Archive of SID

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، صفحه ۶۱۹-۶۱۱ (۱۳۹۵)

بررسی اثر موضعی اسانس آویشن (*Thymus vulgaris* L.) بر التیام زخم جلدی نوع برشی عفونی شده با *Candida albicans* در موش آزمایشگاهی سفید بزرگ (مطالعه هیستوپاتولوژیکی)

آروین رحمانپور[1*]، مهران نصیری[2] و محمدرضا فرهپور[3]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

پست الکترونیک: rahmanpour_arvin@yahoo.com

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۴

چکیده

عفونت‌های زخم ناشی از *Candida albicans* در سال‌های اخیر رشد چشمگیری داشته است. عدم دسترسی آسان، گران بودن داروها، عوارض جانبی ناشی از آنها و به‌ویژه توسعه مقاومت دارویی، سبب شد تا استفاده از مواد بیولوژیک به‌عنوان راه‌حل‌های جایگزین مطرح گردد. یکی از این مواد بیولوژیک که از دیرباز خواص ضدمیکروبی آن به اثبات رسیده است، گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) می‌باشد. مطالعه اخیر به‌منظور بررسی اثر موضعی اسانس آویشن بر التیام زخم جلدی نوع برشی عفونی شده با *Candida albicans* در موش آزمایشگاهی سفید بزرگ انجام شد. در این مطالعه که بر روی ۳۶ موش آزمایشگاهی سفید بزرگ نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۰±۲۱۰ گرم انجام شد، پس از بیهوشی عمومی و ایجاد یک زخم مربع شکل با ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ سانتی‌متر در محل بین دو کتف، به‌وسیله ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمر *Candida albicans* بلافاصله به محل زخم اعمال شد. سپس موش‌های آزمایشگاهی سفید بزرگ آزمایش در سه گروه ۱۲تایی (شاهد، پماد ۳٪ و پماد ۱/۵٪) به‌طور تصادفی توزیع و هر گروه خود به ۴ زیرگروه ۳تایی (گروه‌های نمونه‌برداری در روزهای مختلف) تقسیم گردید. در طول اجرای طرح، در پایان روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ از زخم‌های گروه‌های مختلف، به‌منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و شمارش مخمر، به‌وسیله پانچ مخصوص بیوپسی، نمونه گرفته شد. براساس نتایج بدست‌آمده از این مطالعه، اختلاف معنی‌داری از نظر تأثیر پماد ۳٪ و ۱/۵٪ در کاهش تعداد مخمر *Candida albicans* دیده نشد، ولی این اختلاف در مقایسه با گروه شاهد به‌طور محسوسی معنی‌دار بود ($P<0/001$). همچنین مطالعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که از نظر کاهش عروق خونی، کاهش حضور سلول‌های چند هسته‌ای، افزایش سلول‌های فیبروبلاست و افزایش تعداد ماکروفاژها، هر دو پماد در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بهتر عمل کرده‌اند. در مجموع، با توجه به اینکه پماد ۳٪ در بیشتر موارد با پماد ۱/۵٪ عملکرد مشابه داشته و در سایر موارد نسبت به هر دو گروه بهتر عمل کرده است، پماد ۳٪ می‌تواند انتخاب بهتری برای استعمال موضعی در روند التیام و کاهش عفونت *Candida albicans* در محل زخم در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن، *Candida albicans*، التیام زخم، موش آزمایشگاهی سفید بزرگ.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از عارضه‌هایی که بیشتر کشورهای در حال توسعه با آن مواجه هستند، عفونت زخم‌های پوستی می‌باشد. برآوردهای کنونی نشان می‌دهد که نزدیک به ۶ میلیون نفر از زخم‌های مزمن در سراسر جهان رنج می‌برند (Kumar *et al.*, 2006). طب سنتی ایران تاریخی بیش از ۳۰۰۰ سال دارد و قبل از طب مدون در بین مردم مرسوم بوده و با عقاید و باور مردم عجین شده است (Naseri, 2004). شرایط بهداشتی ضعیف در برخی از کشورهای جهان سوم، علت اصلی این مشکل است. یکی از عفونت‌های شایع در زخم‌ها، آلودگی آنها با *Candida albicans* می‌باشد (Isibor *et al.*, 2008). این قارچ در پوست و سطوح مخاطی دهان، واژن و دستگاه گوارش تکثیر می‌گردد و با توجه به ماهیت نقص میزبان تحت تأثیر، قادر است انواع عفونت‌ها را ایجاد کند. انتشار بیماری‌های انسانی ناشی از این ارگانیسم که به‌طور پیوسته در سال‌های اخیر افزایش یافته است، منجر به استفاده وسیعی از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده شده است (Murray *et al.*, 2008؛ Sullivan *et al.*, 2004). عفونت‌های ناشی از *Candida albicans* همچنین یک مشکل جدی برای بیماران دچار سوختگی، بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های مختلف و افراد مبتلا به نقص ایمنی می‌باشد (Agarwal *et al.*, 2010). آزول و مشتقات آن فلوکونازول به‌دلیل ویژگی مهارکنندگی فعالیت قارچی در کاهش میزان عفونت‌های کاندیدیاز، در هر دو شکل موضعی یا دهانی برای درمان استفاده می‌شوند (Agarwal *et al.*, 2010). یکی از گیاهانی که برخی خواص دارویی آن به اثبات رسیده‌است، اسانس گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) می‌باشد که یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی از تیره نعنا است که به‌دلیل دارا بودن مقادیر فراوانی از تیمول (Thymol)، کارواکرول (Carvacrol)، ترکیب‌های فنول و ترپنوئیدی (Phenol/Terpenoid) خاصیت شدید ضدباکتریایی و ضدقارچی دارد (Zargari, 1995؛ Conforti *et al.*, 2008). از این‌رو، در این مطالعات اثرات ضدقارچی اسانس آویشن بر عفونت‌های جلدی *Candida albicans* در شرایط آزمایش بر روی نمونه موجود زنده به شکل آسیب‌شناختی مورد مطالعه قرار گرفته است. عدم دسترسی آسان و گران بودن داروها، اثرات جانبی و به‌ویژه توسعه مقاومت دارویی منجر به استفاده از مواد بیولوژیکی به‌عنوان راه‌حل‌های جایگزین شده است. در تحقیقات اخیر نشان داده شده‌است که گیاهان و ترکیب‌هایی که از گیاهان مشتق شده‌اند می‌توانند راه‌حل‌های مناسبی برای درمان بیماری‌های عفونی مقاوم، جلوگیری از اثرات جانبی و به‌ویژه توسعه مقاومت دارویی باشند (Raja *et al.*, 2011). از این‌رو، این مطالعه با هدف بررسی اثرات درمانی گیاه آویشن بر درمان زخم‌های عفونی انجام شده‌است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی اسانس گیاه

برگ‌های تازه گیاه آویشن در خردادماه سال ۱۳۹۲ از باغ گیاهان دارویی شهرداری ارومیه جمع‌آوری و شستشو شده و پس از تأیید دانشکده علوم گیاهی و کشاورزی دانشگاه ارومیه، در سایه و در دمای اتاق (۲۳–۲۳ درجه سانتی‌گراد) خشکانیده و خرد شد؛ سپس به‌منظور تهیه اسانس گیاه به مقدار مورد نیاز، در هر بار اسانس‌گیری در حدود ۱۰۰ گرم از پودر گیاه آویشن در بالن نیم لیتری دستگاه کلونجر ریخته شد و مقدار سه تا شش برابر وزن گیاه به آن آب اضافه گردید. اسانس موجود در گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۵ ساعت استخراج شد. اسانس بدست‌آمده پس از آبگیری با سولفات‌سدیم انیدرید، درون شیشه رنگی کوچک جمع‌آوری گردید و تا روز ساخت پماد در یخچال نگهداری شد (Tyagi & Malik, 2011).

تهیه پماد پایه

به‌منظور آماده‌سازی پمادهای درمانی ۱/۵٪ و ۳٪، به‌ترتیب ۱/۵ و ۳ CC از اسانس خالص تهیه شده از برگ گیاه آویشن در یک قوطی به ۱۰۰ گرم پماد پایه وازلین (۷۰٪) و اوسرین (۳۰٪) اضافه شد (Farahpour & Habibi, 2012).

www.SID.ir

Archive of SID

حیوانات مورد آزمایش

۳۶ سر موش آزمایشگاهی سفید بزرگ نر نژاد ویستار با محدوده وزنی۱۰±۲۱۰ گرم و محدوده سنی ۱۲ تا ۱۴ هفته از محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شدند. حیوانات به مدت ۱۰ روز در قفس‌های جداگانه در محل آزمایش به‌منظور تطابق به شرایط محیطی جدید نگهداری شدند. قفس‌های نگهداری حیوانات از نظر شرایط دمایی (۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (۵±۶۰٪) و نوردهی (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) در شرایط استاندارد بودند. در طول تحقیق حیوانات به شکل دستی، توسط غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی تغذیه گردیدند و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. پروتکل این مطالعه مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه قرار گرفت.

نحوه تیمار زخم‌ها

پس از ایجاد زخم، ۳۶ سر موش مورد مطالعه به‌طور تصادفی به سه گروه ۱۲تایی تقسیم شدند. گروه اول (گروه شاهد) توسط پماد پایه (ترکیب ۷۰ گرم وازلین و ۳۰ گرم اوسرین) و گروه‌های دوم و سوم به‌ترتیب توسط پمادهای ۱٪ و ۳٪ اسانس آویشن تیمار شدند. در حدود ۱ گرم پماد به‌طور موضعی، به شکل روزانه یک‌بار در روز (تا روز بیستم) بر روی محل زخم تا زمان بهبودی کامل قرار داده شد (Farahpour & Habibi, 2012).

آماده‌سازی سوسپانسیون مخمر

در ابتدا، سویه استاندارد *Candida albicans* (PTCC 5022) روی محیط کشت سابورود دکستروز آگار همراه با کلرامفنیکل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس با استفاده از کلونی‌های ظاهر شده، استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید (Beldon, 2010؛ Brown, 2009).

روش بیهوشی و ایجاد زخم

القاء بیهوشی با ترکیب زایلازین هیدروکلراید ۲٪ (۵mg/kg) و کتامین هیدروکلراید ۱۰٪ (۵۰mg/kg) تهیه شده از شرکت آلمانی Bayer، به صورت داخل صفاقی انجام شد (Farahpour & Habibi, 2012). موش‌های آزمایشگاهی به صورت شکمی بر روی میز جراحی قرار داده شدند، سپس سطح پشتی موش ها از ناحیه کتف تا ایلئوم آماده سازی و اسکراب شده و یک زخم مربع شکل با ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ سانتی‌متر در محل بین دو کتف ایجاد شد. با ایجاد زخم به روش برشی، لایه های اپیدرم و درم به‌طور کامل برداشته شدند (شکل‌های ۱ و ۲). بلافاصله پس از ایجاد زخم، محل زخم هر یک از موش‌های گروه درمان و شاهد توسط ۰/۱ml از سوسپانسیون حاوی حدوداً $1/5\times10^{6}$CFU/ml از *Candida albicans* آلوده شد. سپس موش‌های مورد آزمایش در سه گروه ۱۲تایی (شاهد، پماد ۳٪ و پماد ۱/۵٪) به‌طور تصادفی توزیع و هر گروه خود به ۴ زیرگروه ۳تایی (گروه‌های نمونه‌برداری در روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰) تقسیم شدند. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت (به منظور کلونیزاسیون مخمر) درمان موضعی آغاز گردید (Farahpour & Habibi, 2012؛ Sullivan *et al.*, 2004).

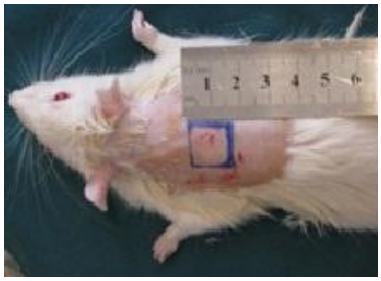
تهیه مقاطع هیستوپاتولوژیک

در روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ پس از جراحی از زخم‌های گروه‌های شاهد و درمان، نمونه بافتی برداشته شد. بدین‌ترتیب که ۵ حیوان به‌طور تصادفی از هر گروه انتخاب شد و پس از ایجاد بیهوشی به روش ذکرشده و انجام عمل اسکراب معمول جراحی، تحت شرایط آسپتیک توسط پانچ بیوپسی، نمونه‌ای به قطر ۷mm از تمام بافت التیامی گرفته شد. نمونه بافتی گرفته شده به‌منظور پایدار کردن در فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده شده و به آزمایشگاه

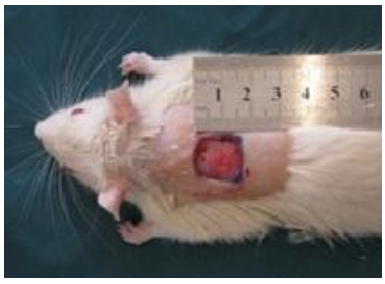
www.SID.ir

Archive of SID

پاتولوژی برای انجام سایر مراحل آماده‌سازی و تهیه مقطع منتقل گردید. پس از تثبیت و قالب‌گیری نمونه‌های بافتی در پارافین، توسط میکروتوم مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین (برای شمارش سلولی) رنگ‌آمیزی شد (Sasidharan *et al.*, 2010). در این بررسی پارامترهای آسیب‌شناختی نشان‌دهنده پیشرفت ترمیم ازجمله نوزایش عروقی، سلول‌های التهابی، میزان تشکیل لایه شاخی و ضخامت آن، مهاجرت فیبروبلاستی، حجم توده کلاژن و میزان بلوغ کلاژن براساس جدول ۱ پارامترهای آسیب‌شناختی نشان‌دهنده پیشرفت ترمیم زخم براساس امتیازدهی گزارش گردید (Ozay *et al.*, 2010).



شکل ۱- اندازه‌گیری محل زخم توسط خط‌کش در روز نخست جراحی (قبل از برش)



شکل ۲- اندازه‌گیری محل زخم توسط خط‌کش در روز نخست جراحی (بعد از برش)

جدول ۱- پارامترهای آسیب‌شناختی نشان‌دهنده پیشرفت ترمیم زخم و نحوه رتبه‌بندی آنها

درجه‌بندی	سلول‌های التهابی	نوزایش عروقی	فیبروبلاست	کلاژن	تشکیل بافت پوششی
۰	عدم حضور	عدم حضور	عدم حضور	عدم حضور	ضخیم شدن لبه‌های برش
۱	خفیف (اطراف بافت)	خفیف (بافت زیر جلد)	خفیف (اطراف بافت)	خفیف (بافت جوانه‌ای)	مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰٪
۲	خفیف (بافت جوانه‌ای و خط دمارکاسیون)	خفیف (بافت جوانه‌ای)	خفیف (بافت جوانه‌ای)	حداقل (بافت جوانه‌ای)	مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰٪
۳	متوسط (بافت جوانه‌ای و خط دمارکاسیون)	متوسط (بافت جوانه‌ای)	متوسط (بافت جوانه‌ای)	متوسط (بافت جوانه‌ای)	پل زدن ناحیه برش
۴	برجسته (بافت جوانه‌ای و خط دمارکاسیون)	برجسته (بافت جوانه‌ای)	برجسته (بافت جوانه‌ای)	برجسته (بافت جوانه‌ای)	شاخی شدن

آزمون آماری

ارزیابی آسیب‌شناختی بافت پوست در حال ترمیم به‌صورت کیفی انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد(ها) ارائه شده است. برای مطالعات آماری متغیرهای ترتیبی از نرم‌افزار spss ورژن ۱۸ استفاده شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از بررسی نتایج حاصل از پمادهای درمانی حاوی اسانس گیاه آویشن در مقایسه با یکدیگر و گروه شاهد، مشخص شد که میزان پرخونی و تعداد سلول‌های التهابی در روز چهارم، در گروه درمانی با پماد ۳٪، کاهش چشمگیری در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین تعداد سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای بیشتری در بافت در حال ترمیم دیده می‌شود. در کلیه گروه‌ها، از روز هشتم به بعد، به شکل قابل ملاحظه‌ای از تعداد سلول‌های ایمنی کاسته‌شده است. کاهش روند یادشده با سرعت کندتری نسبت به آویشن ۱/۵٪ همراه است؛ اما در گروه شاهد، روند کاهش پرخونی با سرعت بسیار کندتری نسبت به گروه‌های درمانی، به‌ویژه گروه آویشن ۳٪ ادامه یافته است (شکل ۳). در بررسی آسیب‌شناختی از لحاظ تشکیل عروق خونی جدید، در تمامی گروه‌ها، تا روز هشتم تشکیل عروق خونی نو، افزایش داشته و از آن به بعد روند کاهشی پیدا کرده است. با این تفاوت که در گروه درمانی با پماد ۳٪ تعداد معنی‌دار بیشتر عروق خونی نو در مقایسه با گروه درمانی با پماد ۱/۵٪ و گروه شاهد تشکیل شده است ($P<۰/۰۵$). همچنین در بررسی از لحاظ مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست به محل زخم، در هر دو گروه درمانی، تعداد بالاتری از سلول‌های فیبروبلاست در روز هشتم به چشم می‌خورد. این افزایش در روز شانزدهم بعد از ایجاد عفونت به بیشترین میزان خود رسیده و بعد روند کاهشی پیدا می‌کند، در حالی‌که بیشترین میزان فیبروبلاست در گروه شاهد، در روز شانزدهم، کمتر از میزان دیده شده در روز دوازدهم گروه درمانی ۳٪ بود. همچنین از لحاظ سنتز کلاژن و تراکم کلاژنی، در نمونه‌های حاصل از پماد ۳٪ سنتز کلاژن از همان روز چهارم شروع و سیر صعودی دارد؛ در مقایسه، به‌ترتیب در گروه‌های درمانی ۱/۵٪ و شاهد تراکم کلاژنی آهسته‌تر آغاز شده و با روند متوسطی ادامه می‌یابد؛ به شکلی که حداکثر میزان سنتز و تراکم کلاژن در گروه‌های یادشده در روز بیستم بوده که تا حدی با میزان آن در روز شانزدهم گروه درمانی ۳٪ برابری می‌کند ($P<۰/۰۵$). از نظر تشکیل بافت پوششی، در گروه درمانی ۳٪ از روز هشتم به بعد، میزان قابل توجهی شروع ساخت و حرکت بافت پوششی بر روی زخم دیده می‌شود که با روند صعودی ادامه یافته و در روز شانزده پل بافت پوششی کامل شده و لایه شاخی هم به‌وجود می‌آید؛ در حالی‌که این روند در گروه درمانی ۱/۵٪ با سرعت کندتر و در گروه شاهد بسیار کندتر می‌باشد. به‌طوری که شروع نوزایش بافت پوششی از روز دوازدهم بوده و با روند متوسطی تا روز شانزدهم ادامه می‌یابد و در روز بیستم بعد از القاء عفونت پل بافت پوششی کامل می‌گردد (شکل ۴). حداکثر تراکم کلاژنی، اپیتلیزاسیون و بلوغ دسته‌های کلاژنی در گروه شاهد در روز بیستم بوده که تا حدی با میزان آن در روز شانزدهم گروه درمانی ۳٪ برابری می‌کند ($P<۰/۰۵$).

بحث

در پژوهش اخیر مشخص شد که کاربرد موضعی اسانس آویشن، به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) موجب افزایش نوزایش عروقی، موجب افزایش سنتز کلاژن، همچنین افزایش دسته‌های کلاژنی از یکسو و از سوی دیگر کامل شدن پل بافت پوششی در روزهای شانزدهم و بیستم بعد از القاء عفونت در زخم‌های درمان‌یافته، شده است. نتایج آسیب‌شناختی این مطالعه برای بافت و اثبات اثر اسانس گیاه آویشن که دارای خواص بیولوژیک مفید بی‌شماری است، به شکل آزمایشگاهی و بالینی، در مدل موش آزمایشگاهی سفید بزرگ انجام شد که این پژوهش نشان داد که استفاده موضعی از اسانس آویشن در شرایط آزمایش بر روی نمونه موجود زنده، موجب توقف عفونت‌زایی زخم پوستی آلوده شده به مخمر *Candida albicans* می‌گردد. مطالعات بسیاری در زمینه خواص ضدقارچی اسانس آویشن، به‌دلیل دارا بودن مقادیر تیمول، کارواکرول، ترکیب‌های فنول و ترپنوئیدی در محیط آزمایشگاه انجام شده است و بر همین اساس نشان داده شده‌است که این ترکیب‌ها مهمترین اجزای مؤثر در فعالیت ضدقارچی و ضدمیکروبی گیاه آویشن می‌باشند (Conforti *et al.*, 2008؛ Zargari, 1995). همچنین فرایند ترمیمی زخم پدیده‌ای پیچیده و سازمان یافته است که پس از آسیب پوست و بافت‌های نرم انجام می‌شود و گاهی برای ماه‌ها و سال‌ها ادامه می‌یابد.

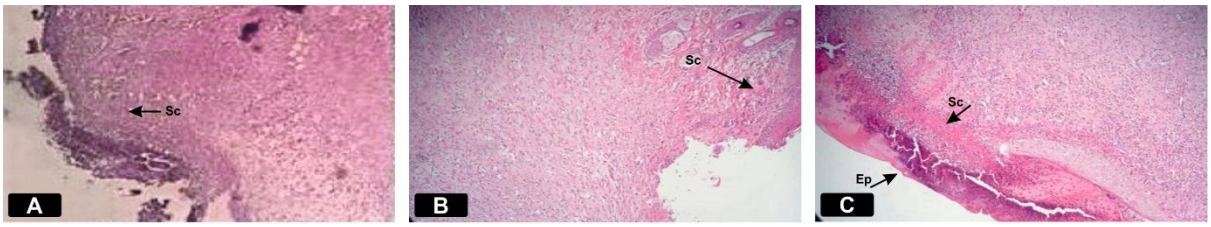
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج حاصل از میانگین ± انحراف استاندارد برآوردهای بررسی آسیب‌شناختی گروه‌های مختلف

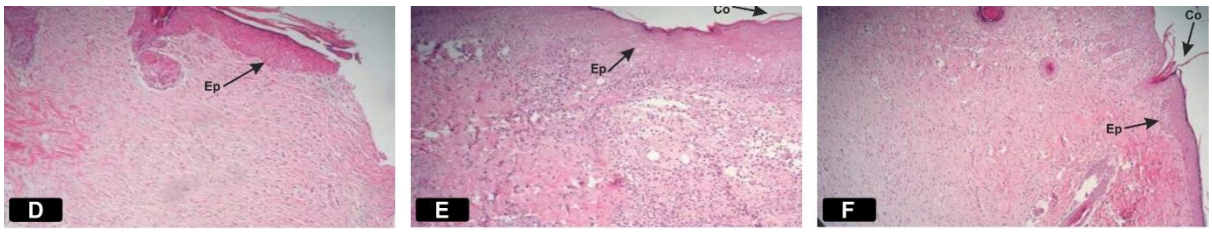
گروه‌های مورد آزمایش	پرخونی	نوع سلول التهابی	میزان سلول‌های التهابی	اسکار	تراکم کلاژنی	نوزایش بافت پوششی	بلوغ دسته‌های کلاژن
آویشن ۱/۵٪ روز چهارم	+++	لنفوسیت–نوتروفیل	+++	++++	–	–	–
آویشن ۳٪ روز چهارم	++ a	لنفوسیت–نوتروفیل	++ a	++++	++	–	–
شاهد روز چهارم	+++	لنفوسیت–نوتروفیل	+++	++++	+	–	–
آویشن ۱/۵٪ روز هشتم	+ b	لنفوسیت	+++	++++	+	+	–
آویشن ۳٪ روز هشتم	++ a	لنفوسیت	+++	+++	++	++	–
شاهد روز هشتم	+++	لنفوسیت	+++	++++	+	+	–
آویشن ۱/۵٪ روز دوازدهم	–	لنفوسیت	++	–	++	+++	++
آویشن ۳٪ روز دوازدهم	+	لنفوسیت	++	+	+++	++	++
شاهد روز دوازدهم	–	لنفوسیت	++	–	++	+++	++
آویشن ۱/۵٪ روز شانزدهم	–	لنفوسیت	+++	–	+++ ab	+++ a	++
آویشن ۳٪ روز شانزدهم	–	لنفوسیت	+	–	+++ ab	+++ b	+++
شاهد روز شانزدهم	–	لنفوسیت	++	–	+	+	+
آویشن ۱/۵٪ روز بیستم	–	لنفوسیت	+	–	+++	++++ b	++ ab
آویشن ۳٪ روز بیستم	–	لنفوسیت	+	–	+++	++++ ab	++ a
شاهد روز بیستم	–	لنفوسیت	++	–	++	+++	+

a، b، ab: حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد است ($P<۰/۰۵$).



شکل ۳- نمای ریزبینی از مقطع عرضی پوست موش در روز هشتم

گروه شاهد (A)، گروه درمانی با پماد ۱/۵٪ اسانس آویشن (B)، گروه درمانی با پماد ۳٪ اسانس آویشن (C)
تعداد سلول‌های ایمنی در گروه C و B نسبت به گروه A کاهش یافته و در گروه شاهد، روند کاهش پرخونی با سرعت بسیار کندتری نسبت به گروه‌های درمانی انجام شده است و همچنین اسکار (Sc) و بافت پوششی نوزایشی (Ep) در گروه درمانی با پماد ۳٪ اسانس آویشن تشکیل شده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین، بزرگنمایی ۴x).



شکل ۴- نمای ریزبینی از مقطع عرضی پوست موش در روز شانزدهم

گروه شاهد (D)، گروه درمانی با پماد ۱/۵٪ اسانس آویشن (E)، گروه درمانی با پماد ۳٪ اسانس آویشن (F). در گروه درمانی با پماد ۳٪ پل بافت پوششی (Ep) کامل و لایه شاخی (Co) هم تشکیل شده است؛ در حالی‌که این روند در گروه درمانی با پماد ۱/۵٪ با سرعت کندتر و در گروه شاهد بسیار کندتر می‌باشد. سلولهای التهابی فیبروبلاست در گروه درمانی با پماد ۳٪ اسانس آویشن نسبت به دو گروه دیگر کاهش یافته است. تراکم باندهای کلاژنی در دو گروه درمانی با اسانس آویشن نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین_ ائوزین، بزرگنمایی ۴x).

www.SID.ir

Archive of SID

در طی روند ترمیم، فرایندهای مشخص و هماهنگی از قبیل بازسازی، مهاجرت و تکثیر سلول‌های پارانشیمی و سلول‌های بافت همبند و ساخت دوباره بافت همبند و رگ‌زایی انجام می‌شود. با توجه به اینکه مراحل متعددی در ترمیم زخم شامل: انعقاد، التهاب، گرانولاسیون، فیبروپلازی، کلاژنزیس، انقباض زخم و اپیتلیزاسیون وجود دارد (Young & Dyson, 1990). براساس مطالعات فارماکولوژیکی، فعالیت تسریع‌کنندگی بسیاری از گیاهان دارویی حاوی مواد و ترکیب‌های طبیعی ازجمله تانن‌ها، ترپنوئیدها و فلاونوئیدها که توانایی ایجاد افزایش سرعت بهبود زخم ناشی از حوادث و برخی بیماری‌ها را دارند به اثبات رسیده است (Cushnie & Lamb, 2011). فرایند بهبود زخم، در انواع مختلف زخم پیچیده بوده و با توجه به همپوشانی فیزیولوژیکی، به سه مرحله التهاب، تکثیر بافت همبند و بازسازی تقسیم می‌گردد. وقوع دقیق تمام این مراحل در زمان مناسب، باعث می‌شود فرایند بازسازی و بهبود زخم به‌صورت عادی امکان‌پذیر شود. حال افزایش سرعت هر یک از این مراحل یادشده ترمیم، موجب تسریع کلی زمان بهبودی زخم می‌شود (Beldon, 2010). از سوی دیگر، در اواخر مرحله اول روند التیامی، و با کاهش میزان عوامل عفونت‌زا و آماس زخم، نوزایش عروقی برای تشکیل بافت‌های جوان آغاز می‌گردد (Lerman *et al.*, 2003؛ Eming *et al.*, 2007). در پژوهش اخیر مشخص شد که به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از شدت آماس و حضور سلول‌های ایمنی چند هسته‌ای (نوتروفیلها) در زخم‌های عفونی درمان شده توسط پماد حاوی اسانس آویشن، به‌ویژه در دوز بالاتر، کاسته شده‌است. مرحله دوم روند التیامی، مرحله پرولیفراسیون سلول‌های بافت همبندی می‌باشد که از روز سوم بعد از وقوع زخم آغاز می‌گردد (Eming *et al.*, 2007). زمان این مرحله، نوزایش عروقی، رسوب کلاژن، رشد دوباره بافت پوششی و تشکیل بافت گرانوله، متشکل از سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی موقت جدید شروع به پوشش دادن و پر کردن سطح زخم برای بازگرداندن یکپارچگی بافت پوست اتفاق می‌افتد. همچنین طی این مرحله از میزان حضور سلول‌های ایمنی در محل زخم کاسته شده و بر تعداد سلول‌های فیبروبلاست افزوده می‌گردد (Eming *et al.*, 2007). در پژوهش اخیر مشخص شد که کاربرد موضعی اسانس آویشن، به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) موجب افزایش مهاجرت فیبروبلاست‌ها و شروع نوزایش بافت پوششی در روزهای هشتم و دوازدهم بعد از القاء عفونت در زخم‌های درمان شده، به‌ویژه در دوز بالاتر شده است (جدول ۲). مرحله سوم روند التیامی، مرحله بلوغ است که از روز چهاردهم بعد از وقوع زخم آغاز می‌گردد (Eming *et al.*, 2007). طی این مرحله افزایش سنتز کلاژن و سازماندهی دسته‌های کلاژنی، تکامل بافت گرانوله به بافت اسکار و حذف سلول‌های دیگر توسط فرایند آپوپتوز اتفاق خواهد افتاد (Lerman *et al.*, 2003). در پژوهش اخیر مشخص شد که کاربرد موضعی اسانس آویشن، به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) موجب افزایش سنتز کلاژن و همچنین افزایش دسته‌های کلاژنی از یکسو و از سوی دیگر کامل شدن پل بافت پوششی در روزهای شانزدهم و بیستم بعد از القاء عفونت در زخم‌های درمان شده، به‌ویژه در دوز بالاتر شده است (جدول ۲). یافته‌های اخیر، با گزارشهای دیگر محققان مطابقت دارد (Pieroni *et al.*, 2005). نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به یافته‌های آسیب‌شناختی از پژوهش اخیر، پماد حاوی اسانس آویشن موجب کاهش عفونت‌زایی ناشی از مخمر *Candida albicans* و تسریع روند بهبود زخم پوستی عفونی شده و همچنین موجب بروز اثرات مثبت آن در روند التیام زخم‌های تمام ضخامت عفونی با کاهش زمان مرحله التهابی و میزان عفونت بافتی و همچنین افزایش نوزایش عروقی، مهاجرت فیبروبلاستی و نوزایش بافت پوششی می‌باشد که در مجموع استفاده موضعی از پماد ۳٪ اسانس آویشن از لحاظ تأثیرگذاری بر میزان کاهش دوره درمان و روند بهبود زخم نسبت به پماد درمانی ۱/۵٪ به شکل مطلوب‌تر، و در مقایسه با گروه کنترل بسیار چشمگیرتر عمل کرده است. بنابراین با نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان کاربرد درمانی اسانس آویشن را در درمان زخم‌های عفونی مثبت ارزیابی کرد. در این مطالعه به‌دلیل محدودیت در

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی اختصاصی بافت، بررسی بافت‌شناسی فقط با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین انجام شده، و پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی شامل رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم برای بررسی رسوب کلاژن و رنگ‌آمیزی ایمونوپراکسید از جهت بررسی عروق نیز انجام شود تا بتوان بررسی بافت‌شناسی کامل‌تری انجام داد. همچنین یکی از روش‌های بررسی زخم، علاوه‌بر اندازه‌گیری قطر زخم، بررسی قدرت کششی سطحی زخم توسط دستگاه تانسیومتر می‌باشد که در این مطالعه، به‌دلیل عدم دسترسی به این دستگاه این اقدام انجام نشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه که در اجرای این تحقیق ما را همراهی کردند، ابراز می‌دارند.

منابع مورد استفاده

- Agarwal, V., Lal, P. and Pruthi, V., 2010. Effect of plant oils on *Candida albicans*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 43(5): 447-451.
- Beldon, P., 2010. Basic science of wound healing. Surgery (Oxford), 28(9): 409-412.
- Brown, A.E., 2009. Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology, Short Version: McGraw Hill, 480p.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A. and Uzunov, D., 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. Journal of Ethnopharmacology, 116(1): 144-151.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 38(2): 99-107.
- Eming, S.A., Werner, S., Bugnon, P., Wickenhauser, C., Siewe, L. and Utermöhlen, O., 2007. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. American Journal of Pathology, 170(1): 188-202.
- Farahpour, M. and Habibi, M., 2012. Evaluation of the wound healing activity of an ethanolic extract of *Ceylon cinnamon* in mice. Veterinární medicína, 57(1): 53-57.
- Isibor, J.O., Oseni, A., Eyaufe, A. and Ahmadu, T., 2008. Incidence of aerobic bacteria and *Candida albicans* in post-operative wound infections. African Journal of Microbiology Research, 2: 288-291.
- Kumar, V.P., Chauhan, N.S., Harish, P. and Rajani, M., 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 107(2): 182-188.
- Lerman, O.Z., Galiano, R.D., Armour, M., Levine, J.P. and Gurtner, G.C., 2003. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. American Journal of Pathology, 162(1): 303-312.
- Murray, C.K., Loo, F.L., Hospenthal, D.R., Cancio, L.C., Jones, J.A. and Kim, S.H., 2008. Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns. Burns, 34(8): 1108-1112.
- Naseri, M., 2004. Development of traditional medicin and WHO Guideline. Journal of Daneshvar Pezeshki, 11(52): 53-68.
- Ozay, Y., Ozyurt, S., Guzel, S., Cimbiz, A., Olgun, E.G. and Cayci, M.K., 2010. Effects of *Equisetum arvense* ointment on dermal wound healing in rats. Wounds, 22(10): 261-267.
- Pieroni, A., Muenz, H., Akbulut, M., Başer, K.H.C. and Durmuşkahya, C., 2005. Traditional phytotherapy and trans-cultural pharmacy among Turkish migrants living in Cologne, Germany. Journal of Ethnopharmacology, 102(1): 69-88.
- Raja, R.D.A., Jeeva, S., Prakash, J.W., Antonisamy, J.M. and Irudayaraj, V., 2011. Antibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(5): 375-378.
- Sullivan, D.J., Moran, G.P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C. and Vaughan, C., 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Research, 4(4-5): 369-376.
- Sasidharan, S., Nilawatyi, R., Xavier, R., Latha, L.Y. and Amala, R., 2010. Wound healing potential of *Elaeis guineensis* Jacq leaves in an infected albino rat model. Molecules, 15(5): 3186-3199.
- Tyagi, A.K. and Malik, A., 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. Food Control, 22(11): 1707-1714.
- Young, S.R. and Dyson, M., 1990. Effect of therapeutic ultrasound on healing of full thickness excised skin lesions. Uitrasonic, 28: 175-180.
- Zargari, A., 1995. Medicinal Plant (Vol. 1). Tehran Univercity, Tehran, 976p.

www.SID.ir

Archive of SID

The local effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil on healing the cutaneous incisional wounds in the case of rats infected with *Candida albicans* (a histopathological study)

A. Rahmanpour[1*], M. Nasiri[2] and M.R. Farahpour[3]

1*- Corresponding auther, Msc of Microbiology, Liver & Digestive Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, E-mail: rahmanpour_arvin@yahoo.com
2- Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Urmia, Iran
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Urmia, Iran

April: May 2015 Revised: September 2015 Accepted: September 2015

Abstract

Wound infections caused by *Candida albicans*, have substantially grown in recent years. The lack of easy access, medicine costliness, side effects, and development of the pharmaceutical resistance resulted in using biological materials as an alternative. *Thymus vulgaris* L. is one of the antimicrobial properties of biological materials, whose effectiveness has been proved from a long time ago. This study analyzed the local effects of *Thymus* essential oil on healing the cutaneous incisional wounds in the case of rats infected with *Candida albicans*. In this experiment, carried out on 36 Wistar male rats with an average weight of 210±10 g, after general anesthesia and making a 1.5×1.5 cm square wound between the shoulder area, 0.5 ml. of the yeast suspension containing 1.5×10^6 CFU/ml *Candida albicans* was applied to the wound(s). Then, in three groups of 12 (to control with 3 percent and 1.5 percent local ointments), the rats were randomly distributed into 4 subgroups of 3 animals (each group was sampled on different days). During the experiment, in order to assess the histopathology and yeast count, at the end of 4th, 8th, 12th, 16th, and 20th days, samples were taken by a special biopsy punch. According to the result drawn from this experiment, and regarding the effects of 3 percent and 1.5 percent ointments, there was not a conspicuous dissimilarity in reducing the *Candida albicans* yeast count, but in comparison with the control group, this dissimilarity was noticeably meaningful ($P<0.001$). Moreover, according to the histopathological studies, both ointments showed significantly remarkable results in terms of reduced blood vessels and mononuclear cells, increased fibroblast cells, and increased number of macrophages in comparison with the control group. Overall, since the 3 percent ointment had achievements similar to the 1.5 percent one, and mostly well-achieved as compared with the other (two) groups, it (the 3 percent ointment) would be the final choice to local usage in the process of healing and reducing of *Candida albicans* infections.

Keywords: *Thymus* essential oil, *Candida albicans*, wound healing, rats.

www.SID.ir