

## بررسی اثرات عصاره هیدرو الکلی اندام‌های هوایی گیاه یونجه بر زخم معده ناشی از اسید استیک در مدل حیوانی (Rat)

مژده ثمری<sup>1</sup>، مهرداد رهنما<sup>2</sup>، شهرزاد نصیری سمنانی<sup>3</sup>، علی شهناز<sup>4</sup>

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی فیزیولوژی جانوری، زنجان، ایران.

2- دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشیار گروه زیست شناسی فیزیولوژی جانوری، زنجان، ایران. meh\_rahnema@yahoo.com

3- دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، استادیار گروه زیست شناسی فیزیولوژی جانوری، زنجان، ایران.

4- دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه ریاضی و آمار، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: 92/11/29 تاریخ پذیرش: 93/2/27

### چکیده

زمینه و هدف: زخم معده، از نظر بافت شناسی به عنوان عامل تکرور دهنده مخاط شناخته شده است. این بیماری اغلب از شایع ترین بیماری‌های گوارشی بوده و استفاده از داروهای شیمیایی موجب بروز عوارض جانبی می‌گردد. گیاهان دارویی با جذب سریع، اثر درمانی بهتر، عوارض جانبی و سمیت کمتر امروزه جایگزین مناسبی در برخی از بیماری‌ها هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره آبی الکلی یونجه بر درمان زخم معده ناشی از اسید استیک در مدل حیوانی رت می‌باشد.

روش کار: در این بررسی از 60 سرموش صحرایی ماده به وزن 200-250 گرم که به طور تصادفی به چهار گروه 15 تایی شم (دریافت کننده نرمال سالین)، کنترل، گروه تجربی 1 (دریافت کننده دوز 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش) و گروه تجربی 2 (دوز 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش) تقسیم شدند. موش‌ها پس از تحمل 24 ساعت گرسنگی تحت عمل جراحی قرار گرفتند. زخم معده با تزریق 0/12 میلی لیتر اسید استیک 60٪ در معده موش ایجاد و در روزهای 4، 7، 10، 14 پس از گاوژ، معده‌ها خارج و بعد از اندازه گیری ابعاد زخم و تثبیت با فرمالین 10٪، مراحل پاساژ، برش بافتی و رنگ آمیزی انجام و در نهایت تعداد نوتروفیل، ماکروفاژ و فیبروبلاست شمارش گردید.

یافته‌ها: نتایج مشخص نمود که عصاره آبی الکلی یونجه باعث افزایش معنی‌دار درصد بهبود زخم معده ( $P < 0/05$ ) در گروه‌های تجربی 1 و 2 شد. میانگین تعداد نوتروفیل و ماکروفاژ گروه‌های تجربی 1 و 2 در روز چهارم و میانگین تعداد فیبروبلاست در روزهای چهارم و هفتم افزایش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) و در سایر روزها کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شم و کنترل داشته است. نتیجه‌گیری: عصاره هیدرو الکلی اندام‌های هوایی یونجه اثر ترمیمی قابل ملاحظه‌ای بر زخم معده ناشی از اسید استیک دارد. واژه‌های کلیدی: عصاره یونجه، زخم معده، شاخص‌های خونی.

### مقدمه

دخانیات، عدم تعادل میان فاکتورهای مهاجم مانند اسید، پپسین، صفرا، فاکتورهای دفاعی مانند مخاط معدی، سکرین، بی‌کربنات، پروستاگلاندین‌ها، نیتریک اکساید و دفاع ذاتی سلول‌های مخاطی می‌باشد (33، 2). زخم‌های گوارشی در مواردی با علائم خود از جمله دردهای شکمی شدید، گرفتگی عضلانی طولانی مدت و استفراغ خونی زندگی بیمار را دچار اختلال می‌کنند. برای تشخیص این بیماری می‌توان از روش‌های اندوسکوپی، پرتو X و تست وجود هلیکوباکتریلوری استفاده کرد و

زخم معده یک مشکل جهانی و شایع بوده، به طوری که در ایالات متحده آمریکا حدود چهار میلیون نفر مبتلا به زخم معده می‌باشند و سالانه سه هزار و پانصد مورد جدید بیماری و سه هزار مرگ رخ می‌دهد (34). زخم معده جراحی است که به وضوح دردناک بوده و سبب فرسایش و تحلیل آستر معده می‌گردد. از دلایل به وجود آورنده این زخم‌ها هلیکوباکتریلوری، داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی، مصرف الکل، استعمال

باشد(28). Komeili و همکاران (2012) با بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه زنیان بر درمان زخم معده ناشی از ایوپروپرفن در موش صحرایی نتیجه گرفتند که مصرف عصاره دانه گیاه زنیان بر درمان زخم معده بسیار مؤثر است و اثر درمانی آن با داروی شناخته شده امپرازول نیز قابل مقایسه است(17). Ogara و همکارانش (2000) اثر ضد هلیکوباکتریلوری پودر سیر و روغن سیر را طی تحقیقات خود مشخص کردند(24). موسوی مبارکه و همکاران(2013) اثر عصاره آبی برگ کاکوتی کوهی بر زخم معده ناشی از اسید استیک را در موش صحرایی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره آبی برگ گیاه کاکوتی در درمان زخم معده ناشی از اسید استیک مؤثر است(21). موسوی و همکاران(2013) اثر ترمیمی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پنتوسوس را بر ترمیم زخم معده ناشی از اسید استیک در موش صحرایی نر نژاد ویستار بررسی کردند و دریافتند که لاکتوباسیلوس پنتوسوس اثر ترمیمی بر زخم معده ناشی از اسید استیک دارد(22).

گیاه یونجه (*Medicago sativa*) از تیره Fabaceae است. یوسفی و همکاران(2011) تأثیر گیاه یونجه را بر بهبود زخم در موش های آزمایشگاهی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که احتمال دارد یونجه در روند بهبود زخم مؤثر باشد(37). هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدرو الکلی یونجه بر درمان زخم معده ناشی از اسید استیک در مدل حیوانی رت می باشد.

### مواد و روش ها

#### حیوانات مورد آزمایش

در این مطالعه 60 سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار (وزن 200-250 گرم) از موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی تهیه شد. در سراسر دوره آزمایش رت ها با یک رژیم غذایی استاندارد تغذیه و تحت شرایط استاندارد و درجه حرارت مطلوب حدود  $23 \pm 2$  درجه

برای درمان آن از داروهای آنتی هیستامین، بازدارنده پمپ پروتون، داروهای آنتی کولینرژیک، داروهای شبه پروستاگلاندین برای کاهش حجم اسید معده و داروهای آنتی بیوتیک جهت از بین بردن عوامل میکروبی استفاده نمود(4). تشکیل زخم و بهبودی آن، فرآیندهای پویای بازسازی ماتریکس خارج سلولی هستند که عمدتاً تحت تاثیر متالوپروتئینازها می باشند. درمان آسیب های شدید و عمیق مخاطی به بازسازی اپیتلیوم سطح ساختارهای اپتیلیالی غددی و ترمیم آستر شبکه مویرگ های مخاطی، اعصاب و سلول های بافت پیوندی نیاز دارد(25). امروزه روش های درمانی به سمت تقویت دفاع مخاطی همراه با کاهش ترشح اسید پیش می رود(36). استفاده از داروهای آنتی بیوتیکی، مسدود کننده های اسید (سایمتدین، رانتیتدین، فاموتیدین)، مسدود کننده های گیرنده  $H_2$  (هستامین، اپرازول) و حفاظت و پوشش دهنده بافت (سوکرالفات، بیسموت) اگر چه مرگ و میر زخم معده کاهش می یابد ولی گران بودن و عوارض جانبی این داروها منجر به بررسی روش های دیگر نموده است(20). در سال های اخیر تمایل به استفاده از فرآورده های طبیعی مخصوصاً آن هایی که از گیاهان مشتق شده اند، گسترش یافته است. یکی از مزایای مهم گیاهان دارویی در مقایسه با داروهای شیمیایی این است که در گیاهان دارویی ماده موثر در کنار بسیاری از ترکیبات دیگر قرار می گیرد که ممکن است موجب تشدید جذب گوارشی، اثر درمانی دارو و باعث کاهش عوارض جانبی و سمیت آن شود(10). مطالعات نشان می دهد که فرآورده های حاصل از عصاره های گیاهی نتایج امید بخشی را برای درمان زخم معده نشان می دهند(13). Rashidi و همکاران (2015) اثر ضد التهابی و ترمیمی گیاه بومادران در درمان زخم معده ناشی از ایندومتاسین در موش صحرایی را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که این گیاه جهت درمان زخم معده مناسب می -

گیاه یونجه از مراتع اطراف زنجان جمع آوری و توسط کارشناس های گیاهی هرباریوم مرکز تحقیقات دانشگاه

و سپس با داروی بی هوشی کلرال هیدرات (400mg/kg) بیهوش گردیدند. بعد از بیهوشی رت را به صورت خوابیده به پشت قرار داده و در قسمت چپ تقریباً وسط بدن بعد از تراشیدن موهای موضع جراحی و استریل کردن با الکل و بتادین برش کوچکی در شکم ایجاد و معده را طوری که پیچ نخورد خارج شد، دو سر معده توسط کلاپس مسدود و 0/12 میلی لیتر محلول اسید استیک 60٪ توسط یک سرنگ انسولین از ناحیه تنه معده، قسمتی که فاقد رگ باشد به داخل معده تزریق و بعد از 45 ثانیه اسید به وسیله همان سرنگ خارج و معده دوبار توسط تزریق نرمال سالین شستشو گردید. بعد از برگرداندن معده و بخیه زدن بافت های مربوطه موش را بر روی شکم خوابانده و در قفس مجزا در جای گرم نگه داری شد (21).

#### روش سنجش بهبودی زخم

بهبودی زخم با اندازه گیری وسعت زخم و درصد بهبود ارزیابی شد. وسعت زخم در روزهای 1، 4، 7، 10، 14 با واحد میلی متر مربع با استفاده از کاغذ میلی متری اندازه گیری شد. درصد بهبود با فرمول زیر محاسبه شد (21).  
درصد بهبود زخم = اندازه ی زخم در روز مورد نظر - اندازه ی زخم در روز اول / اندازه ی زخم در روز اول × 100.

#### بافت شناسی

رت ها در روزهای اول، چهارم، هفتم، دهم و چهاردهم پس از ایجاد زخم معده با اتر بیهوش و خروج معده، اندازه های زخم (میلی متر مربع) در هر معده تعیین شد. نمونه ها (به جز نمونه روز اول) برای تثبیت در داخل فرمالین 10٪ قرار گرفتند و پس از پاساژ و تهیه برش بافتی با هماتوکسلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. در مرحله بعد با استفاده از عدسی چشمی مدرج خط کش دار

سانتی گراد وسیکل روشنایی و تاریکی 12 ساعته به صورت انفرادی در قفس های تمیز نگه داری شدند (21).

#### تهیه گیاه و عصاره گیری

آزاد اسلامی واحد زنجان شناسایی گردید. برای تهیه عصاره هیدروالکلی اندام های هوایی گیاه یونجه 150 گرم از پودر گیاه خشک شده با اتانل 75٪ به حجم 1 لیتر رسانیده و به مدت 48 ساعت غوطه وری با صافی پارچه ای صاف گردید. در مرحله بعد عصاره ها در سانتریفوژ مدل ROTIXDA 50 RS ساخت کمپانی HETTICH با دور 2500 rpm به مدت 20 دقیقه با دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ و با روش تقطیر در خلای تغلیظ و در دمای 80- درجه سانتی گراد نگه داری شد (6، 2).

#### گروه های مورد مطالعه

در این بررسی از 60 سر رت ماده نژاد ویستار که به طور تصادفی به 4 گروه 15 تایی تقسیم شدند، استفاده شد. گروه های تجربی: گروه تجربی 1 (دریافت کننده عصاره با دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) و گروه تجربی 2 (دریافت کننده عصاره با دوز 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) می باشند. عصاره از طریق گاواژ پس از ایجاد زخم معده توسط اسید استیک 60 درصد، دریافت و در روزهای 1، 4، 7، 10، 14 مورد بررسی بافت شناسی و بیوشیمیایی قرار گرفتند (21).

گروه شم: نرمال سالین را از طریق گاواژ پس از ایجاد زخم معده توسط اسید استیک 60 درصد دریافت نمودند و به ترتیب در روزهای 1، 4، 7، 10، 14 مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه کنترل: پس از ایجاد زخم معده توسط اسید استیک 60 درصد، به ترتیب در روزهای 1، 4، 7، 10، 14 مورد بررسی قرار گرفتند.

#### القای زخم معده

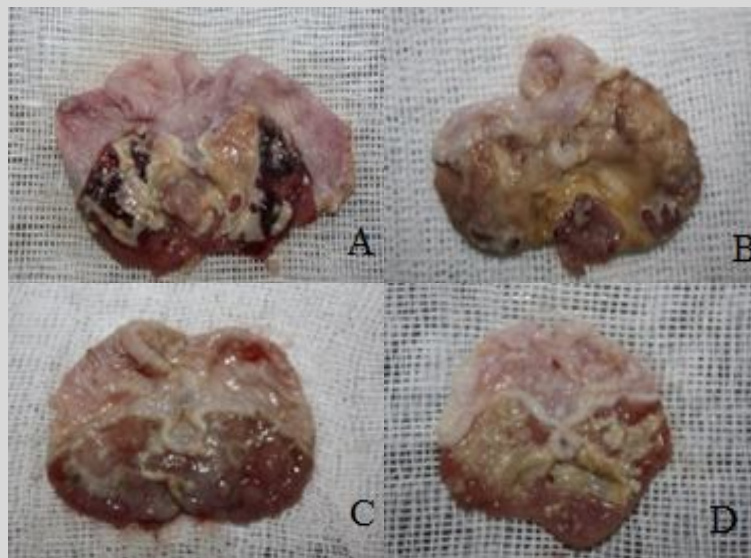
قبل از جراحی رت ها به مدت 24 ساعت از غذا محروم و تنها به آن ها آب داده می شد. 2 ساعت قبل از جراحی آب رت ها قطع شده تا مجاری گوارشی کاملاً خالی شود

گذارند و تفاوت معنی داری میان گروه تجربی 1) دریافت کننده عصاره با دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) و گروه تجربی 2) دریافت کننده عصاره با دوز 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) وجود ندارد (جدول 1 و شکل 1 تا 4). در بررسی شاخص های بافت شناسی (نوتروفیل، ماکروفاژ و فیروبلاست) مشخص گردید که افزایش معنی داری در میانگین تعداد نوتروفیل و ماکروفاژ گروه های تجربی 1 و 2 در روز چهارم و کاهش معنی داری در روزهای هفتم، دهم و چهاردهم نسبت به گروه شم و کنترل دارد. هم چنین میانگین تعداد فیروبلاست در هر دو گروه تجربی در روزهای چهارم و هفتم افزایش معنی دار و در روزهای دهم و چهاردهم کاهش معنی داری نسبت به دو گروه شم و کنترل مشاهده گردید (جدول 2 و اشکال 5 تا 8).

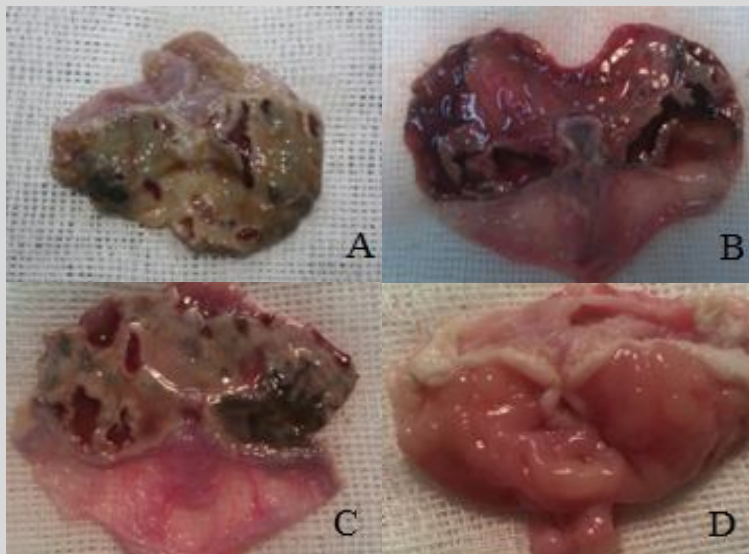
و بررسی مقاطع سریالی تعداد فیروبلاست، نوتروفیل و ماکروفاژ در واحد سطح تعیین شدند. این مراحل به ترتیب در روزهای مختلف اندازه گیری و در پایان داده ها با استفاده از نرم افزار spss نسخه 18 و آنالیز واریانس یکطرفه (ony way anova) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. معیار استنتاج آماری در این بررسی ( $P < 0/05$ ) معنی دار در نظر گرفته شد (21).

#### یافته ها

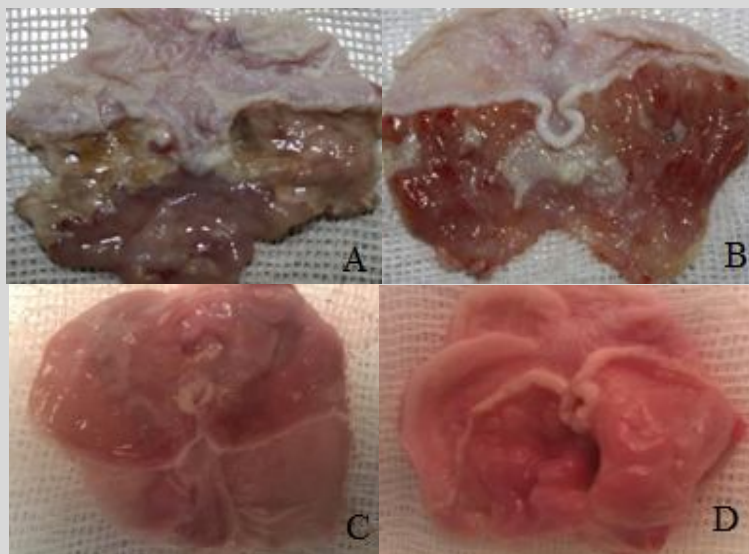
همان طور که در جدول 1 ذکر شده است، میانگین درصد بهبود زخم در گروه های تجربی دریافت کننده عصاره افزایش معنی داری با گروه های شم و کنترل دارند. در بررسی های انجام شده میان گروه های تجربی، مشخص شد که عصاره هیدرو الکلی اندام های هوایی رویشی گیاه یونجه در هر دو دوز گاوژ شده اثرات مثبت خود را بر زخم معده ناشی از اسید استیک در رت می-



شکل 1- میزان بهبود زخم معده در گروه های کنترل (A)، شم (نرمال سالین) (B)، تجربی 1) عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (C)، تجربی 2) عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (D) در روز چهارم پس از ایجاد زخم معده



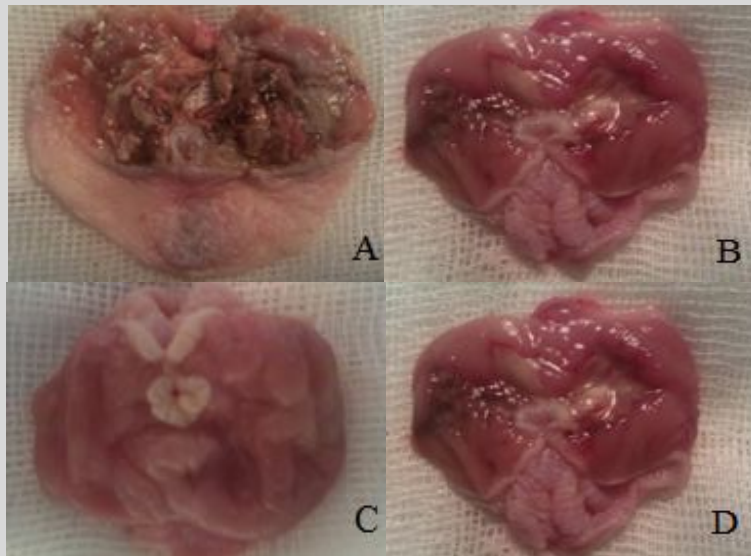
شکل 2- میزان بهبود زخم معده در گروه های کنترل (A)، شام (نرمال سالین) (B)، تجربی 1 (عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلو گرم وزن موش) (C)، تجربی 2 (عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 500 میلی گرم بر کیلو گرم وزن موش) (D) در روز هفتم پس از ایجاد زخم معده



شکل 3- میزان بهبود زخم معده در گروه های کنترل (A)، شام (نرمال سالین) (B)، تجربی 1 (عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلو گرم وزن موش) (C)، تجربی 2 (عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 500 میلی گرم بر کیلو گرم وزن موش) (D) در روز دهم پس از ایجاد زخم معده

جدول 1- اثر عصاره هیدروالکلی یونجه با دوزهای مختلف بر روی میانگین و انحراف معیار درصد بهبود زخم در گروه و زمان های متفاوت تیمار

روز	4	7	10	14	گروه
کنترل	11/61±3/23	37/54±9/42	61/78±6/93	69/53±10/63	
شم	25/97±2/67	49/15±1/99	70/67±4/54	80/62±6/55	
تجربی 1	53/64±8/44	79/36±9/65	100±0	100±0	
تجربی 2	60/64±3/9	100±0	100±0	100±0	



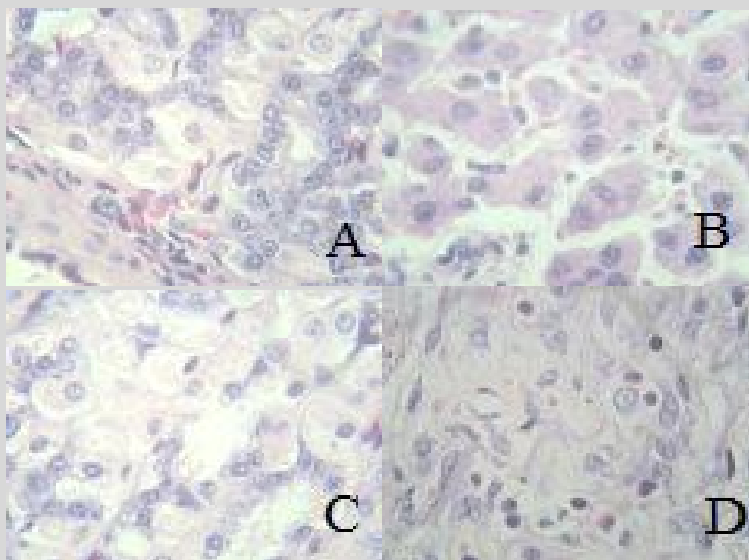
شکل 4- میزان بهبود زخم معده در گروه های کنترل (A)، شم (نرمال سالین) (B)، تجربی 1 (عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (C)، تجربی 2 (عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه دوز 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (D) در روز چهاردهم پس از ایجاد زخم معده

### بحث و نتیجه گیری

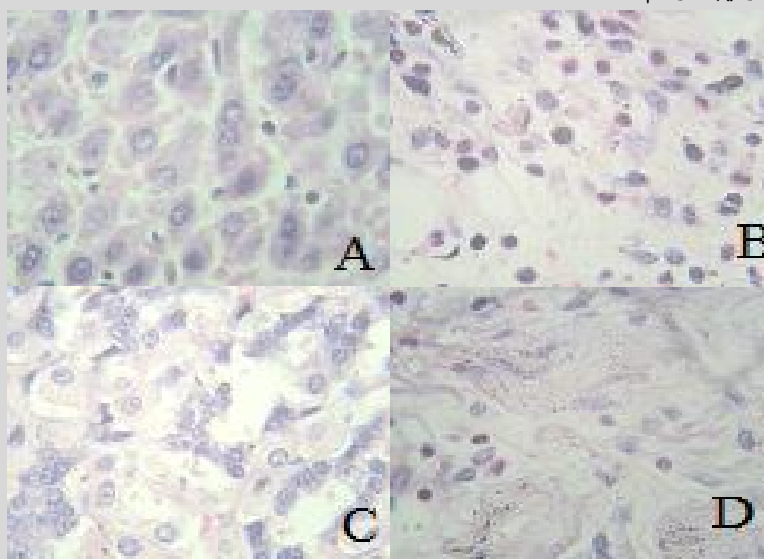
التیام تمامی زخم ها بدون در نظر گرفتن عامل ایجادشان شامل این فازها می باشد: فاز التهاب، فاز تکثیر و فاز تجدید ساختار (33). روند بهبود زخم فرآیندی است که فوراً پس از جراحی با شروع فاز هموستازی آغاز می گردد. در طول جراحی، رگ های خونی بافت تخریب شده، گشاد و پلاکت های خونی و فاکتورهای تسریع کننده انعقاد خون به محل جراحی وارد می شوند. در طول روند بهبودی زخم بعد از مرحله التهاب، پاکسازی توسط سلول های التهابی (گلبول های سفید) انجام می -

گردد. با گذشت زمان دو لبه زخم به هم متصل شده و بافت گرانوله زیر آن را پر می کند. در ادامه فیبروبلاست ها جهت یابی پیدا کرده و با تحریک سنتز کلاژن، در نهایت تجدید ساختار بافت آسیب دیده رخ می دهد. در فاز التهاب طی 24 ساعت اول پس از آسیب بافت، نوتروفیل ها به حداکثر رسیده و پس از 3 روز کاهش می یابند. در عرض 24 تا 48 ساعت ماکروفاژها نیز به حداکثر رسیده و در روز پنجم اکثریت سلول های زخم را تشکیل می دهند (20). همان طور که در آنالیز واریانس نتایج ما مشخص است، شاخص های التهابی

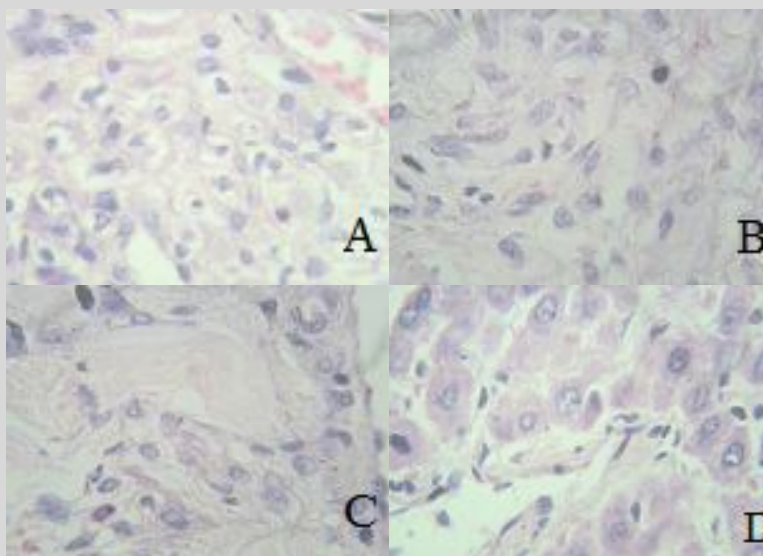
(نوتروفیل و ماکروفاژ) تا روز چهارم روند افزایشی و پس از آن روند کاهشی دارند.



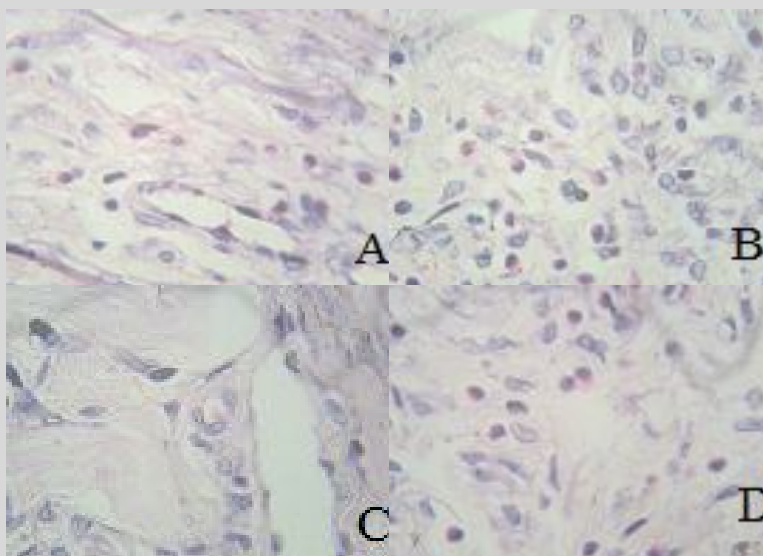
شکل 5- نمای ریزبینی شاخص‌های بافت شناسی در گروه‌های کنترل (A)، شم (نرمال سالین) (B)، تجربی 1 (عصاره آبی الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (C) و تجربی 2 (عصاره آبی الکلی گیاه یونجه 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (D) در روز چهارم پس از ایجاد زخم معده



شکل 6- نمای ریزبینی شاخص‌های بافت شناسی در گروه‌های کنترل (A)، شم (نرمال سالین) (B)، تجربی 1 (عصاره آبی الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (C) و تجربی 2 (عصاره آبی الکلی گیاه یونجه 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (D) در روز هفتم پس از ایجاد زخم معده



شکل 7-نمای ریزبینی شاخص های بافت شناسی در گروه های کنترل (A)، شم(نرمال سالین)(B) ، تجربی 1(عصاره آبی الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش)(C) و تجربی 2(عصاره آبی الکلی گیاه یونجه 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (D)در روز دهم پس از ایجاد زخم معده



شکل 8- نمای ریزبینی شاخص های بافت شناسی در گروه های کنترل (A)، شم(نرمال سالین)(B) ، تجربی 1(عصاره آبی الکلی گیاه یونجه دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش)(C) و تجربی 2(عصاره آبی الکلی گیاه یونجه 500 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش) (D)در روز چهاردهم پس از ایجاد زخم معده



جدول 2- اثر عصاره هیدروالکلی یونجه با دوزهای مختلف بر روی میانگین و انحراف معیار شاخص‌های بافت‌شناسی در گروه و زمان-های متفاوت تیمار

روز	شاخص گروه	نوتروفیل	ماکروفاژ	فیبروبلاست
4	کنترل	12/67±1/2	10/33±0/88	9/67±0/88
	شم	25/67±2/19	14/67±2/91	13/33±1/76
	تجربی 1	46±2/31	25/67±2/33	21/33±2/08
	تجربی 2	51/67±1/86	33/33±3/18	23/67±1/45
7	کنترل	39/67±1/2	39±2/08	10±1/15
	شم	29/67±0/88	34/33±2/33	13/33±2/4
	تجربی 1	17±1/53	22/67±2/33	24/67±1/45
	تجربی 2	13/67±0/88	18/67±1/86	25/67±3/28
10	کنترل	31/67±3/53	33/33±1/45	29±2/31
	شم	27/33±1/45	21/67±1/6	24±2/65
	تجربی 1	15±2/65	10/33±1/45	13/33±1/76
	تجربی 2	10/67±1/76	10/67±1/2	9/67±0/88
14	کنترل	24±1/53	21/33±0/88	22/67±1/45
	شم	20/67±1/76	16/67±1/76	19/67±0/88
	تجربی 1	14±2	10±1/73	7/67±2/4
	تجربی 2	8/33±2/6	6/33±1/2	3/33±1/2

شیمیایی گیاه یونجه دارای ویتامین‌ها و مواد معدنی مختلف از جمله ویتامین C فراوان (3)، ویتامین A (8)، عنصر روی (10)، اسید آمینه آرژنین (35)، پتاسیم (29) و فلاونوئید (31) می‌باشد. عصاره اندام‌های هوایی رویش گیاه یونجه حاوی ویتامین C فراوان است. ویتامین C یک کوفاکتور برای هیدروکسیلاسیون پرولین و لیزین است که با آهن برای سنتز کلاژن با پیوندهای قوی هیدروژن ضروری می‌باشد (26). از آن جایی که این ویتامین دارای عملکردهای فیزیولوژیک بسیاری در بدن است و اغلب همراه با ترمیم زخم، به دلیل شکل دهی و تنظیم آرایش رشته‌های کلاژن مطرح می‌شود شاید بتوان قسمتی از اثر التیام بخشی عصاره هیدروالکلی اندام‌های رویشی هوایی گیاه یونجه را در بهبود زخم معده، به حضور این ماده مربوط دانست (26). هم چنان که در مطالعات Allardic (1993) مشخص گردید وجود ویتامین C در روند کلاژنیزاسیون و ساخت مخاط تاثیر به سزایی دارد (3). از

میانگین تعداد نوتروفیل و ماکروفاژ در روز چهارم در گروه‌های دریافت کننده عصاره در هر دو دوز ( $P < 0/05$ ) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شم و کنترل دارند و پس از آن کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های شم و کنترل نشان می‌دهند. طی مطالعات انجام شده بر روی روند التیام زخم مشخص شده است، هر عاملی که رگ زایی را تشدید کند موجب تسریع بهبود زخم می‌گردد. شروع ساخته شدن رگ هم‌زمان با فاز فیبروبلاستی می‌باشد و در عرض 2 تا 3 روز بعد از ایجاد زخم شروع و در هفته اول به بیشترین مقدار خود می‌رسد. نتایج بررسی‌های ما نیز این موضوع را تایید می‌کند. زیرا میانگین تعداد فیبروبلاست ( $P < 0/05$ ) در روزهای چهارم و هفتم، در گروه‌های دریافت کننده عصاره در هر دو دوز، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شم و کنترل دارند و پس از آن در روزهای دهم و چهاردهم کاهش معنی‌داری نشان می‌دهند. ترکیبات

پاسخ‌های التهابی در طی دوره بهبود می‌گردد، نیز می‌شود. ویتامین A یکی از اجزای مورد نیاز آبشارهای سیگنالی می‌باشد(1)، که بر طبق این پژوهش‌ها می‌توان یکی از دلایل نتایج تحقیق خود را در خصوص افزایش سرعت روند اپی تلیزاسیون و سرعت پاسخ به عوامل عفونت‌زا در رت‌های دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه یونجه را به این ویتامین نسبت داد.

روی، یکی دیگر از ترکیبات شیمیایی اندام‌های هوایی رویشی گیاه یونجه می‌باشد. طی مطالعاتی ثابت شده است که این عنصر حتی در مقادیر اندک نقش به‌سزایی در بهبود بافت، هم‌چنین نقش کلیدی در سنتز پروتئین، کلاژن و رشد و ترمیم نسوج آسیب‌دیده دارد(19,36). روی یک ماده معدنی بوده و عملکردش به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و فرآیندهای مرتبط با تکثیر سلولی و تکثیر DNA و RNA مرتبط است(7). به دنبال تحقیقات دیگری که انجام شده است، مشخص گردیده که روی برای بهبود بافت آسیب‌دیده لازم و ضروری می‌باشد. می‌توان یکی از دلایل اثر بخشی عصاره هیدرو الکلی اندام‌های هوایی رویشی یونجه را به دلیل وجود پتاسیم در این عصاره دانست. زیرا طی مطالعاتی که بر روی مدل حیوانی انجام گرفته‌اند اثر ضد زخم معده و محافظتی روی(27) ثابت شده است و در اروپا از ترکیب آن با acexamate به‌عنوان یک دارو در درمان زخم معده استفاده می‌شود(14) و از این جهت می‌تواند یکی از عوامل اساسی در پیش‌برد روند بهبود زخم معده توسط عصاره هیدرو الکلی اندام‌های هوایی رویشی گیاه یونجه باشد. مهم‌ترین قسمت فرآیندهای بهبود زخم، تکثیر سلول‌های مبارز با التهاب و کلاژن‌ها می‌باشد که به دلیل وجود روی در این عصاره قابل توجه است. طی مطالعات انجام گرفته، پتاسیم یک کوفاکتور ضروری برای لخته شدن خون می‌باشد(5). از آن جایی که اندام هوایی رویشی گیاه یونجه حاوی پتاسیم می‌باشد، می‌توان

دیگر آثار ویتامین C بر روی زخم و روند بهبود آن که توسط محققان بسیاری مورد بحث قرار گرفته است، خواص آنتی‌اکسیدانی و کاهش احتمال عفونت در محل زخم با تقویت سیستم دفاعی بدن می‌باشد(25). کمبود این ویتامین باعث اختلال در عملکرد فیبروبلاست‌ها شده و با کاهش سنتز کلاژن باعث تاخیر سرعت بهبودی و آسیب‌پذیری مویرگ‌ها می‌شود(5). مشاهده افزایش سرعت آنژیوژنیزس، کاهش طول مدت بهبودی و ترمیم مخاط آسیب‌دیده در نتایج تحقیق حاضر با نتایج حاصل از تحقیقات فوق در یک راستا می‌باشد. بررسی شاخص‌های التهابی نیز در آزمایشات ما تایید می‌کند که میزان این سلول‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره که حاوی ویتامین C بوده، کاهش یافته است. ویتامین A یکی دیگر از اجزای ترکیبات شیمیایی اندام‌های هوایی رویشی گیاه یونجه می‌باشد که باعث افزایش پاسخ‌های التهابی در زخم و به دنبال آن افزایش روند بهبود زخم و کاهش عفونت می‌گردد(28, 3). این ویتامین با افزایش میزان فیبروبلاست، باعث افزایش سنتز کلاژن و تقویت بهبود زخم می‌شود(36, 34). هم‌چنین این ویتامین باعث خنثی‌سازی اثرات کاتابولیسیمی استروئید در روند بهبودی می‌گردد(5). طی مشاهدات بالینی که بر روی انسان‌ها و مطالعات تجربی که بر روی حیوانات انجام شده است نشان داده شد که ویتامین A نقش حفاظتی در مقابل زخم معده با حفاظت از مخاط، در موش‌های تحت درمان با ایندومتاسین برعهده دارد(15, 23). Duck J (1987) طی تحقیقات خود عنوان نمود، ویتامین A در رشد و نمو بافت پوششی و افزایش پیوندهای عرضی کلاژن و بنابراین افزایش استحکام بافت مفید و موثر است(8). سایر مطالعاتی که در زمینه اثرگذاری ویتامین A بر روی روند بهبود زخم انجام شده است، ثابت می‌کند که این ویتامین سبب افزایش تکثیر سلول‌های اپیدرم(32) و سلول‌های التهابی(9) که باعث افزایش

پیشرفت زخم می‌تواند مربوط به اثر آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها باشد که با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و مهار عامل نکروز مانع گسترش زخم و افزایش التهاب می‌گردد (30). Kumar و همکاران در سال 2007 نشان داده‌اند که فلاونوئیدها و تری‌پنوئیدها انقباض زخم و اپی‌تلیزاسیون را افزایش می‌دهند (18). با توجه به این‌که اندام هوایی رویشی گیاه یونجه دارای این ترکیبات است، مشاهده نتایج تحقیق حاضر در زمینه اپیتلیوم‌زایی و ترمیم مخاط موکوس هم راستا با نتایج تحقیقات فوق می‌باشد. یافته‌های حاصل از این بررسی حاکی از آن است که عصاره هیدرو الکلی اندام هوایی رویشی گیاه یونجه به دلیل عناصر موجود در آن اثر ترمیمی بالایی بر زخم معده ناشی از اسید استیک در رت دارد و احتمالاً اثر خود را از طریق کاهش قابل ملاحظه زمان بهبود، افزایش آنژیوژنزیس، افزایش ترشح مخاط، تکثیر سلولی و اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی با تعدیل سیستم ایمنی می‌گذارد.

### تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از مسؤلان محترم مرکز تحقیقات بیولوژیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان که در پیش برد اهداف این تحقیق مرا یاری نمودند.

این گونه در نظر گرفت که شاید این عنصر موجود در عصاره باعث افزایش روند هموستاز و کاهش میزان خون‌ریزی در معده زخم شده به وسیله اسید استیک بوده است. از جمله مواد موثر دیگری که می‌تواند در ترمیم بافت آسیب دیده موثر باشد اسیدهای آمینه می‌باشد. عصاره هیدرو الکلی اندام‌های هوایی رویشی گیاه یونجه دارای اسید آمینه آرژنین است. با توجه به بررسی‌هایی که بر روی خواص آرژنین انجام شده است، این اسید آمینه در سنتز و ساخت نیتریک اکساید (NO) به منظور گشادی عروق دخیل است و باعث گسترش و ارتقای سیستم ایمنی و در نهایت کاهش زمان ترمیم زخم و جراحات می‌گردد (7). شاید بتوان بخشی از اثر گذاری عصاره را به تاثیر این ماده بر روی روند التیام به دلیل کاهش عفونت و کاهش زمان درمان دانست که با نتایج ما هم‌خوانی دارد. فلاونوئیدها با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده، به مهار زخم کمک می‌کنند و از طرفی با مهار لیپولیز از نفوذ عامل نکروز دهنده به موکوس جلوگیری می‌نمایند. فلاونوئیدها زخم‌های نکروز عمیق را دفع و از ورقه ورقه شدن سریع اپیتلیوم جلوگیری می‌کنند (11). مکانیسم احتمالی اثر مهارندگی اندام هوایی رویشی گیاه یونجه در

### منابع

1. Abdelmalek, M., Spencer, J. (2006). Retinoids and wound healing. *Dermatol Surg*, 32(10); 1219-30.
2. Ahmad, N., Zia, Ur., Rehman, N., Akhtar, N., Ali, Sh., Ahmad, M., Ahmad, I. (2013). Effects of *Medicago sativa* on some serum biochemical metabolites in rats. *Int J Agric Biology*, 15; 297-300.
3. Allardice, P. (1993). A- Z of companion planting. Cassell Publishers Ltd.
4. Avinash, K., Abha, D., Ganesh, N.Sh. (2011). Peptic ulcer: a review with emphasis on plants from cucurbitaceae family with anti ulcer potential. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2 (6); 714-1716.
5. Corilee, A., Edward, E. (2000). Nutrition and wound healing. *The Canadian Journal of CME*, 65-74.
7. Dorner, B., Posthauer, M. E., David, Thomas. (2009). The role of nutrition in pressure ulcer prevention and treatment. National Pressure Ulcer Advisory Panel.
6. Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., Briemann, H.L. (2006). Natural products from plants. CRC Press, 8(3); 268-277.
7. Dorner, B., Posthauer, M. E., David, Thomas. (2009). The role of nutrition in pressure ulcer prevention and treatment. National Pressure Ulcer Advisory Panel.
8. Duck, J.A., Ayensu, E.S. (1987). Medicinal plants of china. *Journal of Botanical taxonomy and Geobotany*, 98; 398.
9. Eichner, R., Gendimeinico, G.J., Kahn, M., Mallon, J.P., Capetola, R.J., Mezick, J.A. (1996). Effects of long-term retinoic acid treatment on epidermal differentiation in vivo:

- specimodifications in the programme of terminal dif-ferentiation. British Journal of Dermatology, 135(5); 687-695.
10. Facciola, S., Cornucopia, A. (1990). Source book of edible plants. Kampong Publications Inc.
11. Gonzales, E., Laglesias, I., Caretero, E., Villar, A. (2000). Gastric cytoprotection of bolivian medicinal plan. J Ethnopharmacol, 70; 329-333.
12. Gray, A.M., Flatt, P.R. (1997). Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). Br J Nutr, 78(2); 325-34.
13. Inas, Z.A., Abdallah, A., Hala, A.H., Khattab, A., Gehan, H. (2011). Gastroprotective effect of *Cordia myxa* L. Fruit extract against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. Life Sci J, 8(3); 443-445.
14. Jimenez, E., Bosch, F., Galmes, J.L., Banos, J.E. (1992). Meta-analysis of efficacy of zinc acexamate in peptic ulcer. Digestion, 51; 18-26.
15. Kasper, H., Brodersen, M., Schedel, R. (1975). Concentration of vitamin A, retinol-binding protein and prealbumin in serum in response to stress. A contribution to the prevention of stress ulcers by means of vitamin A. Acta Hepatogastroenterol, 22; 403-408.
16. McKenna, DJ., Janes, K., Hughes, K. (2002). Reishi botanical medicine: The desk reference for major herbal supplements. *the haworth herbal press*: New York, London, Oxford, 825-855.
17. Komeili, G., Sargazi, M., Soluki, S., Maaleki, S., Soeidy, F. (2012). Effect of hydroalcoholic extract of *Carum copticum* seed on the treatment of peptic ulcer induced by ibuprofen in rats. HorizonMed Sci, 18(1); 12-16.
18. Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., Pushpangadan, P. (2007). Ethno pharmacological approaches to wound healing exploring medicinal plants of india. J Ethnopharmacol, 114 (2); 103-113.
19. Langemo, D., Anderson, J., Hanson, D., Hunter, S., Thompson, P., Posthauer, ME. (2006). Nutritional considerations in wound care. Adv Skin Wound Care, 19(6); 297-8, 300-303.
20. Mehrvarz, Sh., Izadyar, B., Nazari, F. (1997). Effect of fundermol ointment on wound healing in comparison with normal saline. Kowsar Medical Journal, 2(2); 95-100.
21. Mousavi Mobarake, Sh., Rahnema, M., Bigdeli, M.R., Nasiri Semnani, SH. (2013). Effect of *Ziziphora clinopodioides* L. Aqueous extract on peptic ulcer induced by acetic acid in rats. Horizon Med Sci, 19(3); 173-177.
22. Mosavi, F., Rahnema, M., Heydarieh, N., Tajabadi Ebrahimi, M. (2013). The effect of Iranian native *Lactobacillus pentosus* on healing of gastric in male wistar rats. Arak Univ Med Sci J, 16 (2) ; 81-91.
23. Mozsik, G., Garamszegi, M., Javor, T. (1989). Cellular energy status of the gastric mucosa and gastric mucosal prevention by vitamin A in indomethacin-treated rats. Int J Tiss React, 11(2); 65-71.
24. Ogara, E. A., Hill, D. J., Maslin, D. J. (2000). Activites of garlic oil, garlic powder, and their dially l constituents against Helicobacter Pylori. Applied and Environmental Microbiology, 66(5); 2269-2273.
25. Ord, H. (2007). Nutritional support for patients with infected wounds. Nurs Br J, 16 (21); 1346-8, 1350-2.
26. Parsons, K.K., Maeda, N., Yamauchi, M., Banes, A. J., Koller, B. H. (2005). Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. Am J PhysiolEndocrinolMetab, 290; 1131-1139.
27. Pfeiffer, C.J., Cho, CH., Cheema, A., Saltman, D. (1980). Reserpine-induced gastric ulcers: protection by lysosomal stabilization due to zinc. Eur J Pharmacol, 61; 347-53.
28. Rashidi, I., Taherimoghadam, M., Mozaffari, A.R. (2005). Study of anti-inflammatory and healing effects of *Achillea millefolium* in the treatment of indumethacin induced gastric ulcer in rat. J Qazvin Univ Med Sci, 33; 9-13.
29. Reilly, P. (1999). Clinical application: *Medicago sativa* extracts. J Naturopathic medicine, 1(1); 25-36
30. Rezaazadeh, SH., Zaringhalam, J., Manaheji, H., Kebryaezadeh, A. (2009). Anti-inflammatory and hyperalgesic activities of *Stachysathorecalyx* on CFA-induced inflammation. J Med Plants, 3(5); 368-376.
31. Shemesh, M., Linder, HR., Ayalon, N. (1972). Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phytoestrogenes and its use in competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol. J Reprod Fertil, 29; 1-9.
32. Suguna, L., Sivakumar, P., Chandrakasan, G. (1996). Effects of *Centella asiatica* extract on dermal wound healing in rats. Indian J Exp Biol, 34(12); 1208-11.
33. Tomas, K. (1988). The physiology of wound healing. Annuals of Emergency Medicin, 17; 1265-1288.

34. Truter, I. (2009). Peptic ulcer disease. drug utilization research unit (DURU). SA Pharmaceutical Journal, 10-20.
35. Williams-Boyce, P.K., Daniel, J.C. (1986). Comparison of ear tissue regeneration in mammals. Journal of Anatomy, 149; 55-63.
36. Williams, JZ., Barbul, A. (2003). Nutrition and wound healing. SurgClin North Am, 83(3); 571-96.
37. Yousefi, M., Shirzad, H., Yousefi, H. (2011). Effect of *Medicago sativa* plant on wound healing in animal model. J ilam Univ Med Sci, 18(4); 7-11.
- 

Archive of SID