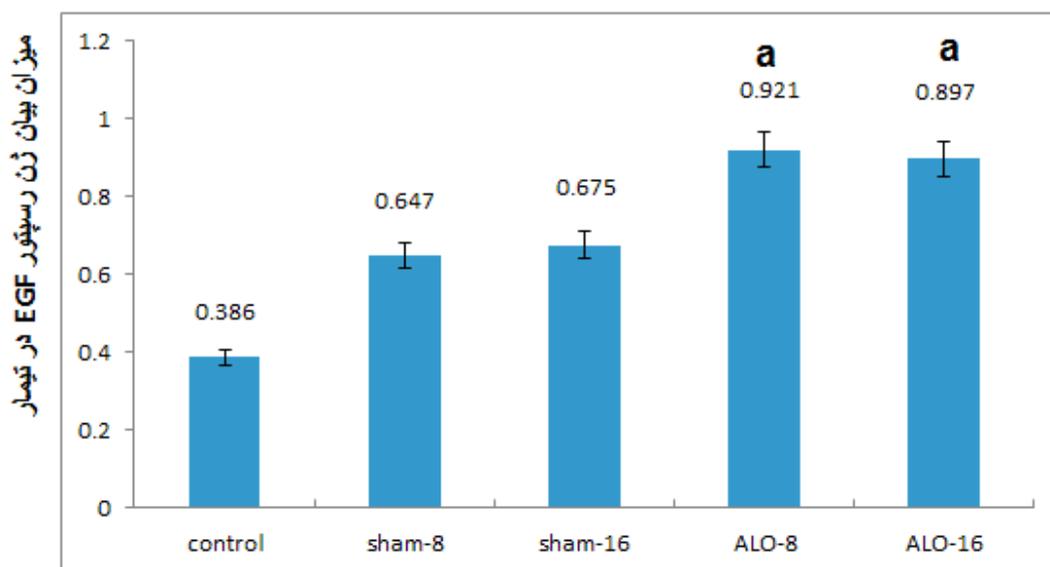
در بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)، تغییرات میزان مالون دی‌آلدید (MDA) به‌عنوان محصول نهایی این روند، به کمک روش پیشنهادی توسط Buege & Aust (1978) مورد سنجش قرار گرفت (۹). در ابتدا نمونه‌های سرم خون اخذ شده از موش‌ها به کمک محلول ۱۰ درصد TCA سرد (۱:۳)،



شکل ۱: RT-PCR بر روی RNA استخراج شده از پوست موش و بررسی میزان بیان ژن رسپتور EGF در ناحیه ترمیم زخم پس از ۸ روز از ایجاد زخم:
 الف: چاهک ۱، ۳، محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش بدون زخم با پرایمرهای EGF-R چاهک ۲، ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش بدون زخم با پرایمرهای اکتین.
 ب: چاهک ۱، ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به مدت ۸ روز) با پرایمرهای EGF-R چاهک ۲، ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به مدت ۸ روز) با پرایمرهای اکتین.
 ج: چاهک ۱، ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلونه ورا به مدت ۸ روز) با پرایمرهای EGF-R چاهک ۲، ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلونه ورا به مدت ۸ روز) با پرایمرهای اکتین.
 اندازه طول محصول برابر ۱۹۴ جفت باز و (M) مارکر ۵۰ جفت بازی اندازه DNA از شرکت فرمنتاز 3MO 373 و ژل آگارز ۱۰ درصد



شکل ۲: RT-PCR بر روی RNA استخراج شده از پوست موش و بررسی میزان بیان رسپتور ژن EGF در ناحیه ترمیم زخم پس از ۱۶ روز از ایجاد زخم:
 الف: چاهک ۱، ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش بدون زخم با پرایمرهای EGF-R چاهک ۲، ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش بدون زخم با پرایمرهای اکتین.
 ب: چاهک ۱، ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به مدت ۱۶ روز) با پرایمرهای EGF-R چاهک ۲، ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به مدت ۱۶ روز) با پرایمرهای اکتین.
 ج: چاهک ۱، ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلونه ورا به مدت ۱۶ روز) با پرایمرهای EGF-R چاهک ۲، ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلونه ورا به مدت ۱۶ روز) با پرایمرهای اکتین.
 اندازه طول محصول برابر ۱۹۴ جفت باز و (M) مارکر ۵۰ جفت بازی اندازه DNA از شرکت فرمنتاز 3MO 373 و ژل آگارز ۱۰ درصد



میزان تیمار در روز های مختلف

شکل ۳: مقایسه آماری میزان بیان رسپتور ژن EGF بین گروه های مختلفی تیماری در زمان های متفاوت است. Aloe تیمار با عصاره ژل آلوئه ورا، Sham: تیمار با سرم فیزیولوژیک. α مقایسه شده با گروه شم (کنترل کاذب) مربوط به همان روز ($p < 0.05$).

در بررسی میزان تغییرات سطح زخم و درصد بهبودی آن مشخص گردید که تیمار با ژل آلوئه ورا سبب کاهش در مساحت زخم ها در روز های مختلف شده، که این اختلاف در بین تیمار های روز های ۳ تا ۱۵ روز پس از ایجاد زخم بیشتر می باشد (جدول ۲).

بر اساس بررسی داده های موجود در جدول ۳ محاسبه تغییرات درصد ترمیم در زخم ها به انجام رسید و مشخص گردید که میزان این درصد در گروه های تیمار شده با آلوئه ورا نسبت به گروه شم مربوطه، بیش تر بوده است.

در خصوص میزان تغییرات پراکسیداسیون لیپید های غشایی در روز های ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم، نتایج موجود در جدول ۱ بیانگر میزان تغییرات MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها در روز های مختلف می باشد. بر اساس این نتایج مشخص گردید ایجاد زخم به تنهایی در گروه شم موجب افزایش معنی دار در میزان MDA سرم خون موش ها در روز های ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم ($P < 0.05$)، به ترتیب ۴۵/۷۵ و ۳۸/۰۶ درصد) گردید. در تیمار با ژل آلوئه ورا مشخص شد که در مقایسه با گروه شم در روز های ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم، از میزان MDA در سرم خون کاسته گردید.

جدول ۱: میزان تغییرات مالون دی آلدئید (MDA) سرم خون موش ها در ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم در روزها و تیمار های مختلف.

	مدت زمان تیمار (روز)		
	۰	۸	۱۶
Sham	۱۵/۲۱ ± ۰/۵۲	۲۲/۱۷ ± ۰/۵۳ (٪۴۵/۷۵) *	۲۱ ± ۰/۶۵ (٪۳۸/۰۶) *
Aloe vera gel	۱۵/۲۱ ± ۰/۵۲	۲۰/۱۲ ± ۰/۶۲ (٪۳۲/۲۸) *	۱۸/۰۱ ± ۰/۹۵ (٪۱۸/۴۰) * a

واحد اندازه گیری بر اساس $n \text{ moles MDA/mg protein}$ می باشد، هر داده نشانگر $Mean \pm SD$ است.

α مقایسه شده با گروه شم (کنترل کاذب) مربوط به همان روز ($p < 0.05$). *: مقایسه شده با روز صفر در هر تیمار ($p < 0.05$).

جدول ۲: تغییرات میزان مساحت زخم‌ها در روزها و تیمارهای مختلف

	مدت زمان تیمار (روز)							
	۱	۳	۵	۷	۹	۱۱	۱۳	۱۵
Sham	۶۳/۱۶	۵۵/۱۳	۴۶/۱۸	۳۱/۵۵	۲۰/۳۴	۱۷/۷۹	۸/۵۵	۳/۴۶
	±۲/۰۱	±۲/۱۱	±۲/۰۷	±۱/۵۱	±۲/۰۷	±۱/۹۹	±۱/۰۲	±۰/۷۸
Aloe vera gel	۶۳/۷۳	۴۴/۵۱	۳۱/۶۵	۲۱/۲۳	۱۳/۷۲	۷/۷۹	۳/۲۷	۱/۱۹
	±۱/۹۱	±۳/۴۱	±۱/۹۱	±۲/۱۷	±۱/۹۹	±۱/۷۸	±۰/۹۵	±۰/۰۹
		a	a	a	a	a	a	

واحد اندازه گیری میلی متر مربع و هر داده نشانگر $Mean \pm SD$ است.

! مقایسه شده با گروه شم (کنترول کاذب) مربوط به همان روز ($p < 0.05$).

جدول ۳: نشان دهنده تغییرات درصد ترمیم زخم‌ها در روزها و تیمارهای مختلف

	مدت زمان تیمار (روز)							
	۱	۳	۵	۷	۹	۱۱	۱۳	۱۵
sham	۰	۱۲/۷۲	۲۶/۸۸	۵۰/۰۷	۷۶/۸۰	۷۱/۸۳	۸۶/۴۶	۹۴/۵۲
Aloe vera gel	۰	۳۰/۱۶	۵۰/۳۳	۶۶/۷۰	۷۸/۴۷	۸۷/۷۸	۹۴/۸۷	۹۸/۱۳

بحث

به عنوان ترکیبات ضد زخم مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این میان آلونه‌ورا به عنوان یکی از گیاهان با سابقه بسیار طولانی در ترمیم زخم‌های پوستی و سوختگی‌ها مورد استفاده زیادی دارد.

در آخرین پژوهش‌ها مشخص شده که خوراندن قطعات ژل آلونه‌ورا به موش‌های رت دیابتی نوع ۲، باعث تسریع در ترمیم زخم‌های پوستی این جانوان شده به طوری که نتایج نشان داده که تیمار آلونه‌ورا باعث افزایش میزان بیان ژن‌های $TGF\beta 1$ و VEGF در ناحیه زخم پوست موش‌های رت موجب این تسریع شده است. در این مورد $TGF-\beta 1$ با تحریک فیبروبلاست‌ها موجبات بازسازی هر چه بهتر ماتریکس خارج سلولی محل زخم را فراهم آورده است (۱۶).

در همین ارتباط پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده که بتاسیتوسترول (β -sitosterol) به عنوان یکی از اجزا ژل آلونه ورا از طریق افزایش میزان بیان VEGF و رسپتور آن در محل زخم، موجب افزایش آنژیوژنز و ترمیم هر چه بهتر بافت‌های آسیب دیده شده است (۱۷).

در ارتباط با تحریک ماکروفاژها در بافت‌های آسیب دیده، آزمایشات *in vitro* نیز نشان داده که قند مانوز موجود در ترکیب آلونه ورا پس از اتصال به گیرنده مربوطه واقع بر سطح

روند ترمیم زخم یکی از پیچیده ترین فرآیندهای فیزیولوژیک بوده که طی آن سلول‌ها و ترشحات مختلف سلولی به ویژه فاکتورهای رشد و بسیاری از سیتوکین‌ها وارد عمل می‌شوند. به دنبال بروز آسیب به پوست، آبخاری از وقایع مولکولی و فعالیت‌های سلولی شامل التهاب، شکل‌گیری بافت جدید و بازآرایی‌های بافتی رخ داده و در نهایت منجر به ترمیم جزیی و کلی بافت آسیب دیده می‌شود.

با توجه به اهمیت ترمیم زخم و اینکه عدم درمان زخم‌های باز پوستی ممکن است منجر به عفونت موضعی و در نهایت سرطان شود و از دیگر سو درمان‌های موجود علاوه بر عدم اثربخشی بالا، می‌توانند عوارض جانبی سو نیز داشته باشند منجر به این شد که تحقیقاتی در این راستا همواره انجام گیرد. (۹ و ۱۰) از بهترین روش‌هایی که می‌توان ما را در رسیدن به هدف فوق یاری کند استفاده از مواد بیولوژیک است (۱۱)، که از آن جمله می‌توان به گیاه همیشه بهار کوهی، پیاز، برگ عشقه، یونجه پاکلاغی و ماهور اشاره کرد (۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵) از جمله این ترکیبات می‌توان به اثر تحریکی و التیام بخش بسیاری از عصاره‌های گیاهی اشاره نمود که به طور سنتی در جوامع مختلف بشری

برای اولین بار بوده که بررسی‌های مولکولی به روش RT-PCR بر روی میزان بیان ژن رسپتور EGF در تاثیر ژل آلوئه ورا بر محل زخم‌های پوستی در موش‌ها به انجام می‌رسد. خانواده EGF از پلاکت‌ها و ماکروفاژها در محل آسیب و زخم در بافت تولید و ترشح شده بعد از ترشح در روندهای تقسیم میتوز در بافت‌های مختلف، اپی تلیزاسیون، مهاجرت گلبول‌های سفید به محل زخم و تا حد کمتری در آنژیوژنز و افزایش ترشح رشته‌های کلاژن در محل زخم انجام می‌شوند (۱۹). با توجه به حضور گیرنده‌های EGF بر سطح کراتینوسایت‌ها، EGF با افزایش تکثیر سلولی در این گروه از سلول‌ها موجب بازسازی و افزایش ضخامت اپی تلیوم در طی روند ترمیم زخم می‌گردد. خلاصه آنکه، نتایج این مطالعه در کنار سایر نتایج نشان می‌دهد که در واقع اثر ژل گیاه آلوئه ورا در کوتاه سازی دوره ترمیم کامل در محل زخم‌ها می‌باشد.

پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) به عنوان یکی از فرآیندهای فیزیولوژیکی در غشا بسیاری از سلول‌های بدن جانوران معرفی می‌گردد. چنانچه میزان تولید و گسترش LPO به طور غیر طبیعی افزایش یابد، محصولات نهایی LPO با آسیب‌رسانی به ساختارهای بیوشیمیایی سلول‌ها و بافت‌های بدن موجب غیر فعال سازی و در نهایت در صورت عدم جلوگیری از گسترش تولید این محصولات، موجب مرگ سلولی خواهند شد. از جمله محصولات نهایی LPO در بافت‌های بدن جانوران به ویژه در سرم خون آنان ترکیب MDA بوده که به سرعت با پروتئین‌ها و نیز DNA واکنش داده و پیوندهای بیوشیمیایی در جهت غیر فعال سازی آنان، برقرار خواهد نمود. در برخورد با روند LPO و محصولات نهایی آن سیستم‌ها آنتی اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی وارد عمل شده و به این ترتیب با خنثی سازی ترکیبات رادیکالی ناشی از گسترش LPO در درون و برون سلول‌ها موجب جلوگیری از بروز آسیب‌های بافتی بیشتر خواهد شد (۲۴).

نتایج مطالعات مختلف نشان داده که ایجاد زخم در بافت‌های بدن جانوران منجر به افزایش میزان LPO و نیز MDA در بافت مورد نظر خواهد شد. چنانچه میزان LPO در محل زخم به میزان زیاد افزایش یابد منجر به کاهش روند ترمیم زخم خواهد گردید (۲۵).

در مطالعه به انجام رسیده توسط Rasal و همکاران (۲۶) نشان داده شد که ایجاد زخم در پوست موش‌های رت همراه با افزایش

ماکروفاژهای پوست موجب تحریک این سلول‌ها در جهت تولید سیتوکین‌ها و پیشبرد برخی از مراحل ترمیم زخم می‌شود. در همین ارتباط نام تجاری Acemenan به عنوان یک ترکیب درمان کننده برای مجموعه پلی ساکاریدهای غنی از مانوز در ژل آلوئه ورا در نظر گرفته شده است (۱۸).

Atiba و همکارانش (۱۶) نشان دادند که استفاده خوراکی از ژل آلوئه ورا موجب افزایش تولید TGF- β 1 و bFGF در ناحیه زخم پوست موش‌های رت که تحت تاثیر نوعی تشعشع قرار گرفته بودند، گردیده است. همچنین در تحقیقی دیگر مشخص گردید که استعمال پوستی ژل آلوئه ورا در محل زخم موش‌های رت موجب تسریع ترمیم و سرعت بخشیدن به جمع‌شدگی و انقباض محل زخم شده است. در این پژوهش معلوم گردید تیمار پوستی با آلوئه ورا موجب افزایش آنژیوژنز و افزایش بافت گرانوله و نیز آرایش هر چه بهتر رشته‌های کلاژن در محل زخم گردیده است (۱۹). استفاده از ژل آلوئه ورا در زخم‌های پوستی کوچک هندی منجر به ترمیم سریع‌تر زخم و بازآرایی بهتر رگ‌های خونی و بهبود خون‌رسانی در محل زخم‌ها شده است (۲۰). این نتایج در راستای نتایج تحقیق حاضر بوده و نشان دهنده اثر بخشی استفاده از موسیلاژ آلوئه ورا در مدیریت بهبود بسیاری از انواع زخم‌های پوستی در مدل‌های جانوری مختلف است.

از سوی دیگر تسریع کننده‌های ترمیم زخم نظیر ویتامین C، ویتامین E و برخی اسید آمینه‌ها و عنصر روی در ژل آلوئه ورا وجود داشته که کاربرد این موسیلاژ را بیشتر از پیش مد نظر محققان قرار داده است. در این خصوص آزمایشات نشان داده که ویتامین C با افزایش تولید کلاژن و جلوگیری از تجزیه این رشته‌ها و ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در روند ترمیم زخم وارد می‌شود (۲۱).

از جمله خواص دیگر آلوئه ورا که موجب پیش‌برد فرآیند ترمیم زخم می‌گردد، اثرات ضد باکتریایی ژل آن بوده که با پاک‌سازی عفونت و کاهش بار میکروبی محل، در ترمیم زخم نقش مهمی را بر عهده دارد (۲۲). موسیلاژ آلوئه ورا واجد سیستم‌های آنزیمی آنتی اکسیدانی نظیر گلوکوتانیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بوده که از طریق خنثی سازی تاثیر رادیکال‌های آزاد تولید شده در محل زخم و با خاصیت ضد التهابی خود موجب تسریع در روند ترمیم زخم می‌گردند (۲۳).

با بررسی منابع علمی مختلف مشخص شده که در پژوهش حاضر

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نتایج نشان می دهد که در واقع اثر موسیلاژ گیاه آلوئه ورا در کوتاه سازی دوره ترمیم کامل در محل زخم ها می باشد. مطالعات مولکولی در تحقیق حاضر نشان دهنده تاثیر مثبت این موسیلاژ بر بیان ژن رسپتور EGF و بررسی های مربوط به درصد بهبودی زخم نیز نشان دهنده تاثیر مثبت ژل آلوئه ورا در روند ترمیم زخم می باشد.

خلاصه این که ژل آلوئه ورا قادر به القا بیان ژن فاکتورهای رشد در پوست آسیب دیده جانوران بوده و بدین ترتیب توان ایفای یک نقش محوری در پروسه ترمیم زخم را خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین محترم تحصیلات تکمیلی و پژوهشی دانشگاه شهرکرد به جهت تامین بودجه لازم تحقیقاتی و از پرسنل آزمایشگاه های فیزیولوژی و ژنتیک به جهت همکاری بی دریغ شان در کمک به اجرای این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Stoscheck CM, Nanney LB, King JR. Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing. *J. Invest Dermatol.* 1992; 100: 645-649.
2. Wenczak BA, Lyanch JB, Nanney LB. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *J. Clin Invest.* 1992; 90 (192): 2392-2401.
3. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *J. Sci.* 1998; 241: 708-712.
4. Mareikovsky M, Vogt P, Eriksson E, Rubin JS, et al. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *J. Invest Dermatol.* 1996; 106: 612-621.
5. Ono I, Gunji H, Zhang JZ, Maruyama K, et al. Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid. *J. Derm. Sci.* 1995; 10: 241-245.
6. Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme

میزان LPO و MDA در سرم خون این جانوران بوده که از تیمار خوراکی با عصاره برگ گیاه *Morinda citrifolia* به طور معنی داری از میزان MDA سرم خون کاسته شد. این محققین پیشنهاد نمودند که مجموعه عوامل آنتی اکسیدانی نظیر ویتامین C، بتا کاروتن و فلاونوئیدهای موجود در برگ این گیاه موجب خنثی سازی و حذف رادیکال های لیپیدی و در نهایت MDA از ترکیب سرم خون موش های رت می شود.

در برخی از مطالعات نیز فاکتورهای رشد به عنوان آنتی اکسیدان در محل زخم معرفی شده اند. در این ارتباط Coskun و همکاران (۲۷) نشان دادند که چنانچه EGF در محل زخم های دهان در جانوری مثل خرگوش تزریق گردد، به طور معنی داری از میزان LPO در محل ضایعه بافتی کاسته خواهد شد. در این جا EGF به عنوان یک خنثی کننده رادیکال های اکسیژن مطرح شده است.

در پژوهش حاضر نشان داده شد که ایجاد زخم های پوستی در موش های نژاد balb/c موجب افزایش معنی دار MDA و یا به عبارت دیگر گسترش LPO در سرم خون این جانوران می گردد. در این ارتباط تیمار با آلوئه ورا موجب کاهش معنی دار در غلظت MDA سرم خون موش های زخمی گردید. در این ارتباط نمی توان به صورت قاطع و مشخص اظهار نمود که مکانیسم کاهش دهنده میزان LPO در سرم خون جانوران تیمار شده با آلوئه ورا چیست؟ با این حال می توان پیشنهاد نمود که احتمالاً یک یا چند جز از ساختار آلوئه ورا پس از ورود به گردش عمومی خون بدن موجب تقویت تولید و ترشح سیستم های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی از سوی بافت های مجاور به محل زخم به درون گردش خون شده اند. لذا کارهای تحقیقاتی تکمیلی جهت روشن سازی مکانیسم دقیق کاهش میزان LPO به دنبال تیمار با آلوئه ورا در سرم خون جانوران مورد آزمایش مود نیاز می باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده که حاصل از مطالعه ماکروسکوپی درصد بهبودی زخم بر حسب تغییرات مساحت در روزهای مختلف نسبت به روز صفر هستند مشخص گردید که درصد بهبودی زخم در گروه های تیمار با آلوئه ورا در مقایسه با گروه شم افزایش معنی داری داشته، به طوری که درصد بهبودی زخم در روزهای ۱۱ تا ۱۵ پس از ایجاد زخم اختلاف معنی دارتری نشان داده است.

- systems. Appl Microbiol Biotechno. 2008; 79(2): 165-178.
7. Eshun K, He Q. Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries, a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2004; 44(2): 91-96.
8. Boudreau MD, Beland FA. An evaluation of the biological and toxicological properties of Aloe Barbadensis (Miller), Aloe vera. J. Environ. Sci. Health C. 2006; 24: 103-154.
9. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation methods. Enzymol 1978; 52: 302-310.
10. Khaksari M, Rezvani ME, Sajadi MA, Soleimani A. [The effect of topically applied water extract of *Rhazya stricta* on cutaneous wound healing in rats]. J. Semnan university med. Sci. 2000; 1(3): 1-10. Persion
11. Isler H, Bauen A, Hubler M. Morphometric assessment of wound healing in rats treated with a protein-free hemodilysis. J. Burns. 1991; 17: 99-103.
12. Moniee SH. Giahdarou. Tehran, Iran: Ketabsara press. 1981; 75.
13. Moatar F, Samsam Sharif H, Afshari pour S. Darmanbagiah. Esfahan, Iran: Mashal press; 1989; 63-66.
14. Asadbegy M, Mirazi N, Vatanchian M. Comparative study of *Lotus corniculatus* L. hydroethanolic extract and phenytoin ointment effects on rat skin wound healing: morphometrical and histopathological studies. J. Cell Tissue. 2011; 2(3): 312-323.
15. Nabiuni M, Oryan SH, Ayyobipor M, Bagheri M. Histochemical study of *Verbascum speciocum* extract's effects on the wound healing in rats. J. Cell Tissue 2011; 2(1): 67-75.
16. Atiba A, Ueno H, Uzuka Y. The Effect of Aloe Vera Oral Administration on Cutaneous Wound Healing in Type 2 Diabetic Rats. Surg. J. Vet Med. Sci. 2011; 73(5): 583-589.
17. Moon E J, Lee YM, Lee OH, Lee MJ, et al. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: β -sitosterol, a plant sterol. Angiogenesis. 1999; 3: 117-123.
18. Liu C, Leung MY, Koon JC, Zhu LF, et al. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from Aloe vera L var *hinensis* (Haw) Berg. J. Immunopharmacol. 2006; 6: 1634-1641.
19. Oryan A, Naimi A. Effect of aqueous extract of aloe vera cutaneous wound healing in rat. Veterinary sky archiv. 2010; 80 (4): 509-522.
20. Rodriguez MB, Cruz N. Comparative evaluation of aloe vera in the management of burn wounds in guinea pigs. Plast Reconstr. Surg. 1988; 81(3): 386-389.
21. Davis RH, Leitner MG, Russo JM, Maro NP. Biological activity of Aloe vera. Med. Sci. 1987; 73(5): 583-589.
22. Lorenzetti LJ, Salisbury R, Beal JL, Baldwin JN. Bacteriostatic property of aloe vera. J. Pharmaceutical Sci. 1964; 53: 1287-1290.
23. Hajhashemi V, Ghannadi A, Heidari AH. Anti-inflammatory and wound healing activities of Aloe littoralis in rats. Pharmaceutical Sci. 2012; 7(2): 1-6.
24. Pierce GF, Vande Berg J, Rudolph R, Tarpley J, et al. Platelet-derived growth factor BB and transforming growth factor-beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds: Am. J. Pathol. 1991; 138 (3): 629-646.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 1984; 219(1): 1-14.
26. Rasal V, Arulmozhi S, Purnima A, Sridhar Y. Wound healing and antioxidant activities of *Morinda Citifolia* Leaf Extract in Rat. Iranian J. pharmacol. Therap. 2008; 7: 49-52.
27. Coskun S, Gulec EG, Balabanli B, Acarturk F. Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing. a time-course study. Surg. Today 2007; 37 (7): 570-574.

Inducing Effect of Aloe Vera Gel Extract on Epithelial Growth Factor Receptor Gene Expression in Cutaneous Wounds of Male Mice *Balb/c*

Najafi N, M.Sc., Arabi M, Ph.D. *, Jafarzadeh H, M.Sc.

- Division of Animal Physiology, Department of Biology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

* Email corresponding author: mehranarabi@hotmail.com

Received: 18 May 2013

Accepted: 20 August. 2014

Abstract

Aim: Present study was done to assess the effects of Av gel on some molecular aspects in wound healing process of mouse damaged skin.

Material and Methods: 36 Male mice *balb/c* were used. Animals were divided into 3 groups; negative control (without wound), sham-operated (wound treated with physiological serum) and experimental (wound treated with Av gel extract). In each group, two equal full-thickness wounds were made on the mice back sides. Experimental group received daily a dose of Av gel extract on the top of wound sites (without bandage) for a period of 16 days. On 8th and 16th post wounding day, for the purpose of EGF receptor gene expression evaluation and lipid peroxidation (LPO), skin and blood serum sampling were done respectively and data were analyzed by Repeated measures ANOVA at significant level $p < 0.05$

Results: Av gel extract treatments increased EGF receptor gene expression in the wound area. Wound healing percentage was also increased in experimental groups compared to sham group. It was also found that the amount of LPO end-product in blood sera was reduced to Av treated mice in the end of test.

Conclusion: Av gel extract can induce EGF receptor gene expression in mice damaged skin, and play a pivotal role in wound healing process.

Keywords: Aloe vera gel extract, Wound healing, EGF receptor gene, Lipid peroxidation