

بررسی تجربی فعالیت ضدقارچی موضعی اسانس رزماری بر زخم جلدی عفونی شده با کاندیدا آلبیکنس در موش صحرایی: مطالعه آسیب‌شناسی سلولی

حسین نجاتی^۱، محمدرضا فرهپور^{۲*}، مسلم نیریزنقدهی^۳

چکیده

امروزه اثرات جانبی و توسعه مقاومت دارویی بویژه در آزول‌ها و مشتقات آنها که به منظور درمان عفونت‌های کاندیدا در هر دو شکل موضعی و دهانی به کار می‌روند، منجر به استفاده از مواد بیولوژیک گردیده است. یکی از گیاهان دارویی که به شکل رایج از دیر باز مورد استفاده قرار گرفته است، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) می‌باشد. در این مطالعه که بر روی ۷۵ سر موش صحرایی نژاد نر ویستار (با محدوده وزنی 210 ± 10 g) انجام شد، بعد از بیهوشی عمومی، یک زخم مربع شکل به ابعاد ۱/۵ در ۱/۵ سانتیمتر، محل زخم بلافاصله توسط مخمر کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) آلوده گردید. سپس موش‌های صحرایی آزمایش در سه گروه ۲۵ تایی (کنترل و گروه‌های تحت درمان با پمادهای ۱/۵ و ۳ درصد) به طور تصادفی توزیع و هر گروه خود به ۵ زیرگروه ۵ تایی (گروه‌های نمونه‌برداری در روزهای مختلف) تقسیم شدند. در طول اجرای طرح، در پایان روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ از زخم‌های گروه‌های مختلف، به منظور بررسی‌های آسیب‌شناختی، توسط پانچ مخصوص بیوپسی، نمونه اخذ گردید. بررسی‌ها نشان داد بکارگیری پماد ۱/۵ و ۳٪ حاصل از اسانس رزماری، در مقایسه با گروه کنترل موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان عفونت و افزایش حجم کلاژن و تولید بافت پوششی شده است. براساس نتایج بدست آمده روند بهبود زخم در پماد درمانی ۳٪ در مقایسه با دوز پایین‌تر و کنترل بهتر بوده است.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، رزماری، زخم عفونی، هیستوپاتولوژی، موش صحرایی.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱

مقدمه

اخیراً استفاده از گیاهان دارویی به منظور حفظ و بهبود سلامتی و نیز جهت درمان بیماری‌های مختلف انسانی افزایش یافته است. در حدود ۶۰٪ جمعیت جهان و ۹۰-۶۰ درصد جمعیت کشورهای در حال توسعه برای مراقبت‌های بهداشتی

اولیه خود به طب سنتی تکیه می‌کنند (۹). امروزه اثرات جانبی و توسعه مقاومت دارویی بویژه در آزول‌ها و مشتقات آنها که به منظور درمان عفونت‌های کاندیدا در هر دو شکل موضعی و دهانی به کار می‌روند، منجر به استفاده از مواد بیولوژیک گردیده است (۱۹ و ۱). کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) فلور طبیعی غشای مخاطی است (۱). این ارگانیزم یک پاتوژن فرصت طلب می‌باشد به این ترتیب که تغییر در شرایط محیطی مانند نقص شدید سیستم ایمنی، می‌تواند آن را به شکل مهاجم تبدیل نموده و موجب توسعه عفونت‌های مزمن و غیر قابل درمان و حتی مرگ گردد (۱۳). به علاوه تقریباً یک سوم تمام داروهای سنتی برای درمان زخم‌ها و اختلالات پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در مقایسه با داروهای مدرن سنتتیک ۳-۱ درصد است (۱۱). این درصدها دلیل روشنی برای نقش حیاتی گیاهان دارویی، به عنوان گزینه‌های درمانی در طب مرسوم است.

نقش گیاهان دارویی در مدیریت زخم شامل ضدعفونی کردن و ایجاد شرایط مناسب برای فرایند طبیعی التیام است (۱۷). *Rosmarinus officinalis* با نام عمومی رزماری یک گیاه پایا با برگ‌های خطی همیشه سبز معطر است که به عنوان ادویه و چاشنی در مواد غذایی به کار برده می‌شود (۶). بخش‌های هوایی این گیاه در درمان بیماری‌های پوستی مانند ریزش مو، عفونت‌ها و بهبود زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶ و ۳).

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران

*۲- گروه علوم درماتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
mf78s@gmail.com

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

اضافه گردید. پماد پایه از ترکیب ۷۰ گرم وازلین و ۳۰ گرم اوسرین آماده شده بود (۸).

حیوانات مورد آزمایش

۷۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم و محدوده سنی ۹ الی ۱۱ هفته از محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردیدند. حیوانات به مدت ۱۰ روز در قفسهای جداگانه در محل آزمایش به منظور تطابق به شرایط محیطی جدید نگهداری شدند. قفسهای نگهداری حیوانات از نظر شرایط دمایی (22 ± 3 درجه سانتیگراد)، رطوبت (60 ± 5 درصد) 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.

نحوه تیمار زخم ها

پس از ایجاد زخم، ۷۵ سر موش مورد مطالعه به طور تصادفی به سه گروه ۲۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول (گروه کنترل) توسط پماد پایه (ترکیب ۷۰ گرم وازلین و ۳۰ گرم اوسرین) و گروههای دوم و سوم به ترتیب توسط پمادهای درمانی ۱/۵ و ۳ درصد اسانس رزماری تیمار شدند. در حدود ۱ گرم پماد به طور موضعی، به شکل روزانه (یک بار در روز) و در محدوده زمانی بین ۱۹-۱۸ عصر، بر روی زخم تا زمان بهبودی کامل قرار داده شد.

آماده سازی سوسپانسیون مخمر

در ابتدا، سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس (PTCC 5022) بر روی محیط کشت ساپورود دکستروز آگار همراه با کلرامفنیکل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. سپس با استفاده از استاندارد نیم مک فارلند و مقایسه سوسپانسیون قارچی با آن و ایجاد کدورت یکسان، رقت مورد نظر تهیه گردید (نگاره ۱) (۴).

بهبود زخم برای حذف بافت‌های آسیب دیده و پاتوژن‌های مهاجم از بدن و همچنین بازیابی پیوستگی پوست در نظر گرفته می‌شود (۱۰). خواص آنتی اکسیدانی و فارماکولوژیکی رزماری این گیاه را به یک منبع عالی جهت بررسی در اهداف نوین پزشکی در زمینه بهبود زخم مبدل نموده است.

از این رو در بررسی حاضر اثرات ضد قارچی اسانس رزماری بر عفونت‌های جلدی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایش بر روی نمونه موجود زنده به شکل آسیب شناختی مورد مطالعه قرار گرفته است.

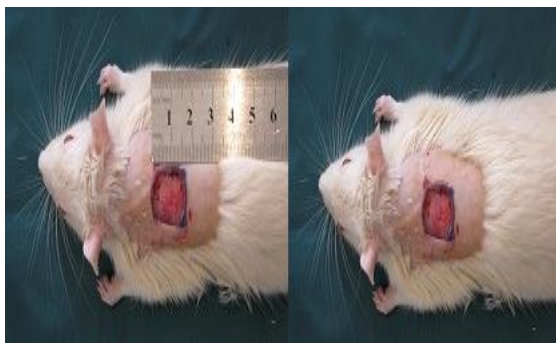
مواد و روش کار

آماده سازی اسانس گیاه

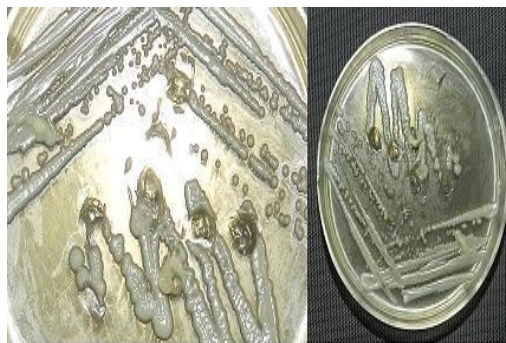
برگ‌های تازه گیاه رزماری در خردادماه سال ۱۳۹۲، از مرکز دانش بنیان زرین گیاه ارومیه، باغ گیاهان دارویی شهرداری ارومیه برگ‌های جمع آوری و شستشو گردیده و پس از تایید دپارتمان علوم گیاهی و کشاورزی دانشگاه ارومیه، در سایه و در دمای اتاق ($24-23$ درجه سانتیگراد) خشکانیده و خرد شدند؛ سپس به منظور تهیه اسانس گیاه به مقدار مورد نیاز، در هر بار اسانس گیری در حدود ۱۰۰ گرم از برگ پودر شده گیاه رزماری در بالن ۱ 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 بدست آمده پس از آگیری با سولفات سدیم انیدرید، درون شیشه رنگی کوچک جمع‌آوری گردید و تا روز ساخت پماد در یخچال نگهداری گردید. (۲۰).

تهیه پماد پایه

به منظور آماده سازی پمادهای درمانی ۱/۵ و ۳ درصد، به ترتیب ۱/۵ و ۳ سی سی از اسانس خالص تهیه شده از برگ‌های گیاه رزماری به ۱۰۰ گرم پماد پایه که از قبل تهیه شده بود،



نگاره ۲: تصویر محل و اندازه زخم ایجاد شده در پشت موش



نگاره ۱: تصویر محل و اندازه زخم ایجاد شده در پشت موش

تهیه مقاطع هیستوپاتولوژیک

در روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ پس از جراحی از زخم‌های گروه‌های کنترل و درمانی نمونه‌ی بافتی برداشته شد. بدین ترتیب که ۵ حیوان بطور تصادفی از هر گروه انتخاب گردید و پس از ایجاد بیهوشی به روش ذکر شده و انجام عمل اسکراب معمول جراحی، تحت شرایط آسپتیک توسط پانچ بیوپسی، نمونه‌ای به قطر ۷ میلی‌متر از تمام ضخامت بافت التیامی اخذ گردید. نمونه‌ی بافتی اخذ شده به منظور پایدار کردن در فرمالین ۱۰٪ خنثی بافردار قرار داده شده و به آزمایشگاه پاتولوژی جهت انجام روش استاندارد تهیه مقاطع آسیب‌شناسی و سایر مراحل تثبیت، بلوک زنی و تهیه مقطع متقل گردید. پس از تثبیت و قالب‌گیری نمونه‌های بافتی در پارافین (بلوک‌زنی)، توسط میکروتوم مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش همتوکسیلین-اِئوزین (جهت شمارش سلولی) رنگ‌آمیزی گردید (۱۸). بر اساس جدول ۱ پارامترهای آسیب‌شناختی نشان دهنده پیشرفت ترمیم زخم بر اساس امتیازدهی گزارش گردید (۱۵).

نحوه ایجاد زخم

پس از القای بیهوشی عمومی با تزریق عضلانی ۵mg زایلازین ۲٪ و ۵۰mg کتامین ۰.۵٪، موش‌ها به صورت شکمی بر روی میز جراحی قرار گرفتند و سپس سطح پشتی موش‌ها از ناحیه بین دو کتف تا ایلئوم آماده سازی و اسکراب جراحی شد. پس از آماده سازی محل زخم و ضد عفونی نمودن محل زخم با الکل ۷۰ درجه، زخم تمام ضخامت به شکل مربع (۱/۵×۱/۵ سانتیمتر) در ناحیه بین دو کتف ایجاد گردید (نگاره ۲). بلافاصله پس از ایجاد زخم، محل زخم توسط ۰/۵ml از سوسپانسیون مخمر کاندیدا آلبیکنس آلوده گردید. سپس موش‌های صحرایی آزمایش در سه گروه ۲۵ تایی (کنترل، پماد ۱/۵٪ و پماد ۳٪) به طور تصادفی توزیع و هرگروه خود به ۵ زیرگروه ۵ تایی (گروه‌های نمونه برداری در روزهای مختلف) تقسیم شدند. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت (به منظور کلونیزاسیون مخمر) درمان آغاز گردید (۱۹ و ۸).

جدول ۱. پارامترهای آسیب‌شناختی نشان دهنده پیشرفت ترمیم زخم و نحوی رتبه بندی آنها.

درجه بندی	سلول‌های التهابی	نو زایش 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 آسیب شناختی بافت پوست در حال ترمیم بصورت کیفی انجام شد. جهت مطالعات آماری متغیرهای ترتیبی از نرم افزار spss ورژن ۱۸ و آزمون Kruskal-Wallis و فریدمن استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از بررسی نتایج حاصل از پمادهای درمانی حاوی اسانس گیاه رزماری در مقایسه با یکدیگر و گروه کنترل، مشخص گردید از نظر شدت آماس و حضور سلول‌های ایمنی چندهسته‌ای در روز چهارم، در گروه درمانی با پماد ۳٪، کاهش چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد ($p < 0/05$). 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 کاسته شده است. کاهش روند مذکور با سرعت کندتری نسبت به گروه درمانی ۱/۵٪ همراه است؛ اما در گروه کنترل، روند کاهش آماس با سرعت بسیار کندتری نسبت به گروه‌های درمانی، به خصوص گروه ۳٪، ادامه یافته است (نگاره ۳).

در بررسی آسیب شناختی 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 کنترل تشکیل شده است ($p < 0/05$).

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

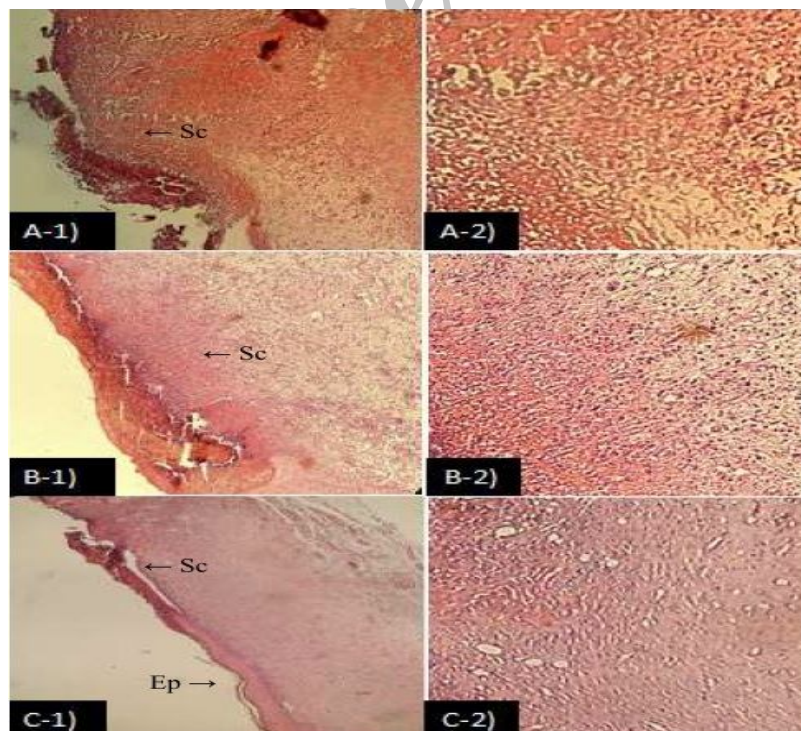
خود رسیده و بعد روند کاهشی پیدا می‌کند، در حالیکه بیشترین میزان فیبروبلاست در گروه کنترل، در روز شانزدهم، کمتر از میزان دیده شده در روز دوازدهم گروه درمانی ۳٪ بود. همچنین از لحاظ سنتز کلاژن و تراکم کلاژنی، در نمونه‌های حاصل از پماد ۳٪ سنتز کلاژن از همان روز چهارم شروع و سیر صعودی دارد؛ در مقایسه، به ترتیب در گروه‌های درمانی ۱/۵٪ و کنترل تراکم کلاژنی آهسته تر آغاز شده و با روند متوسطی ادامه می‌یابد؛ به شکلی که حداکثر میزان سنتز و تراکم کلاژن در گروه‌های مذکور در روز بیستم بوده که تا حدی با میزان آن در روز شانزدهم گروه درمانی ۳٪ برابری می‌کند ($p < 0/05$).

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 شانزدهم پل بافت پوششی کامل شده و لایه شاخی هم بوجود می‌آید؛ در حالیکه این روند در گروه درمانی ۱/۵٪ با سرعت کندتر، و در گروه کنترل بسیار کندتر می‌باشد بطوری که شروع نوزایش بافت پوششی از روز دوازدهم بوده و با روند متوسطی تا روز شانزدهم ادامه می‌یابد و در روز بیستم بعد از القا عفونت پل بافت پوششی کامل می‌گردد (نگاره ۴). حداکثر میزان اپیتلیزاسیون در گروه کنترل در روز بیستم بوده که تا حدی با میزان آن در روز شانزدهم گروه درمانی ۳٪ برابری می‌کند ($p < 0/05$).

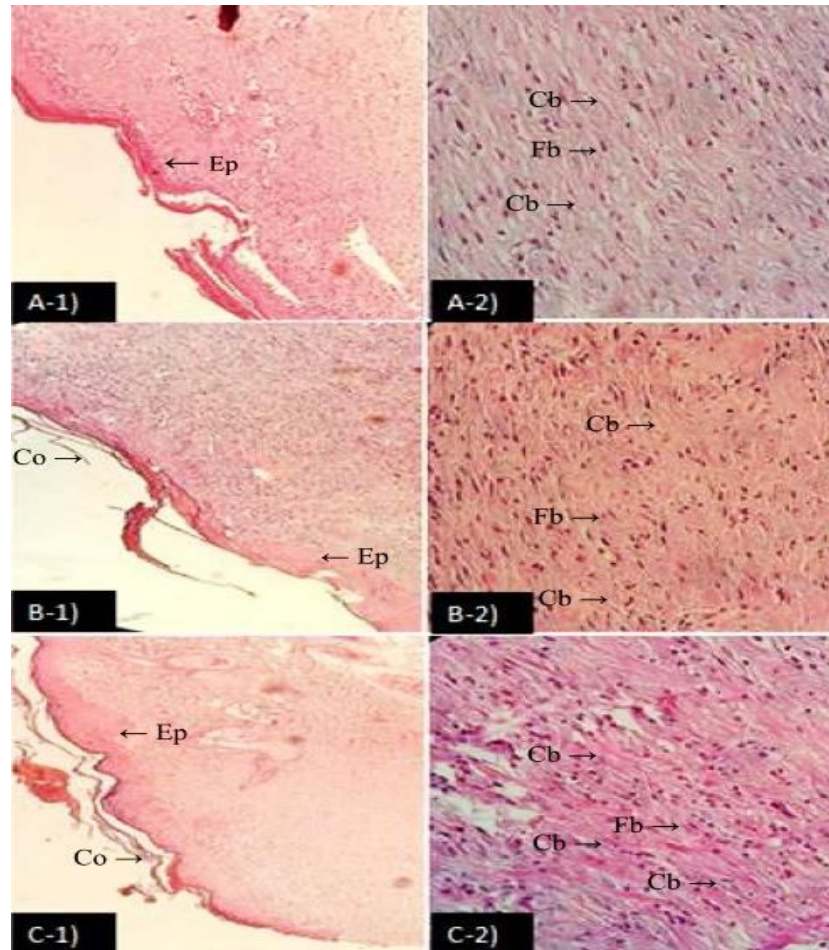
جدول ۲- نتایج حاصل از میانگین \pm خطای استاندارد برآوردهای بررسی آسیب‌شناسی گروه‌های مختلف

گروه‌های مورد آزمایش	روزهای نمونه برداری	پارامترهای مورد سنجش			
		شدت آماس	نوزایش عروقی	فیبروبلاست	میزان کلاژن
	شاهد	++++	+	+	-
روز چهارم	رزماری ۱/۵٪	+++	+	++ ^b	-
	رزماری ۳٪	+++ / +++	++ ^a	+++ ^a	+
روز هشتم	شاهد	+++ / +++	++	++	-
	رزماری ۱/۵٪	++	+++ ^{ab}	+++ ^b	+
	رزماری ۳٪	+	+++ ^{ab}	+++ ^a	++ ^a
روز دوازدهم	شاهد	++	+	+++	+
	رزماری ۱/۵٪	+	++	+++	+++ ^b
	رزماری ۳٪	- ^a	++	++++	+++ ^a
روز شانزدهم	شاهد	+	+	++	+++ ^b
	رزماری ۱/۵٪	-	++	++	+++ ^b
	رزماری ۳٪	-	++	+++ ^a	+++ ^a
روز بیستم	شاهد	-	+	+	+++ ^b
	رزماری ۱/۵٪	-	+	+	+++ ^{ab}
	رزماری ۳٪	-	+	+	+++ ^{ab}

b.a: حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).



نگاره ۳. ریزنمای میکروسکوپی از سطح مقطع پوست پس از ۴ روز از ایجاد عفونت در محل زخم؛ A-1 و A-2؛ B-1 و B-2؛ C-1 و C-2 به ترتیب گروه‌های شاهد، پمادهای ۱/۵٪ و ۳٪ اسانس رزماری با بزرگنمای‌های ۴X و ۱۰X. دلمه (Sc)، بافت پوششی نوزایشی (Ep) (H&E).



نگاره ۳: ریزنمای میکروسکوپی از سطح مقطع پوست پس از ۱۶ روز از ایجاد عفونت در محل زخم؛ A-1 و A-2؛ B-1 و B-2؛ C-1 و C-2 به ترتیب گروه‌های شاهد، پمادهای ۱/۵٪ و ۳٪ اسانس رزماری با بزرگنمایی‌های ۴X و ۱۰X. دلمه (Sc)، بافت پوششی نوزایشی (Ep)، سلول فیبروبلاست (Fb)، باندهای کلاژنی (Cb)، و لایه شاخی (Co) (H&E).

کمک به بهبود و بازسازی آسیب بافتی است. رویدادهای طبیعی بعدی التیام زخم در سه مرحله تقریباً جدا از یکدیگر روی می‌دهد: مرحله تشکیل دلمه و التهابی، مرحله پرولیفراسیون سلول‌های بافت همبندی و مرحله بلوغ (۷). در مرحله اول، پس از چند ساعت از وقوع زخم، سلول‌های فاز التهابی (سلول‌های ایمنی چند هسته‌ای)، جهت پاکسازی، به محل زخم مهاجرت می‌کنند. مشخص گردیده افزایش میزان سلول‌های مذکور موجب افزایش آماس در زخم می‌گردند (۷)؛ در پژوهش اخیر مشخص گردید که بصورت معنی‌داری ($p < 0.05$) از شدت آماس و حضور سلول‌های ایمنی چند هسته‌ای (نوتروفیل‌ها)

بحث

مطالعات پیشین حضور آنتی‌اکسیدان‌های قوی مانند کارنوزول (Carnosol)، رزمانول (Rosmanol)، اپی‌رزمانول (Epirosmanol)، کارنوسیک اسید (carnosic acid)، بورنتول (Borneol)، وربنون (Verbenone) و رزمارینیک اسید (Rosmarinic acid) را در اسانس حاصل از بخش‌های هوایی گیاه رزماری به اثبات رسانده‌اند (۱۲ و ۵ و ۲). بهبود زخم فرآیند نوزایش طبیعی پیچیده‌ای از سلول‌های پوست به منظور کاهش یا محدود کردن اسکار و همچنین

و شروع نوزایش بافت پوششی در روزهای هشتم و دوازدهم بعد از القا عفونت در زخم‌های درمان شده، بخصوص در دوز بالاتر، گشته است (جدول ۲). در مطالعات متعددی گزارش گردیده که تغییرات یاد شده در این مرحله می‌تواند در اثر وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی عامل دارویی باشد (۱۱ و ۳)؛ و از آنجایی که وجود این خاصیت در اسانس رزماری نیز به اثبات رسیده است (۱۲ و ۵)، می‌توان چنین بیان کرد که سرعت روند التیام در مرحله دوم، در زخم‌های درمان شده با اسانس رزماری افزایش یافته است.

مرحله سوم روند التیامی، مرحله بلوغ است که از روز چهاردهم بعد از وقوع زخم آغاز می‌گردد (۷). طی این مرحله افزایش سنتز کلاژن و سازماندهی دستجات کلاژنی، تکامل بافت گرانوله به بافت اسکار و حذف سلول‌های دیگر توسط فرآیند آپوپتوز اتفاق خواهد افتاد (۷). در پژوهش اخیر مشخص گردید که کاربرد موضعی اسانس رزماری، بصورت معنی‌داری ($p < 0/05$) موجب افزایش سنتز کلاژن و همچنین افزایش دستجات کلاژنی از یک سو و از سوی دیگر کامل شدن پل بافت پوششی در روزهای شانزدهم و بیستم بعد از القا عفونت در زخم‌های درمان شده، بخصوص در دوز بالاتر، گشته است (جدول ۲). یافته‌های اخیر، با گزارشات دیگر محققین مطابقت دارد (۱۶ و ۳).

توانایی التیام بخشی اسانس گیاه رزماری در کاربرد موضعی می‌تواند بر اساس تاثیر قدرت ضد میکروبی (۱۴ و ۲)، ضد التهابی (۲۰) و آنتی‌اکسیدانی (۱۲ و ۵) این گیاه توضیح داده شود که به خوبی در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. ترکیبات عمده استخراج شده از اسانس برگ‌های گیاه رزماری که دارای قدرت مهاری در برابر رشد پاتوژن‌ها، کاهش پاسخ‌های التهابی و محافظت از بافت زنده هستند؛ عموماً شامل ترپنوئیدها (Terpenoids) و پلی‌فنل‌هایی (polyphenols) مانند کائوزول (Carnosol)، کارنوسیک اسید (Carnosic acid) و رزمارینیک اسید (Rosmainic acid) می‌باشند (۱۲).

در زخم‌های عفونی درمان شده توسط پماد حاوی اسانس رزماری، بخصوص در دوز بالاتر، کاسته شده است. این امر را می‌توان به وجود ترکیبات آنتی‌باکتریال اسانس رزماری از جمله رزمارینیک اسید (۱۴ و ۲) و همچنین خاصیت ضدالتهابی اسانس مذکور نسبت داد (۲۰ و ۲). در ادامه، در اواسط این مرحله (مرحله اول) از شدت حضور سلول‌های ایمنی چند هسته‌ای کاسته شده و بجای آنها بر میزان سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای افزوده می‌گردد. حضور سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای بویژه ماکروفاژها، به منظور ترشح انواع سیتوکین‌های موثر بر روند التیام، و همچنین فراخوان، جهت مهاجرت فیبروبلاست‌ها به محل زخم، ضروری است (۷). از سوی دیگر، در اواخر مرحله اول روند التیامی، و با کاهش میزان عوامل عفونت‌زا و آماس زخم، نوزایش عروقی جهت تشکیل بافت جوانه‌ای آغاز می‌گردد (۷ و ۱۰). در پژوهش اخیر مشخص گردید که کاربرد موضعی اسانس رزماری، بصورت معنی‌داری ($p < 0/05$) موجب افزایش نوزایش عروقی در زخم‌های درمان شده، بخصوص در دوز بالاتر، گشته است (جدول ۲)، که این امر با یافته‌های دیگر محققین مطابقت دارد (۱۶ و ۳).

مرحله دوم روند التیامی، مرحله پرولیفراسیون سلول‌های بافت همبندی می‌باشد که از روز سوم بعد از وقوع زخم آغاز می‌گردد (۷). حین این مرحله، نوزایش عروقی، رسوب کلاژن، رشد مجدد 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 (۷). در پژوهش اخیر مشخص گردید که کاربرد موضعی اسانس رزماری، بصورت معنی‌داری ($p < 0/05$) موجب افزایش مهاجرت فیبروبلاست‌ها

- mice deficient for interleukin-10. *Am. J. Pathol.* 170(1):188-202.
8. Farahpour, M., Habibi, M. (2012): Evaluation of the wound healing activity of an ethanolic extract of Ceylon cinnamon in mice. *Vet. Med.* 57(1):53-7.
 9. Kunwar, R.M., Bussmann, R.W. (2008): *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* J. Ethnobiol. Ethnom. 4:24.
 10. Lerman, O.Z., Galiano, R.D., Armour, M., Levine, J.P., Gurtner, G.C. (2003): Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am. J. Pathol.* 162(1):303-12.
 11. Mantle, D., Gok, M.A., Lennard, T. (2001): Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. *Adv. dru. React. Toxicol. Rev.* 20(2):89-103.
 12. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A.A. (2006): Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radic. Res.* 40(2):223-31.
 13. Murray, C.K., Loo, F.L., Hospenthal, D.R., Cancio, L.C., Jones, J.A., Kim, S.H., et al. (2008): Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns. *Burns.* 34(8):1108-12.
 14. Oluwatuyi, M., Kaatz, G.W., Gibbons, S. (2004): Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry.* 65(24):3249-54.
 15. Ozay, Y., Ozyurt, S., Guzel, S., Cimbiz, A., Olgun, E.G., Kasim, Cayci, M. (2010): Effects of *Equisetum arvense* Ointment on Dermal Wound Healing in Rats. *Wounds.* 22(10):261.

با توجه به یافته های آسیب شناختی بدست آمده از پژوهش اخیر، پماد حاوی اسانس رزماری موجب کاهش عفونت‌زایی ناشی از مخمر کاندیدا آلیکنز و تسریع روند بهبود زخم پوستی عفونی شده، در مجموع پماد ۳٪ اسانس رزماری از لحاظ تاثیرگذاری 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.

فهرست منابع

1. Agarwal, V., Lal, P., Pruthi, V. (2010): Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 43(5):447-51.
2. Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., et al. (2004): Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 52(11):3530-5.
3. Barakat, Abu-Rmailah, B., Afifi, F. (2000): Treatment with medicinal plants in Jordan. *Dirasat. Med. Bioll. Sci.* 27(1):53-74.
4. Brown, A.E. (2009): *Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology, Short Version: McGraw Hill.*
5. Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Dinotta, F., Geraci, D., Morganti, P. (2000): Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *Int. J. Tissue React.* 22(1):5-13.
6. CA R. (1999): Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp. Biol.* 37:124-31.
7. Eming, S.A., Werner, S., Bugnon, P., Wickenhauser, C., Siewe, L., Utermöhlen, O., et al. (2007): Accelerated wound closure in

16. Pieroni, A., Muenz, H., Akbulut, M., Başer, K.H.C., Durmuşkahya, C. (2005): Traditional phytotherapy and trans-cultural pharmacy among Turkish migrants living in Cologne, Germany. *J. Ethnopharmacol.* 102(1):69-88.
17. Priya, K.S., Gnanamani. A., Radhakrishnan, N., Babu, M. (2002): Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. *J. Ethnopharmacol.* 83(3):193-9.
18. Sasidharan, S., Nilawatyi, R., Xavier, R., Latha, L.Y., Amala, R. (2010): Wound healing potential of *Elaeis guineensis* Jacq leaves in an infected albino rat model. *Molecules.* 15(5):3186-99.
19. Sullivan, D.J., Moran, G.P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C., et al. (2004): Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS. yeas. Res.* 4(4-5):369-76.
20. Takaki, I., Bersani-Amado, L., Vendruscolo, A., Sartoretto, S., Diniz, S., Bersani-Amado, C., et al. (2008): Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *J. Med. Food.* 11(4):741-6.