فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۸، جلد ۱۵، شماره ۲، بهار ۱۴۰۱ صفحه۱۳ تا ۲۲
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

چرخه سنتز و تغییرکلاژن در ترمیم زخم های پوستی توسط ژل تازه آلوئه ورا در موش: دخالت رسپتور فاکتور رشد فیبروبلاستی

حمیرا جعفرزاده[۱]، **مهران عربی**[۲]
۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه،دانشگاه شهرکرد،شهرکرد.ایران.
۲- دانشیار فیزیولوژی گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد،شهرکرد. ایران. mehranarabi@hotmail.com

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: اســتفاده از آلوئه ورا(*Aloe barbadensis* Miller) نقش مهمی را در ترمیم زخم ها ایفا می نمایند. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر درمانی ژل تازه آلوئه ورا در ترمیم زخم های باز پوستی در موش بوده است.

روش کار: گروه های موش های سـوری(با سـه تکرار) شـامل ۱) کنترل کاذب(شـم): زخم با تیمار سـرم فیزیولوژیکی و ۲) زخم با تیمار ۲ گرم ژل آلوئه ورا بودند. در پشت هر موش و در دو طرف ستون مهره ها در ناحیه خاجی دو زخم مساوی به قطر ۱۰ میلی متر با برداشـت ضـخامت کامل پوسـت ایجاد گردید. در روزهای ۸ و ۱۶پس از ایجاد زخم ها نمونه برداری های بافتی از زخم ها به منظور ارزیابی بیان ژن رسپتور فاکتور رشـد فیبروبلاسـتی(FGF-R) به کمک RT-PCR به عمل آمد. در همین روزها نمونه های ادرار جهت سنجش غلظت هیدروکسی پرولین(HP) به عنوان شاخص چرخه سنتز و تغییر کلاژن توسط کیت مربوطه به انجام رسید.

یافته ها: نتایج ما نشـان داد که کاربرد ژل تازه آلوئه ورا موجب افزایش بیان ژن FGF-R در مقایسـه با دو گروه دیگر یعنی کنترل منفی و شم گردیده است(P> ۰/۰۵). هم چنین، غلظت HP ادرار در مقایسه با دو دیگر افزایش معنی داری را نشان داد(P> ۰/۰۵).

نتیجه گیری: ژل تازه آلوئه ورا قادر به ترمیم زخم ها از طریق افزایش فعالیت چرخه سـنتز و تغییر کلاژن بوده و می توان این ژل را به عنوان یک کاندید خوب برای ترمیم زخم ها در حیوانات و انسان در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: ژل آلوئه ورا، پوست موش، ترمیم زخم، فاکتور رشد، چرخه سنتز و تغییر کلاژن.

مقدمه

پوست بزرگ ترین اندام در بدن جانوران بوده که با تنظیم تبادلات داخل و خارج بدن موجب برقراری هومئوستازی بافتی می شود. در زمان بروز زخم در پوست مجموعه ای از پاسخ های سلولی و خارج سلولی شامل: انعقادخون، التهاب، زایش اپیتلیوم جدید، آنژیوژنز، سنتز فیبرهای کلاژن، انقباض زخم و در نهایت بازآرایی بافتی وارد عمل شده تا ترمیم زخم (Wound healing) صورت پذیرد. تنظیم درست و به موقع این پاسخ ها، نیازمند فعال شدن برخی سیستم های ژنی است. در فرایند ترمیم زخم به منظور مهاجرت های سلولی و بازآرایی های بافتی لازم است تا با سنتز و ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها، ماتریکس خارج سلولی نیز ترمیم شده و وارد عمل شوند. در همین ارتباط فیبروبلاست ها در پاسخ به فاکتورهای رشد اقدام به ترشح و سنتز هر چه بیش تر ماتریکس خارج سلولی به ویژه فیبرهای کلاژن می کنند(۵،۲۷). در فرایند روند ترمیم زخم مجموعه ای از فاکتور های رشد در محل آسیب بافتی افزایش تولید و ترشح یافته که از آن جمله می توان به فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و رسپتور آن (FGF-R) اشاره نمود. بررسی ها نشان داده که ۲۲ عضو خانواده FGF با استفاده از واسطه های پروتئین کینازی موجب القای روند میتوز در سلول هدف خود می شوند. برای مثال FGF1 از پلاکت و ماکروفاژ ترشح شده و موجب فعال سازی لوکوسیت ها و نیز تحریک اپی تلیزاسیون و پیشبرد روند آنژیوژنز و سنتز رشته های کلاژن

در موضع زخم شده است. FGF7 نیز از فیبروبلاست ها ترشح و موجب تحریک و بازسازی اپی تلیوم در طی روند ترمیم خواهد شد(۳۵). در محل زخم پلاکت ها باعث افزایش بیان فاکتور های رشد مختلف از جمله PDGF و EGF گردیده که این فاکتورها به نوبه خود موجب تحریک میتوزی و افزایش بیان ژن FGF7 در فیبروبلاست ها می شوند. رسپتورهای FGF از نوع تیروزین کینازی بوده و دارای ۴ رده(FGF-R1-4) هستند. برای مثال رسپتور نوع R3 بیش تر در غشای سلول های اپی تلیومی و کراتینوسایت ها مستقر بوده و کشش زیادی نسبت به FGF1&2دارد(۱۳،۳۵، ۱۰). این رسپتورها موجب فعال سازی چندین مسیر سیگنال رسانی نظیرPKB ، PLC و MAPK در درون سلول هدف می شوند. بررسی ها نشان داده که فعال شدن مسیر MAPK موجب پیشبرد روند آنژیوژنز و تکثیر سیستم اندوتلیوم می گردد. فعال شدن مسیرهای فیدبک منفی مثل ERK1/2 موجب فسفوریلاسیون و غیرفعال شدن FGF-R ها می شود. آزمایشات نشان داده که در ترمیم زخم ها میزان تولید mRNAهایFGF-R1 ، FGF-R2، FGF-R5وFGF-R7 بافتی افزایش معنی داری را نشان می دهد(۱۰،۲۹). چرخه سنتز و تغییر Turnover) فیبرهای کلاژن در پوست از اهمیت زیادی در استحکام و عملکرد این بافت برخوردار بوده و در طی ترمیم زخم های پوستی نیز این چرخه با ردیابی و سنجش اسید امینه هیدروکسی پرولین در ادرار، نمونه زخم و خون قابل اندازه گیری است و بنابراین با این ارتباط مستقیم، هر گونه افزایش در غلظت هیدروکسی پرولین معادل با ترمیم بهتر و کامل تر زخم در نظر گرفته می شود(۸). در برخی از بیماری ها نیز نظیر فیبروز حاد کبدی و مشکلات عضلانی، میزان هیدروکسی پرولین در مایعات بدن افزایشی معنی دار را نشان می دهد. معمولاً میزان کلاژن و هیدروکسی پرولین در ۷ روز پس از ایجاد زخم به حداکثر میزان خود رسیده و با گذشت زمان به سطح طبیعی و اولیه خود برمی گردد. در لایه کلاژن دار پوست، با همکاری اسکوربات سنتز هیدروکسی پرولین صورت گرفته که نتیجه آن افزایش استحکام فیبرهای کلاژن و کامل شدن ساختار پوست است(۸،۲۸،۲۹). گیاه صبر زرد یا آلوئه ورا (*Aloe vera*) (Aloe barbadensis Miller) متعلق به خانواده Xanthorrhoeaceae بوده و دارای برگ های گوشتی آبدار محتوی ژل است. گلیکوپروتئین های موجود در این ژل موجب مهار تورم و درد و نیز تسریع روند ترمیم زخم گردیده و پلی ساکاریدهای آن نیز در تحریک روند بهبود زخم ها وارد عمل می شوند. ۹۹ درصد ترکیب این گیاه آب بوده و تمامی مواد موثر و با فعالیت زیستی آن در یک درصد محتوی آن یافت می شوند(۸). در داروسازی از ترکیبات مختلف این گیاه پماد، قرص و کپسول استفاده می گردد. ژل آلوئه ورا دارای خواص ضد میکروبی و ضد التهابی بوده و مصرف خوراکی آن به عنوان آنتی اکسیدان باعث تقویت سیستم ایمنی بدن می شود(۱۹). در این ژل ۷۵ نوع ماده موثر وجود داشته که بیش تر آنان پلی ساکاریدی هستند. وجود نوعی سینرژی بین این مواد موجب بروز اثرات درمانی آلوئه ورا می شود. در میان این پلی ساکاریدها ترکیب اسمان(Acemannan)، نوعی مزوگلیکان غنی از مانوز، واجد قدرت ترمیم کنندگی زخم ها است. این ترکیب با تحریک برخی رسپتورهای فاکتورهای رشد واقع بر سطح فیبروبلاست ها موجب افزایش تولید و ترشح کلاژن در محل ترمیم زخم می شود(۴،۸،۱۹). مطالعات نشان داده که در محل ترمیم زخم ژل آلوئه ورا از یک طرف موجب افزایش میزان فیبرهای کلاژنی شده و از طرف دیگر با برقراری اتصالات عرضی بین این فیبرها موجب افزایش استحکام ساختار پوست در آن محل می گردد(۱۳). در ترمیم زخم، توانایی آلوئه ورا در بازسازی اپی تلیوم مربوط به عملکرد گلیکوپروتئین G1G1M1DI2 در ژل آن است(۴،۳۰). زخم های تیمار

شده با آلوئه ورا در مقایسه با دیگر گروه ها از آنژیوژنز بیش تر و بیان افزایش یافته ژن VEGF(فاکتور رشد اپی تلیومی- رگ خونی) در موضع زخم برخوردار هستند(۴). علاوه بر این موارد، نجفی و همکاران (۱۵) و جعفرزاده و همکاران(۲۱) به ترتیب نشان دادند که استفاده از ژل آلوئه ورا در ترمیم زخم های باز پوستی موش موجب افزایش معنی دار بیان ژن های رسپتور EGFو TGF-β در مقایسه با سایر گروه ها می شود. ژل خانواده آلوئه ورا واجد سیستم های آنزیمی آنتی اکسیدانی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز(GPx) و سوپراکسید دیسموتاز(SOD) بوده که با خنثی سازی و سپس دورسازی رادیکال های آزاد موجود در موضع زخم، و نیز با خواص ضد التهابی خود موجب تسریع در روند ترمیم زخم می شود(۱۳). با توجه به خصوصیات بیوشیمیایی ژل آلوئه ورا در پژوهش حاضر تاثیر درمانی ژل تازه و خالص این گیاه بر ترمیم زخم های باز پوستی در موش BALB/c با تمرکز بر نقش FGF-R و نیز تغییرات غلظت هیدروکسی پرولین در چرخه سنتز و تغییر کلاژن مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

برای تهیه ژل خالص و تازه آلوئه ورا، نمونه های گیاهی با کد هرباریوم ۱۱۴، از مرکز پرورش گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تهیه گردیدند. ابتدا برگ های بزرگ بیرونی را جدا نموده و در الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و دو برش در دو انتهای برگ ها ایجاد نموده و به مدت ۱۵ دقیقه برگ ها را به طور عمودی قرار داده تا شیرابه زرد رنگ (لاتکس) غیر لازم از آنان جدا گردد. سپس ژل درون برگ ها را تراشیده و از بخش سبز رنگ پوسته برگ جدا نمودیم. ژل ها دوباره ضدعفونی و با آب مقطر شستشو داده شدند. در انتها ژل های خرد شده توسط هوموژنایزر دستی برقی به خوبی مخلوط و هوموژن شده و ذرات فیبری سفت به کمک صافی جدا گردیدند(۱۰). این ژل در یخچال تا سه هفته نیز قابل نگهداری مدل جانوری مورد استفاده موش های سوری نر نژاد BALB/cبا متوسط وزن ۲±۲۲ گرم خریداری شده از مرکز پرورش حیوانات کوچک آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد بودند. موش ها به صورت تصادفی به سه گروه: ۱) بدون زخم(کنترل منفی)، ۲) با زخم تیمار شده با سرم فیزیولوژیکی(کنترل کاذب یا شم) و ۳) با زخم تیمار شده توسط ژل تازه آلوئه ورا، تقسیم بندی گردیدند. هر گروه شامل ۱۲ سر موش(با سه تکرار مستقل) بودند. در ابتدای کار موش ها در قفس های جداگانه در دمای ۲±۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد با چرخه ۱۲ ساعته روشنایی- تاریکی با غذا و آب نامحدود به مدت ۱۴روز جهت سازش با محیط نگهداری شدند. برای شروع کار موش ها به کم مخلوط دارویی شامل کتامین، زایلازین و اسپرومازین با تزریق درون صفاقی (IP) بیهوش شده(۶) و سپس به کمک پانچ بافتی بر روی ناحیه خاجی موش ها در دو طرف ستون مهره ها دو زخم مساوی با برداشت ضخامت کامل پوست(Full-thickness)به قطر ۱۰ میلی متر ایجاد گردید. روز ایجاد زخم ها روز صفر در نظر گرفته شد. در گروه های تجربی به مدت ۱۶روز، روزانه زخم ها یک مرتبه با ۲ گرم ژل تازه آلوئه ورا و یا سرم فیزیولوژیکی(گروه شم) تیمار گردیدند. جهت بررسی تغییرات بیان ژن FGF-R در پوست و نیز سنجش میزان هیدروکسی پرولین ادرار، در روزهای ۸ و ۱۶ پس از ایجاد زخم، پس از بیهوشی عمیق، نمونه های پوستی برداشت شدند. به منظور بررسی های مولکولی و بررسی تغییرات بیان ژن FGF-R از تکنیک RT-PCR استفاده گردید. به طور خلاصه تمامی RNA سلولی نمونه های زخم ها با استفاده از کیت RNX-plus(شرکت سیناکلون) استخراج و cDNA ساخته شد. از RNA های استخراج شده با استفاده از کیت RT-universal نسخه برداری معکوس به عمل آمد. cDNAها نیز به عنوان الگو برای انجام PCR مورد استفاده

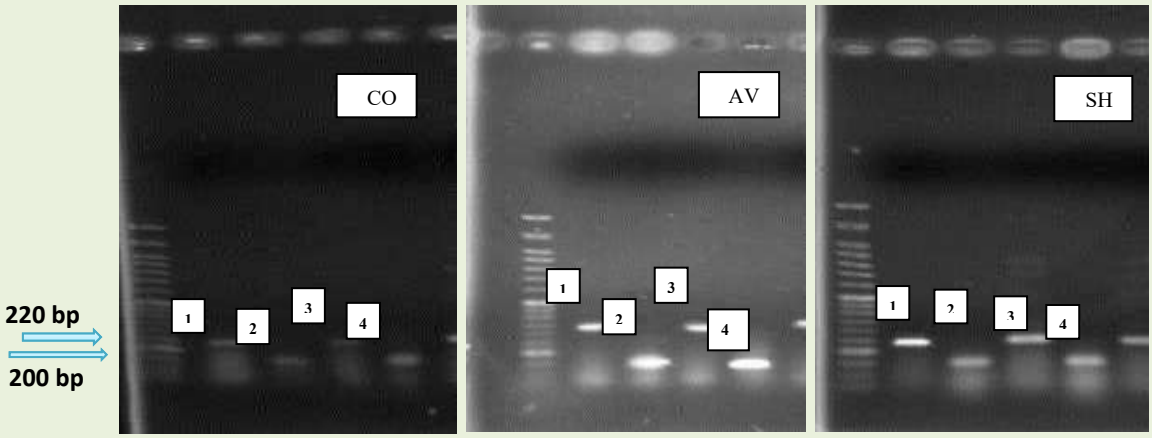
قرار گرفتند. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، و دناتوراسیون بعدی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، آنیلینگ به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد، و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲۵ ثانیه انجام گرفت. در این تحقیق جهت بررسی میزان تغییرات بیان ژن FGF-R از پرایمرهای اختصاصی مندرج در جدول ۱ استفاده گردید. محصول نهایی PCR بر روی ژل آگاروز تفکیک شده و به کمک رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و استفاده از دستگاه ژل داک تصویر برداری به انجام رسید. بررسی نهایی میزان تغییرات بیان ژن FGF-R توسط نرم افزار UV-TEACHصورت گرفت. حاصل کار این نرم افزار شناسایی و سپس ارزشیابی و تعیین شدت باند های موجود بر روی ژل ها است. در ادامه به هر شدت یک عدد تعلق گرفت که با آنالیزهای آماری قابل مقایسه بودند. به منظور بررسی چرخه سنتز و تغییر کلاژن (Collagen turnover) از روش سنجش غلظت هیدروکسی پرولین(HP) در نمونه های ادرار استفاده شد. در این آزمایش یک میلی لیتر ادرار با پونکسیون از مثانه برداشت و به وسیله کیت مخصوص (HP assay kit , Cat. No.: STA-675, Cell Biolabs, Inc., CA, USA)با حساسیت ردیابی تا ۴۷/۵ میکرومولار از هیدروکسی پرولین ، مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این سنجش با واحد میکروگرم هیدروکسی پرولین در میلی لیتر ادرار بیان گردیده اند. در این مطالعه داده های حاصله به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نمایش داده شده اند. جهت مقایسه میانگین داده ها از روش های آماری آنالیز واریانس با اندازه گیری های مکرر (Repeated measures ANOVA)و نیز t-test به کمک نرم افزار SPSS(ویراست ۲۰۱۹) استفاده گردید. سطح P< ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

با بررسی تصاویر ژل های الکتروفورز در شکل های ۱ و ۲ و نیز میزان عددی بیان ژنی در شکل ۳ مشخص گردیدکه تیمار زخم های باز پوستی با ژل خالص و تازه آلوئه ورا موجب افزایش معنی دار بیان ژن FGF-R در هر دو دوره زمانی ۸ و ۱۶روزه نسبت به دو گروه کنترل منفی و شم شده است(P< ۰/۰۵). میزان بیان ژنی در گروه شم نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معنی داری را نشان نداد(P≥ ۰/۰۵)(جدول ۲). نتایج مربوط به تغییرات غلظت هیدروکسی پرولین در ادرار گروه های مختلف در جدول ۳ آورده شده است. این نتایج نشان دهنده افزایش غلظت هیدروکسی پرولین در گروه های دارای زخم پوستی تیمار شده با ژل تازه آلوئه ورا و سرم فیزیولوژیکی بوده است. در گروه های تیمار شده با ژل آلوئه ورا افزایش هیدروکسی پرولین نسبت به دو گروه دیگر معنی دار بوده(P< ۰/۰۵) و در مقابل افزایش غلظت هیدروکسی پرولین در گروه شم نسبت به کنترول منفی معنی دار نبود. (P≥ ۰/۰۵)(جدول ۳).

جدول۱- توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در بررسی میزان تغییرات بیان ژن FGF-R .

ژن	توالی پرایمر	اندازه باند
F- FGFR	5- GGATATCCGGATGCCTCAG-3	۲۲۰
R- FGFR	5- CCTTCAGCCTCACTACCGG-3	۲۲۰



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

CO: چاهک ۱و ۳ محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش بدون زخم (کنترل منفی) با پرایمرهای ژن FGF-R ، چاهک۲ و ۴ محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش کنترل منفی با پرایمرهای اکتین.

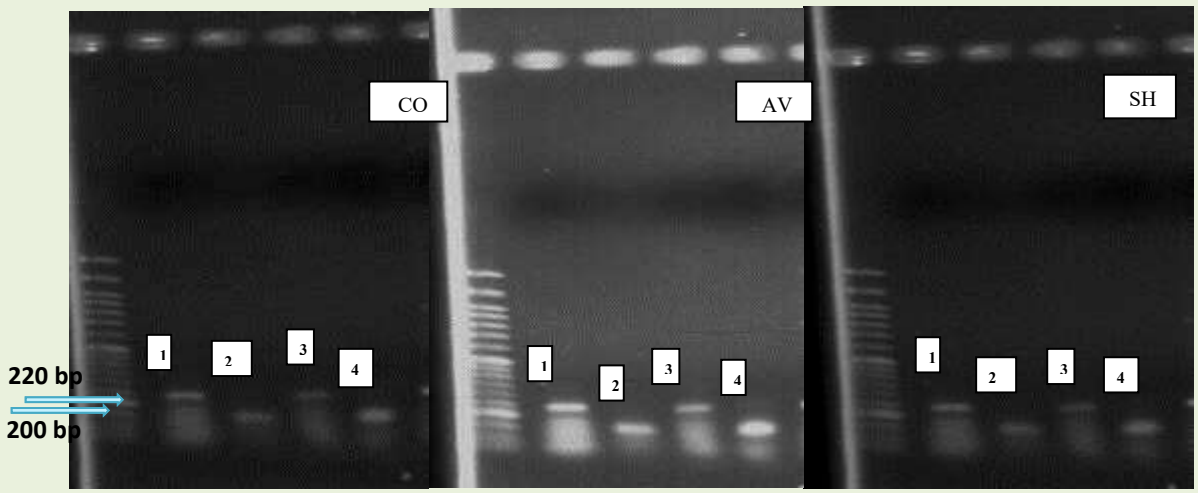
AV: چاهک ۱ و۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش تیمار شده با آلوئه ورا به مدت ۸ روز با پرایمر های FGF-R

چاهک ۲ و ۴ : محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش تیمار شده با آلوئه ورا به مدت ۸ روز با پرایمر های اکتین

SH:چاهک ۱ و۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش تیمار شده با سرم فیزیولوژیکی (شم) به مدت ۸ روز با پرایمرهای FGF-R

چاهک۲و ۴: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش گروه شم به مدت ۸ روز با پرایمر های اکتین

.اندازه طول محصول برابر ۲۴۰ جفت باز و (M) مارکر ۵۰ جفت بازی اندازه DNA از شرکت فرمنتاز 3MO 373 . ژل آگارز ۱۰٪



شکل ۲- RT-PCR بر روی RNA استخراج شده از پوست موش و بررسی میزان بیان ژن FGF-R در ناحیه ترمیم زخم پس از ۱۶ روز:

CO: چاهک ۱و ۳ محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش بدون زخم (کنترل منفی) با پرایمرهای ژن FGF-R ، چاهک۲ و ۴ محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش کنترل منفی با پرایمرهای اکتین.

AV: چاهک ۱ و ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش تیمار شده با آلوئه ورا به مدت ۱۶ روز با پرایمر های FGF-R

چاهک ۲ و ۴ : محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش تیمار شده با آلوئه ورا به مدت ۱۶ روز با پرایمر های اکتین.

SH: چاهک ۱ و ۳: محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش تیمار شده با سرم فیزیولوژیکی (شم) به مدت ۱۶روز با پرایمر های FGF-R

چاهک ۲ و ۴ محصول RT-PCR از RNA استخراج شده از پوست موش گروه شم به مدت ۱۶ روز با پرایمرهای اکتین.

اندازه طول محصول برابر ۳۳۳ جفت باز و (M) مارکر ۵۰ جفت بازی اندازه DNA از شرکت فرمنتاز 3MO 373 . ژل آگارز ۱۰٪

جدول ۲- مقایسه بیان نسبی ژن FGF-R در تیمار ها و زمان های مختلف.

	دوره تیمار (روز)	
	۸	۱۶
کنترل منفی	a۰/۴۲ ± ۰/۰۲	a۰/۴۲ ± ۰/۰۱
شم	a۰/۶۵ ± ۰/۰۱	a۰/۶۷ ± ۰/۰۳
آلوئه ورا	b۰/۹۴ ± ۰/۰۳	b۰/۹۲ ± ۰/۰۲

در هر ستون داده های با حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) دارند.

جدول ۳- مقایسه غلظت هیدروکسی پرولین (HP) ادرار در تیمار ها و زمان های مختلف.

	دوره تیمار (روز)	
	۸	۱۶
کنترل منفی	a۷/۶۳ ± ۰/۳۷	a۷/۶۱ ± ۰/۲۱
شم	a۸/۶۷ ± ۰/۳۵	a۸/۵۶ ± ۰/۴۳
آلوئه ورا	b۱۰/۳۴ ± ۰/۳۱	b۱۱/۶۷ ± ۰/۴۵

واحد اندازه گیری: µg HP/ml

در هر ستون داده های با حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) دارند.

بحث و نتیجه گیری

فرایند ترمیم زخم از جمله روندهای پیچیده و حساس فیزیولوژیکی بوده که در طی آن مجموعه ای از سلول ها و ترشحات آنان به ویژه فاکتور های رشد و سایتوکاین ها وارد عمل می شوند(۲۵). عصاره های گیاهی به صورت سنتی در جوامع انسانی در ترمیم زخم ها مورد استفاده قرار گرفته اند، برای مثال ژل آلوئه ورا با اثرات ترمیم کنندگی و ضد دردی خود در درمان سوختگی ها مورد کاربرد داشته است(۴). نتایج پژوهش ها نشان داده که کاربرد ژل آلوئه ورا موجب افزایش فعالیت تعدادی از ژن های دخیل در ترمیم در زخم می شود(۲۳، ۲۱، ۱۵). تاثیر مذکور از طریق خوراکی نیز به انجام رسیده به طوری که خورانش قطعات ژل تازه آلوئه ورا به موش های رت دیابتی، موجب تسریع در ترمیم زخم های پوستی آنان شده و در طی آن میزان بیان ژن های TGFβ1 و VEGF افزایش قابل توجه ای را نشان داده است. در این میان TGF-β1 با تحریک فیبروبلاست ها موجب بازسازی هر چه بهتر و سریع تر ماتریکس خارج سلولی در محل زخم ها می شود(۳). بررسی های دیگر نشان داده که ژل آلوئه ورا محتوی ترکیبی به نام بتا- سیتوسترول(β-sitosterol) بوده که با افزایش دهی بیان ژن VEGF و رسپتور مربوطه موجب گسترش آنژیوژنز در دوره زمانی ترمیم زخم می شود(۲۰). هم چنین کاربردآلوئه ورا در ترمیم زخم های رت موجب افزایش سنتز و تجمع فیبرهای کلاژن نوع ۳ در موضع می شود(۸). از جمله ترکیبات تشکیل دهنده ژل آلوئه ورا قند مانوز(Mannose) بوده که پس از تحریک ماکروفاژهای موضع زخم موجب ترشح سایتوکاین ها از آنان و پیشبرد دیگر مراحل ترمیم زخم می شود(۱۷). مطالعات سالیان اخیر حاکی از آن است که کاهش بیان ژن های FGF در موضع زخم با اختلال در ترمیم زخم همراه بوده به طوری که در موش های دیابتی که ترمیم زخم ناقص دارند بیان ژن ها به ویژه FGF7 کاهش معنی داری را نشان می دهد(۳۰، ۲۵). هم چنین در موش های با ژن غیرفعال شده FGF2 مشخص شده که در زخم های عمیق آنان کاهش سنتز کلاژن همراه با اختلال در ترمیم زخم وجود دارد(۲۴). در این ارتباط به کارگیری ترکیبات دارویی با منشا گیاهی که در بیش تر موارد در ترمیم زخم

عوارض کم تری را نسبت به ترکیبات سنتتیک از خود نشان می دهند، از اهمیت زیادی برخوردار هستند. نتایج حاصله از پژوهش حاضر نیز نشان داد که ژل تازه و خالص آلوئه ورا موجب افزایش معنی دار بیان ژن FGF-R در زخم های باز پوستی در موش های سوری مورد آزمایش شده است. در جریان ترمیم زخم رسپتورهای فاکتورهای رشد از جمله FGF-R1,2,5&7 در موضع زخم دچار تنظیم افزایشی شده که تا چندین روز نیز این افزایش فعالیت ادامه می یابد(۱،۱۰). در همین راستا مشخص شده که افزایش میزان FGF و FGF-R در بافت های آسیب دیده همراه با ترمیم دوباره اپی تلیوم و افزایش فیبرهای کلاژن نوع ۳ بوده که به ترمیم بافت منجر می شود(۱۴،۳۴،۳۵). فعال شدن مسیر سیگنال رسانی Wnt پس از تحریک توسط FGF ها موجب تسریع روند ترمیم زخم در مدل های جانوری شده است(۱۸). در سال ۲۰۱۹ نیز مشخص گردیدکه تیمار با آلوئه ورا موجب افزایش بیان ژن FGF2 و تحریک مسیر سیگنال رسانی Smad-3 در بافت آسیب دیده می شود(۲۳). علاوه بر این خورانش ژل تازه آلوئه ورا در رت های با دیابت نوع II موجب افزایش بیان ژن های VEGF و TGF-β1 در ناحیه زخم های پوستی شده و در این میان نیز TGF-β1 با القای میتوز در فیبروبلاست ها در بازآرایی ماتریکس خارج سلولی موضع زخم وارد عمل می شود(۳). در همین راستا مشخص شده که TGF-β1 افزایش یافته در محیط زخم موجب افزایش غلظت FGF2 شده که این خود در ترمیم هر چه بیش تر زخم نقش اساسی را ایفا خواهد نمود(۳۴). مطالعات دیگر در خصوص نقش تحریک کنندگی TGF-β1 در بافت های جانوری نشان داده که این فاکتور رشد نقش مهمی در پیشبرد آنژیوژنز تکثیر فیبروبلاستی و تمایز میوفیبروبلاست ها و نیز شکل گیری ماتریکس خارج سلولی دارد(۲۸). اخیراً نیز در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۲۰ نشان داده شد که کاربرد ژل آلوئه ورا در ترمیم زخم های برشی پوست موش موجب تکثیر فیبروبلاستی و افزایش معنی دار بیان ژن های FGF2 ،IGF-1 و VEGF در موضع زخم شده که نتیجه آن تسریع روند ترمیم زخم و افزایش سرعت بسته شدن زخم ها بوده است(۲۲). در سال ۲۰۲۱ نیز مشخص گردید همراه سازی سلول های مزانشمی با ژل آلوئه ورا موجب بهبود روند ترمیم زخم در سوختگی درجه ۲ در رت ها می شود. در همین مطالعه کاربرد ژل آلوئه ورا موجب افزایش بیان ژن برخی فاکتورهای رشد نیز در موضع زخم شده است(۳۰). از آن جایی که داده های زیادی در ارتباط با تاثیر آلوئه ورا بر FGF-R در دسترس نیست با این حال نتایج پژوهش حاضر موید تاثیر مثبت ژل این گیاه بر روند ترمیم زخم بوده که با افزایش فعالیت های رسپتوری موجب بازسازی و بازآرایی موضع زخم در مدل جانوری موش شده است. سنتز به موقع و کافی از فیبرهای کلاژن در موضع زخم از جمله عوامل جلوگیری از پیدایش اسکار (Scar) در انتهای ترمیم زخم در نظر گرفته می شود(۳۱). نتایج بررسی ها نشان داده که FGF ها با تحریک مسیر سیگنال رسانی c-JunN-terminal kinase JNK در فیبروبلاست ها موجب مهاجرت آنان به موضع زخم و ترشح مقادیر کافی از کلاژن شده و بدین ترتیب موجب پیشبرد روند ترمیم زخم می شوند(۳۳). نتایج بررسی های دیگر نیز نشان داده که استفاده از ژل آلوئه ورا موجب افزایش تراکم فیبرهای کلاژن و ایجاد پل عرضی بین آنان شده که نتیجه آن استحکام هر چه بیش تر ساختار پوست در موضع زخم است(۱۳). در مطالعه حاضر برای بررسی تغییرات چرخه سنتز و تغییر کلاژن از روش سنجش غلظت اسید امینه هیدروکسی پرولین در نمونه های ادرار استفاده گردید و در طی آن مشخص شد که تیمار با ژل تازه آلوئه ورا موجب افزایش فعالیت این چرخه در بافت آسیب دیده پوست در موش های مورد آزمایش می شود. این نتیجه در راستای نتایج پژوهش های دیگر در سالیان اخیر بوده که

آلوئه ورا را به عنوان محرک سنتز و بازآرایی فیبرهای کلاژن در محل زخم معرفی نموده اند(۸). بر این اساس می توان عنوان نمود که افزایش غلظت هیدروکسی پرولین در ادرار ارتباط مستقیمی با ترمیم کامل تر زخم های مورد مطالعه دارد. در سال ۲۰۱۰ عریان و همکارانش نشان دادند که کاربرد ژل آلوئه ورا در زخم های پوستی موش های رت موجب سرعت بخشی به انقباض سطح زخم و افزایش آنژیوژنز و گستردش بافت گرانوله و نیز آرایش هر چه بیش تر و بهتر فیبرهای کلاژن در محل زخم می شود(۲۴). در تایید پژوهش حاضر، غیبی و همکارانش نیز نشان دادند که استعمال ژل آلوئه ورا موجب بهبود مناسب زخم های پوستی و افزایش غلظت هیدروکسی پرولین در ادرار رت های مورد آزمایش شده است(۱۲). در مقابل در موش های فاقد FGF2' کاهش سنتز فیبرهای کلاژن همراه با کندی ترمیم زخم در پوست مشاهده شده است(۲۳). رویهم رفته نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده اثربخشی مناسب ژل تازه و خالص آلوئه ورا در مدیریت ترمیم زخم های پوستی باز در مدل های جانوری و حتی انسانی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین دانشگاه شهرکرد بابت حمایت مالی و نیز جناب آقای دکتر محمد شادخواست بابت همکاری بی دریغ شان تشکر و قدردانی می نمایند.

.

منابع

1.Al-Obaidy, K.I., Cheng, L.J. (2021). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) gene: pathogenesis and treatment implications in urothelial carcinoma of the bladder. Clin Pathol, 74; 491-495.

2.Arbab, S., Ullah, H., Wei, X., Zhang, J. (2021). Comparative study of antimicrobial action of aloe vera and antibiotics against different bacterial isolates from skin infection. Am J Phytomed Clin Ther, 9(1); 1-5.

3.Atiba, A., Ueno, H., Uzuka, Y. (2010). The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. J Vet Med Sci, 73(5); 583-589.

4. Atik, A., Nandika, A., Dewi, P.I.C., Avriyanti, E. (2019). Molecular mechanism of *Aloe barbadensis* miller as a potential herbal medicine. Sys Rev Pharm, 10(1); 118-125.

5.Boudreau, M.D., Beland, F.A. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller). Aloe vera. J Environ Sci Health C, 24; 103-154.

6.Buitrago, S., Martin, T., Tetens-Woodring, J., Belicha-Villanueva, A., Wilding, G.E. (2008). Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. J Am Associ Lab Anim Sci, 47(1); 11-17.

7.Cañedo-Dorantes, L., Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin acute wound healing: a comprehensive review. Int J Inflam, Volume 2019, Article ID 3706315, 15 pages.

8.Chithra, P., Sajithlal, G.B., Chandrakasan, G. (1998). Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. Mol Cell Biochem, 181(1-2); 71-76.

9. Darzi, S., Paul, K., Leitan, S., Werkmeister, J.A., Mukherjee, S. (2021). Immunobiology and Application of Aloe vera-based scaffolds in tissue engineering. Int J Mol Sci, 22; 1708.

10. Ferguson, H.R., Smith, M.P., Francavilla, C. (2021). Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and noncanonical partners in cancer signaling. Cells, 10; 1201.

11. Foadoddini, M., Alinejad Mofrad, S. (2020). Effect of Aloe vera extract on depression in people with prediabetes. Mod Care J, 17(2); e100927.

12. Gheibi, N., Sofiabadi, M., Asghari, S., Ahmadi, E. (2014). Topical effects of Aloe vera and propolis on open wound healing in male rats. Sci J Ilam Univ Med Sci, 23(4); 32-40.

13. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Heidari, A.H. (2012). Anti-inflammatory and wound healing activities of Aloe littoralis in rats. Res Pharm Sci, 7(2); 73-78.

14. Henry, G., Garner, W.L. (2003). Inflammatory mediators in wound healing. Surg Clin North Am, 83(3); 483-507.

15. Jafarzadeh, H., Arabi, M., Najafi, N., Ahadi, A.M. (2014). Effect of Aloe vera gel on TGF-β gene expression in incisional skin wound in BALB/c mice. J Gorgan Uni Med Sci, 16(3); 16-23.

16. Lai, H.Y., Lim, Y.Y., Kim, K.H. (2011). Potential dermal wound healing agent in

Blechnum orientale Linn. BMC Complement Altern Med, 11; 62.
17. Liu, C., Leung, M.Y.K., Koon, C.M., Zhu, L.F., Hui, Y.Z. (2006). Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. chinensis (Haw.) Berg. Int Immunopharmacol, 6(11); 1634-1641.
18. Maddaluno, L., Urwyler, C., Werner, S. (2017). Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. Development, 144; 4047-4060.
19. Manna, S., McAnalley, B.H. (1993). Determination of the position of the O-acetyl group in a β-(1-4)-mannan (acemannan) from Aloe barbardensis Miller. Carbohydr Res, 241; 317- 319.
20. Moon, E. J., Lee, Y. M., Lee, O.H, Lee, M.J., Lee, S.K., Chung, M.H. (1999). A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: β-sitosterol, a plant sterol. Angiogenesis, 3; 117-123.
21. Najafi, N., Arabi, M., Jafarzadeh, H. (2014). Inducing effect of *Aloe vera* gel extract on pithelial growth factor receptor gene expression in cutaneous wounds of male mice balb/c. J Cell Tissue, 5(1); 53-61.
22. Najafzadeh Gharaboghaza, M., Farahpourb, M.R., Saghaie, S. (2020). Topical co-administration of Teucrium polium hydroethanolic extract and *Aloe vera* gel triggered wound healing by accelerating cell proliferation in diabetic mouse model. Biomed Pharmacother, 127; 110189.
23. Nugraeni, Y., Riawan, W., Permatasari, N., Widjajanto, E., Dradjat, R.S. (2019). Effect of *Aloe vera* gel on the expression of FGF-2, TGF-α, and Smad3 in the root surface of rat teeth after Traumatic avulsion. Res J Pharm Tech, 12(9); 4405-4409.
24. Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S.H., Ehrlich, M., Basilico, C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. Proc Natl Acad Sci USA , 95; 5672-5677.
25. Oryan, A., Naini, A.T., Nikahval, B., Gorjian, E. (2010). Effect of aqueuse extract of *Aloe vera* cutaneous wound healin in rat. Vet Arhiv, 80(4); 509-522.
...
26. Peng, C., Chen, B., Kao, H.K., Murphy, G., Orgill, D.P., Guo, L. (2011). Lack of FGF-7 further delays cutaneous wound healing in diabetic mice. Plast Reconstr Surg, 128(6); 673e-684e .
27. Qing, C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. Chin J Traumatol, 20; 189-193.
28. Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L., Bernabeu, C. (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. J Biol Chem, 276 (42); 38527-38535.
29. Schultz, G.S., Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. Wound Rep Reg, 17; 153-162.
30. Sharifia, E., Chehelgerdi, M., Fatahian-Kelishadrokhi, A., Yazdani-Nafchi, F., Ashrafi-Dehkordi, K. (2021). Comparison of therapeutic effects of encapsulated Mesenchymal stem cells in *Aloe vera* gel and Chitosan-based gel in healing of grade-II burn injuries. Regen Ther, 8; 30-37.
31. Shoulders, M.D., Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. Annu Rev Biochem, 78; 929-958.
32. Song, Q.H., Klepeis, V.E., Nugent, M.A., Trinkaus Randall, V. (2002). TGF-β1 regulates TGF-β1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. J Clin Pathol: Mol Pathol, 55(3); 164-176, 2002.
33.Song, Y.H., Zhu, Y.T., Ding, J., Zhou, F.Y., Xue, J.X., Jung, et al. (2016). Distribution of fibroblast growth factors and their roles in skin fibroblast cell migration. Mol Med Rep, 14; 3336-3342.
34 .Xie, Y., Nan, Su. (2020). FGF/FGFR signaling in health and disease. Sign Transduct Target Ther, 5; 181.
35. Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D.M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. J Biol Chem, 281(23); 15694-15700.

Collagen Turnover in Healing of Cutaneous Wounds by *Aloe vera* Fresh Gel in Mouse: Involvement of Fibroblast Growth Factor Receptor

H. Jafarzadeh[1], **M. Arabi[2]**

1.MSc in Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Iran.

2.Associate Prof. in Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Iran. **mehranarabi@hotmail.com**

Received:2021.9. 9 **Accepted: 2021.13.11**

Abstract

Inroduction & Objective: Using herbal products like Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plays an important role in wound healing. This study aimed to evalutea the curative influence of Aloe vera (AV) fresh gel on healing of open cutaneous wounds in mouse.

Material and Method: Mice were 1) pseudo-control (sham): wound treated with physiological serum; 2) wound treated with 2 gr AV fresh gel. Two equal full-thickness skin wounds were made on vertebral column in the sacral region. On 8th and 16th post wounding day, skin sampling for the purpose of gene expression of fibroblast growth factor receptor (FGF-R) under RT-PCR evaluation was taken place. Urine samples were used to determine the concentration of hydroxy proline (HP) as a marker of collagen turnover in wounds, using HP assay kit.

Results: AV fresh gel could up-regulate the expression of FGF-R gene as compared to negative and pseudo-controls ($P<0.05$). In addition, HP concentration was incresed in AV gel-treated groups comparing to others.

Conclusion: We revealed that AV fresh gel was capable of healing wounds via elevation in collagen turnover and represents a good candidate for a wound healing process in human and animals.

Keywords: Aloe vera Gel, Mouse Skin, Wound Healing, Growth Factor, Collagen Turnover.