Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ۶۱-۵۳

اثر القا کنندگی ژل آلوئه ورا بر بیان ژن رسپتور فاکتور رشد اپی‌تلیالی در زخم‌های پوستی موش‌های نر *Balb/c*

نرگس نجفی .M.Sc ، مهران 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 دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۹

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 روش‌ها: در این مطالعه تجربی۳۶ سر موش نر سوری *Balb/c* استفاده گردیدند. موش‌ها 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 موش‌ها دو زخم یکسان با برداشت کامل پوست ایجاد گردید. در گروه تجربی، روزانه یک بار مقدار ۲ گرم از ژل آلوئه ورا به‌صورت یک لایه نازک بر روی سطح زخم‌ها (بدون بانداژ) 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)، به‌ترتیب از پوست و سرم خون موش‌ها نمونه‌برداری شد و از روش آماری Repeated measures ANOVA با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ استفاده گردید.

نتایج: عصاره ژل آلوئه ورا سبب افزایش بیان ژن رسپتور EGF در زخم پوستی گردید. درصد بهبودی زخم‌های گروه تجربی افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شم نشان داد. تیمار با آلوئه ورا به‌طور معنی‌داری موجب کاهش محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها در سرم خون موش‌ها گردید.

نتیجه گیری: عصاره ژل آلوئه ورا قادر به القا بیان ژن رسپتورEGF در پوست آسیب دیده موش‌ها شده و قادر به ایفای یک نقش محوری در فرآیند ترمیم زخم می‌باشد.

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ترمیم زخم پوستی روند پیچیده‌ای است که در پاسخ به زخم شروع شده و تا اصلاح بافت آسیب دیده ادامه می‌یابد. این فرآیند به‌وسیله 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 به‌دنبال آن، بافت اپی‌تلیالی باز آرایی می‌گردد. فاکتورهای رشد، پروتیین‌هایی با وزن مولکولی زیاد بوده که توسط بسیاری از سلول‌ها تولید شده و به‌محض ترشح با عمل‌کردهای اتوکراین و پاراکراین می‌توانند آبشاری ار فرآیندهای سلولی را آغاز کنند. رسپتورهای فاکتورهای رشد گلیکوپروتیین‌هایی 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 عمل‌کرد خود، به رسپتورهایی از همین خانواده متصل شده و به‌دنبال آن با اثر بر خانواده پروتیین 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 و۳) 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 به‌دنبال آن باعث بازسازی اپی‌تلیوم می‌شود (۴ و ۵).

آلوئه‌ورا یا صبر زرد گیاهی از سرده سِگِل‌ها (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 گلیکوپروتیین‌ها 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 به‌نام گلومانان که غنی از پلی‌ساکاریدهای مانند مانوز است، می‌باشد. گلومانان 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 وروش‌ها

در این مطالعه تجربی۳۶ سر موش نر سوری نژاد Balb/c در محدوده وزنی ۲±۲۲ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها در سه گروه کنترول 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 ۲± ۲۲ 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 به‌کمک ترکیب دارویی شامل کتامین، زایلازین، آسپارامازین و دیازپام بی‌هوش شده و بر روی پشت هر موش دو زخم مساوی به قطر ۲ ± ۱۰ 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 (به‌کمک RT-PCR) و نیز محتوی پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) با اندازه‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

میزان تغییرات مالون دی آلدیید (MDA)، به‌ترتیب از پوست و سرم خون موش‌ها نمونه‌برداری‌های لازم به‌عمل آمد. همچنین در طول دوره‌های تیمار به‌صورت یک روز در میان میزان درصد بهبودی زخم‌ها در گروه‌های مختلف محاسبه گردید.

در این مطالعه به‌منظور 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 سینا کلون) 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. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه دقیقه، و دناتوراسیون 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 باند۱۹۴ جفت باز استفاده گردید.

F-EGFR: 5-CGAATAATCATCCAGGAGAG-3

R-EGFR: 5-GTCTGTTAAGTAGTCAATCGTG-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. به‌منظور بررسی میزان بیان ژن مورد نظر از نرم افزار UV-TEACH استفاده گردید. این نرم افزار پس از شناسایی باند ها به ارزشیابی شدت باندها پرداخته و میزان شدت باند را به‌کمک یک عدد مشخص می‌سازد.

در بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)، تغییرات میزان مالون دی آلدیید (MDA) به‌عنوان محصول نهایی این روند، به‌کمک روش پیشنهادی توسط Buege & Aust (1978) مورد سنجش قرار گرفت (۹). در ابتدا نمونه‌های سرم خون اخذ شده از موش‌ها به‌کمک محلول ۱۰ درصد TCA سرد (۱:۳)، رقیق گردیده و به کمک دستگاه ورتکس به‌مدت دو دقیقه به‌خوبی مخلوط شدند. در مرحله بعد به‌مدت یک دقیقه سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰×g مورد استفاده قرار گرفت. سوپرناتنت حاصله به نسبت ۱:۱ با محلول یک درصد TBA رقیق گردید. مجموعه به‌دست 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 به‌کمک روش اسپکتروفتومتری، 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 دیجیتال قطر هر زخم بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به این که زخم‌های ایجاد شده مدور و با قطر اولیه ۱۰±۲ 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:

۱۰۰× (مساحت زخم در روز X ÷ مساحت زخم در روز صفر) = درصد مساحت زخم در یک روز مشخص

درصد مساحت زخم - ۱۰۰ = درصد ترمیم زخم در یک روز مشخص

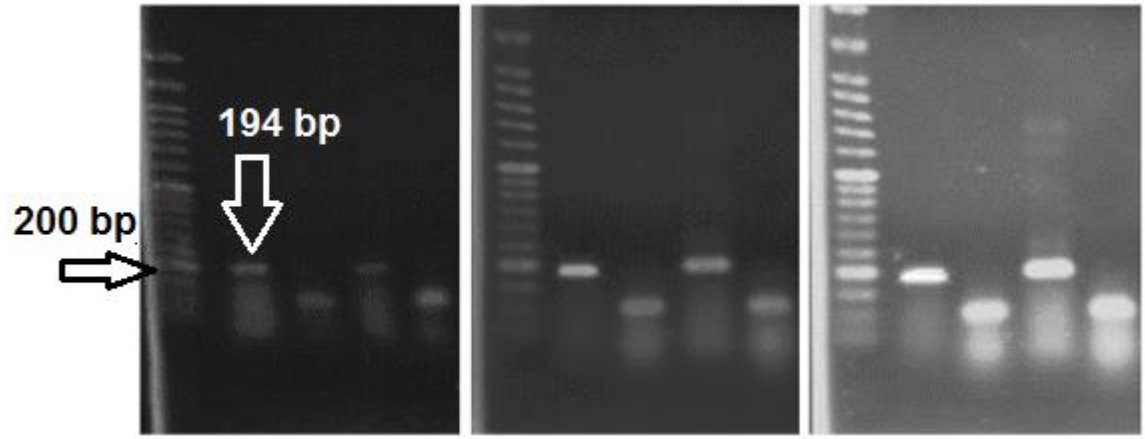
در این پژوهش تمامی داده‌ها به‌صورت Means±Standard Deviation (SD) نمایش داده شده‌اند. جهت مقایسه میانگین داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measures ANOVA) در نرم افزار، SPSS (ویراست ۱۶) استفاده گردید. سطح $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی‌های مولکولی نشان داد که تیمار آلوئه ورا در دو دوره زمانی ۸ و ۱۶ روزه و در مقایسه با گروه شم و کنترول منفی، افزایش معنی‌داری را در میزان بیان ژن رسپتور EGF باعث گردیده است ($p<۰/۰۵$)(شکل های۱،۲ و۳).

www.SID.ir

Archive of SID



الف ب ج

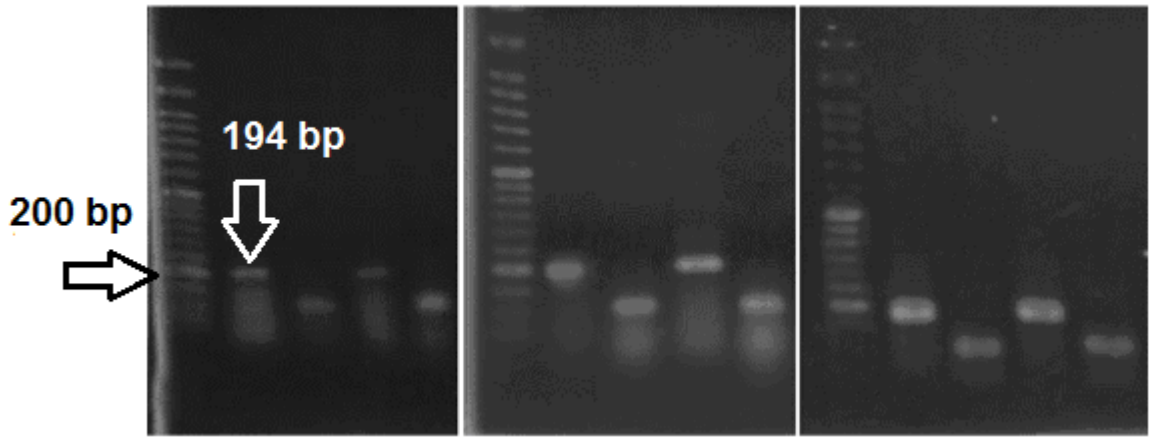
شکل ۱: RT-PCR بر روی RNA/استخراج شده از پوست موش و بررسی میزان بیان ژن رسپتور EGF در ناحیه ترمیم زخم پس از ۸ روز از ایجاد زخم:

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: چاهک۳، ۱: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به مدت ۸ روز) باپرایمرهای EGF –R چاهک ۲،۴: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به‌مدت ۸ روز) با پرایمرهای اکتین

ج: چاهک۳،۱: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلوئه ورا به‌مدت ۸ روز) با پرایمر های EGF -R چاهک ۲، ۴، ۶ و ۸ : محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلوئه ورا به‌مدت 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



الف ب ج

شکل۲: 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.

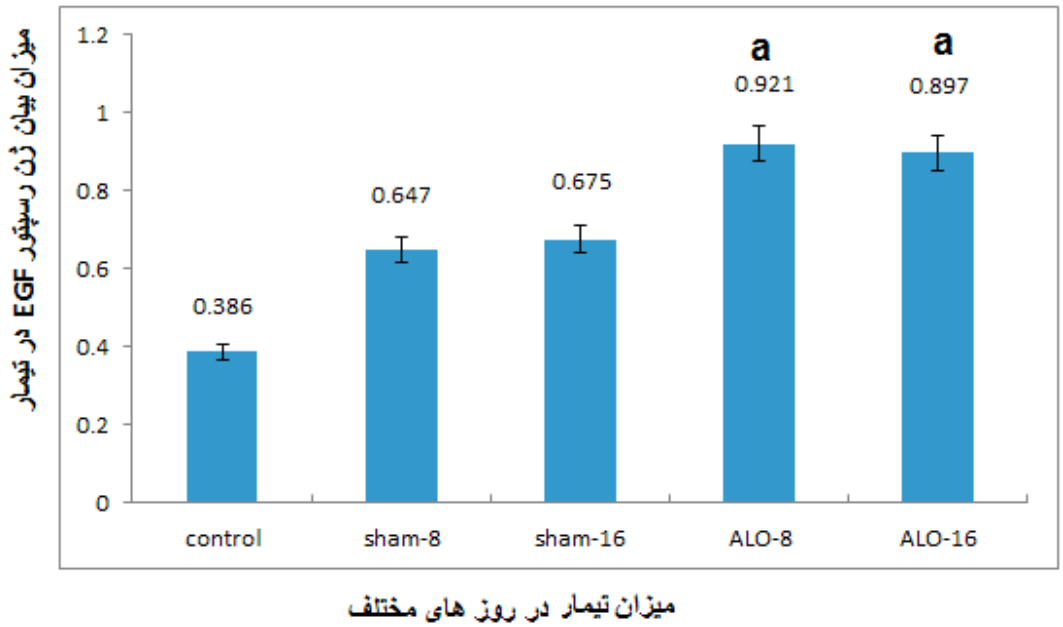
ب: چاهک۳،۱: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به‌مدت ۱۶روز) با پرایمرهای EGF –R چاهک ۲،۴: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با سرم فیزیولوژیک به مدت ۱۶ روز) با پرایمرهای اکتین

ج: چاهک۳،۱: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلوئه ورا به مدت ۱۶روز) با پرایمرهای EGF -R چاهک ۲، ۴، ۶ و ۸: محصول RT-PCR/از RNA/استخراج شده از پوست موش (تیمار شده با ژل آلوئه 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 وژل آگارز۱۰ درصد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳: مقایسه آماری میزان بیان رسپتور ژن EGF بین گروه‌های مختلف تیماری در زمان‌های متفاوت است. Aloe: تیمار با عصاره ژل آلوئه ورا، Sham: تیمار با سرم فیزیولوژیک. a: مقایسه شده با گروه شم (کنترل کاذب) مربوط به همان روز ($p < ۰/۰۵$) .

در خصوص میزان تغییرات پرکسیداسیون لیپیدهای غشایی در روزهای ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم، نتایج موجود در جدول۱ بیانگر میزان تغییرات MDA به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها در روزهای مختلف می‌باشد. براساس این نتایج مشخص گردید ایجاد زخم به تنهایی در گروه شم موجب افزایش معنی‌دار در میزان MDA سرم خون موش‌ها در روزهای ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم ($P<۰/۰۵$، به‌ترتیب ۴۵/۷۵ و ۳۸/۰۶ درصد) گردید. در تیمار با ژل آلوئه ورا مشخص شد که در مقایسه با گروه شم در روزهای ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم، از میزان MDA در سرم خون کاسته گردید.

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

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

جدول ۱: میزان تغییرات مالون دی‌آلدئید (MDA) سرم خون موش ها در ۸ و ۱۶ روز پس از ایجاد زخم در روزها و تیمارهای 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 اندازه‌گیری بر اساس n moles MDA/mg protein می‌باشد، هرداده نشانگر Means±SD است.

*a: مقایسه شده با گروه شم (کنترل کاذب) مربوط به همان روز ($p < ۰/۰۵$). *: مقایسه شده با روز صفر در هر تیمار ($p < ۰/۰۵$).*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲: 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 میلی‌متر مربع و هر داده نشانگر Mean±SD است.

a: مقایسه شده با گروه شم (کنترول کاذب) مربوط به همان روز ($p < ۰/۰۵$) .

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

روند ترمیم زخم یکی از پیچیده‌ترین فرآیندهای فیزیولوژیک بوده که طی آن سلول‌ها و ترشحات مختلف سلولی به‌ویژه فاکتورهای رشد و بسیاری از سیتوکین‌ها وارد عمل می‌شوند. به‌دنبال بروز آسیب به پوست، آبشاری از وقایع مولکولی و فعالیت‌های سلولی شامل التهاب، شکل‌گیری بافت جدید و بازاراییی‌های 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 آن‌جمله 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 به‌طور سنتی در جوامع مختلف بشری به‌عنوان ترکیبات ضد زخم مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این میان آلوئه‌ورا به‌عنوان 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 آلوئه‌ورا به موش‌های رت دیابتی نوع ۲، باعث تسریع در ترمیم زخم‌های پوستی این جانوان شده به‌طوری‌که نتایج نشان داده که تیمار آلوئه‌ورا باعث افزایش میزان بیان ژن‌های TGFβ1 و VEGF در ناحیه زخم پوست موش‌های رت موجب این تسریع شده است. در این مورد TGF-β1 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) به‌عنوان یکی از اجزا ژل آلوئه 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 آسیب‌دیده، آزمایشات *in vitro* نیز نشان داده که قند مانوز موجود در ترکیب آلوئه ورا پس از اتصال به گیرنده مربوطه واقع بر سطح

www.SID.ir

Archive of SID

ماکروفاژهای پوست موجب تحریک این سلول‌ها در جهت تولید سیتوکین‌ها و پیشبرد برخی از مراحل ترمیم زخم می‌شود. در همین ارتباط نام تجاری Acemenan به‌عنوان 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-β1 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 موش های 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 آلوئه‌ورا در زخم‌های پوستی خوکچه هندی منجر به ترمیم سریع‌تر زخم و بازآرایی بهتر رگ‌های خونی و بهبود خون رسانی 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، ویتامینE و برخی اسید آمینه‌ها و عنصر روی در ژل آلوئه‌ورا 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 به‌عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در روند ترمیم زخم وارد می شود (۲۱).

از جمله خواص دیگر آلوئه‌ورا 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 آلوئه‌ورا واجد سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون 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 برای اولین بار بوده که بررسی‌های مولکولی به‌روش RT-PCR بر روی میزان بیان ژن رسپتور EGF در تاثیر ژل آلوئه‌ورا بر محل زخم‌های پوستی در موش‌ها به انجام می‌رسد. خانواده EGF ازپلاکت‌ها و ماکروفاژها در محل آسیب و زخم در بافت تولید و ترشح شده بعد از ترشح در روندهای تقسیم میتوز در بافت‌های مختلف، اپی‌تلیزاسیون، 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 اپی‌تلیوم در طی روند ترمیم زخم می‌گردد. خلاصه آنکه، نتایج این مطالعه در کنار سایر نتایج نشان می‌دهد که در واقع اثر ژل گیاه آلوئه‌ورا در کوتاه سازی دوره ترمیم کامل در محل زخم‌ها می‌باشد.

پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) به‌عنوان یکی از فرآیندهای فیزیولوژیکی در غشا بسیاری از سلول‌های بدن جانوران معرفی می‌گردد. چنانچه میزان تولید و گسترش LPO به‌طور غیر طبیعی افزایش یابد، محصولات نهایی LPO با آسیب‌رسانی به ساختارهای بیوشیمیایی سلول‌ها و بافت‌های بدن موجب غیر فعال‌سازی 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 به‌ویژه در سرم خون آنان ترکیب MDA بوده که به‌سرعت با پروتیین‌ها 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 غیرآنزیمی 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 به‌میزان 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 درپوست موش‌های رت همراه با افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

میزان LPO و MDA در سرم خون این جانوران بوده که از تیمار خوراکی با عصاره برگ گیاه *Morinda citrifolia* به‌طور معنی‌داری از میزان MDA سرم خون کاسته شد. این محققین پیشنهاد نمودند که مجموعه عوامل آنتی اکسیدانی نظیر ویتامین C، بتا کاروتن و فلاونوییدهای موجود در برگ این گیاه موجب خنثی سازی و حذف رادیکال‌های لیپیدی و در نهایت MDA از ترکیب سرم خون موش‌های رت می‌شود.

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

در پژوهش حاضر نشان داده شد که ایجاد زخم‌های پوستی در موش‌های نژاد balb/c موجب افزیش معنی‌دار MDA و یا به‌عبارت 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 موش‌های زخمی گردید. در این ارتباط نمی‌توان به‌صورت قاطع و مشخص اظهار نمود که مکانیسم کاهش دهنده میزان LPO در سرم خون جانوران تیمار شده با آلوئه‌ورا چیست؟ با این‌حال می‌توان پیشنهاد نمود که احتمالا یک یا چند جز از ساختار آلوئه ورا پس از ورود به گردش عمومی خون بدن موجب تقویت تولید و ترشح سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی از سوی بافت‌های مجاور به‌محل زخم به‌درون گردش خون شده‌اند. لذا کارهای تحقیقایت تکمیلی جهت روشن‌سازی مکانیسم دقیق کاهش میزان LPO به دنبال تیمار با آلوئه‌ورا در سرم خون جانوران مورد آزمایش مود نیاز می‌باشد.

بر اساس نتایج به‌دست 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 گروه‌های تیمار با آلوئه‌ورا در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری داشته، به‌طوری‌که درصد بهبودی زخم در روزهای ۱۱ تا ۱۵ پس از ایجاد زخم اختلاف معنی‌دارتری نشان داده است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نتایج نشان می‌دهد که در واقع اثر موسیلاژ گیاه آلوئه‌ورا در کوتاه سازی دوره ترمیم کامل در محل زخم‌ها می‌باشد. مطالعات مولکولی در تحقیق حاضر نشان دهنده تاثیر مثبت این موسیلاژ بر بیان ژن رسپتورEGF و بررسی‌های مربوط به درصد بهبودی زخم نیز نشان دهنده تاثیر مثبت ژل آلوئه ورا در روند ترمیم زخم می‌باشد.

خلاصه این که ژل آلوئه‌ورا 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 به‌جهت تامین بودجه لازم تحقیقاتی و از پرسنل آزمایشگاه‌های فیزیولوژی و ژنتیک به‌جهت همکاری بی‌دریغ‌شان در کمک به اجرای این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Stoscheck CM, Nanney LB, King JR. Quantitative determinationof EGF-R during epidermal wound healing. J. Invest Dermato. 1992; l99: 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 macrophagesexpress TGF-alpha 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-likegrowth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growthfactor-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 oncytokines 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

www.SID.ir

Archive of SID

systems. Appl Microbiol Biotechno. 2008; 79(2): 165-178.

7. Eshun K, He Q. Aloe vera: a Val uable ingredient for the food, pharmaceutcal 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 Rhazyastricta on cutaneous wound healing in rats]. J. Semnan university med. Sci. 2000; 1(3): 1-10. Persion

11. Isler H, Bauen A, HublerM. Morphometric assessment of wound healing in rats treated with a pritein-free hemodylisis. 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. Esfehan, 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 Cuta neous Wound Healing in Type 2 Diabetic Rats. Surg. J.Vet Med. Sci. 201١; 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. Macro phage activation by polysaccharidebiological response modifier isolated from Aloe vera L var hinensis (Haw) Berg. J. Immunopharmacol. 2006; 6: 1634–1641.

19. Oryan A, Naimi A. Effect of aqueuse 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-drived growth factor BB and transforming growth factor-beta 1selectivly modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in ecisional 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2014; 5(1): 53-61

Original Article

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 8^{th} and 16^{th} 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

www.SID.ir