مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۲، شماره ۳ (شماره پیاپی ۴۸)، پاییز ۱۳۸۸، ۳۸-۲۹

اثر التیام بخشی عصاره آبی الکلی گیاه یونجه برروی سوراخ های ایجاد شده در غضروف گوش خرگوش

دکتر جینا خیاط زاده[۱]، دکتر مجید فرهودی[۲] ، حسین رفیعی[۳]*

۱- استادیار، دکترا زیست شنای جانوری و تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار پژوهشی، دکترا آسیب شناسی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، مشهد، ایران

۳- کارشناس ارشد زیست شناسی- علوم تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت ۸۸/۳/۲۶ ، تاریخ پذیرش۸۸/۵/۲۶

چکیده

مقدمه: اختلالات غضروفی و حرکتی از شایع‌ترین مشکلات جامعه انسانی می‌باشد. حضور ویتامین‌های مختلف از قبیل A و C سرعت ترمیم را افزایش می‌دهد. در این تحقیق از گیاه یونجه با نام علمی مدیکاگوساتیوا که سرشار از ویتامین‌های K و E، C ، A می‌باشد، استفاده گردید و روند ترمیم غضروف لاله گوش خرگوش مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار: در طی یک مطالعه تجربی- آزمایشگاهی برای انجام آزمایش‌ها ۶ خرگوش نر نژاد نیوزیلندی به وزن تقریبی ۲/۵ تا ۳ کیلوگرم انتخاب شدند. پس از حذف موهای گوش خرگوش با کرم موبر و بی حسی آن توسط اسپری لیدوکایین ۱۰ درصد، ۴ سوراخ به قطر ۴ میلی‌متر در موقعیت مدیال هر یک از گوش‌ها ایجاد گردید(جمعاً ۴۸ موضع). سوراخ‌های گوش‌های تست هر روز توسط عصاره یونجه و سوراخ‌های گوش‌های کنترل توسط سرم فیزیولوژی تیمار شدند. مساحت سوراخ‌ها و فاصله دو لبه غضروف در روزهای مختلف اندازه‌گیری شدند. هم‌چنین نمونه‌برداری بافتی برای مشاهدات میکروسکوپی با رنگ توکسیلین- ائوزین (روزهای ۵۰-۰) انجام شد.

نتایج: ترمیم و بازسازی و سرعت بسته شدن در سوراخ‌های تیمار نسبت به سوراخ‌های کنترل سریع تر بود ($p<0/004$). هم‌چنین، ضخامت غضروف و تعداد کندروسیت و نیز تراکم فیبروبلاست‌ها در بافت همبند تازه تشکیل شده در نمونه‌های تست نسبت به کنترل زیادتر بود.

نتیجه گیری: احتمالاً عصاره یونجه به علت مقادیر بالای ویتامین‌های A و C باعث تسریع روند ترمیم و بازسازی در غضروف گوش خرگوش گردیده است و لذا امکان استفاده‌های فارماکولوژیک را مطرح می‌نماید.

واژگان کلیدی: یونجه، ترمیم زخم، غضروف گوش، خرگوش

***نویسنده مسئول:** مشهد، موسسه تحقیقات واکسن سرم سازی رازی

Email: rafiei.hossein@gmail.com

مقدمه

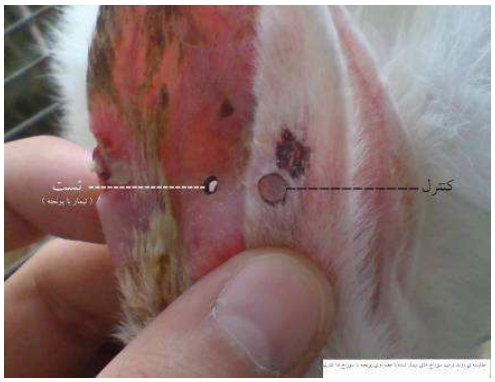
به طور کلی منظور از ترمیم و بازسازی زخم، رشد مجدد سلول‌هایی است که از لحاظ ساختمان و کار شبیه سلول‌های آسیب دیده هستند و جایگزین آنها می‌شوند. جانشین شدن سلول‌های از بین رفته به وسیله تکثیر سلول‌های ذخیره فقط در بافت‌هایی که سلول‌های آن‌ها قابلیت تقسیم میتوزی را داشته باشند امکان پذیر است. به همین دلیل بازسازی در بافت‌های پستانداران در مقایسه با دوزیستان و برخی ماهی‌ها دارای محدودیت‌هایی است(۱).

بلاستما یک توده سلولی غیر تمایز یافته است که توانایی رشد یا بازسازی اندام و یا تولید بخش‌هایی از بدن را داراست و همانند سلول های جنین باعث بازسازی بافت، اندام و استخوان می‌شود. سلول‌های بافت بلاستما قابلیت تقسیم میتوزی دارند(۲، ۳).

یکی از مثال‌های اپی مورفیک ترمیم (wound healing) و بازسازی (regeneration) زخم در پستانداران، بررسی فرایند ترمیم و بازسازی سوراخ‌های ایجاد شده در گوش خرگوش می‌باشد. در این فرایند پس از التهاب(inflammation)، پاک سازی و مهاجرت اپیتلیومی، اسکار تولید شده به طور کامل سطح زخم را نمی‌پوشاند. پس از آن بافت بلاستما که تجمعی از سلول‌های مزانشیمی است به وجود می‌آید. با گذشت زمان دو لبه زخم به هم متصل و بافت گرانوله زیر آن را پرمی‌کند که در آن تکثیر فیبروبلاست‌های درم و رشته‌های کلاژن با آرایش تصادفی و نامنظم وجود دارند و تدریجاً در دستجات منظم طولی و لابلای فیبروبلاست‌های دوکی شکل، جهت یابی مجدد پیدا می‌کنند. جهت بازسازی کامل غضروف، در لبه غضروفی قدیمی سلول‌های مزانشیمی، بلاستما به فیبروبلاست و سپس به کندروبلاست تمایز می‌یابند. دو لبه غضروف رشد کرده و به همدیگر می‌رسند و تیغه غضروفی کامل ایجاد می‌گردد. درتمام مراحل رشد غضروف پری کندریوم واضح همراه با فیبروبلاست‌های متعدد (که به کندروبلاست تبدیل خواهند شد) دیده می‌شوند(۶-۴).

از آنجایی که غضروف تیغه بینی، سطح مفاصل استخوانی و انتهای شکمی دنده‌ها در انسان از نوع هیالین شبیه به گوش خرگوش است بنابراین احتمالاً نتایج حاصل از ترمیم و بازسازی غضروف گوش خرگوش قابل تعمیم به انسان است(۷).

تاثیر گیاهان و داروهای مختلف بر روند ترمیم گوش خرگوش مطالعه شده است اما تا کنون اثر گیاه یونجه بر روند ترمیم در هیچ بافت و موجودی مورد بررسی قرار نگرفته است. در طب سنتی از یونجه برای درمان آرتریت و انباشته شدن آب در بافت‌ها (مثل بیماری ادم) استفاده می‌شود. هم‌چنین این گیاه حاوی مقدار زیادی ویتامین A و C است و کوبیده آن زخم را به سرعت التیام داده و از خونریزی جلوگیری می‌کند(۸). اگرچه تاثیر بسیاری داروها یا ویتامین‌ها بر روند ترمیم غضروف بررسی شده است، اما با توجه به محتویات گیاه یونجه و ارزان بودن آن در صورت التیام بخش بودن بر روند ترمیم به عنوان داروی گیاهی با عوارض جانبی کمتر از داروهای صنعتی معرفی خواهد شد. هدف از این تحقیق بررسی ترمیم سوراخ‌های ایجاد شده در غضروف گوش خرگوش با استفاده از عصاره یونجه بوده که سرعت تشکیل غضروف و تغییرات هیستولوژیکی را مورد ارزیابی قرار می‌دهد.



شکل۱. مقایسه روند ترمیم سوراخ تیمار (شکل سوراخ دایره است)

روش کار

در طی یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی برای انجام آزمایش ۶ راس خرگوش نر نژاد نیوزیلندی به وزن

تقریبی ۲/۵ تا ۳ کیلوگرم از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد تهیه شد. تمامی آزمایش‌ها در بخش حیوانات موسسه انجام گرفته است.

به منظور ایجاد سوراخ ابتدا موهای اضافی در لاله گوش توسط کرم موبر برداشته شد. سپس با استفاده از الکل گوش‌ها را ضد عفونی کرده و خرگوش در محفظه مخصوصی که برای ثابت نگه داشتن به کار می‌رود، قرار داده شدند. سپس گوش‌ها با استفاده از دستگاه پانچ که به همین منظور تهیه شده بود به شکل دایره در موقعیت مدیال و در دو طرف رگ اصلی سوراخ شدند. در هر گوش ۴ سوراخ هر یک به قطر ۴ میلی‌متر ایجاد شد(شکل ۱). جمعاً ۴۸ موضع برای مطالعه فراهم آمد. در ۳ خرگوش، سوراخ‌های ایجاد شده در گوش راست به عنوان تست و سوراخ‌های ایجاد شده در گوش چپ به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در ۳ خرگوش دیگر برعکس عمل شد.

برای عصاره‌گیری ابتدا قسمت‌های هوایی برگ و ساقه گیاه یونجه را خرد نمودیم. سپس ۱۵۰ گرم یونجه خرد شده داخل ظرف شیشه‌ای یک لیتری ریخته شد و به آن ۷۵۰ گرم حلال اضافه گردید. حلال‌های غیر روغنی توانایی استخراج اجزای بیوفنلی، تانن‌ها، ویتامین‌ها، ترپن‌ها و آمینواسیدها وحلال‌های روغنی توانایی استخراج کارتنوئیدها و اسیدهای چرب ضروری را دارند. در این پژوهش اتانول استفاده شد زیرا که یک حلال غیر روغنی می‌باشد و ماندگاری عصاره را بالا برده، مانع از تغییر ماده ویتامینی می‌شود. درب ظرف شیشه‌ای محکم بسته شد و جهت جلوگیری از حرارت مستقیم، بر روی سه پایه در ظرف شیشه‌ای بزرگ تر پر از آب گرم قرار داده شد. برای عصاره‌های روغنی دمای آب ۷۵ درجه و برای عصاره‌های غیر روغنی دمای آب ۶۵ درجه در نظر گرفته می‌شود. با توجه به این که یونجه حاوی مقدار زیادی ویتامین C است و حداکثر درجه ماندگاری آن، ۲ ± ۳۲ درجه سانتی گراد است، جهت ماندگاری ویتامین C دما را کاهش داده و مدت زمان حرارت دادن افزایش می‌یابد. زمان استخراج برای عصاره‌های روغنی ۳ تا ۴ ساعت و برای عصاره‌های غیر روغنی ۴ تا ۵ ساعت است(۸).

هر ۲۰ دقیقه ظرف شیشه‌ای از آب خارج شده و به خوبی تکان داده شد. برای صاف کردن عصاره به دست آمده از آب‌میوه‌گیری‌های قدیمی که دارای طلق ژلاتینی بود استفاده شد. به ترتیب ابتدا کاغذ صافی بعد پارچه تترون و سپس طلق داخل آب‌میوه‌گیری قرارداده شد. سپس مخلوط عصاره و گیاه در چند مرحله داخل آبمیوه‌گیری گذاشته شده و تفاله آن جدا گردید. عصاره به دست آمده در داخل ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری شد(۸).

روی سوراخ‌های تست دو بار در روز و در وقت معینی با عصاره یونجه و سوراخ‌های کنترل با سرم فیزیولوژی تا ۵۰ روز پس از ایجاد سوراخ تیمار موضعی (توسط سرنگ) انجام شد.

به منظور بررسی ماکروسکوپی بسته شدن سوراخ در روزهای معین به کمک کاغذ میلی‌متری مساحت سوراخ‌ها تا زمان بسته شدن آن‌ها اندازه‌گیری شد و با آنالیز آماری آنوا (Anova) و آزمون تی (T-test) بین سوراخ‌های تست و کنترل مقایسه میانگین داده‌ها صورت گرفت و نمودارهای لازم ترسیم شد.

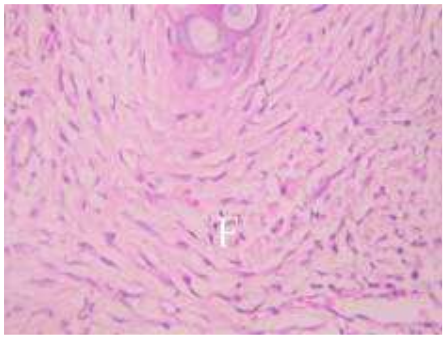
برای تهیه مقاطع میکروسکوپی پس از ضد عفونی و بی حس کردن گوش، حیوان مجدداً در محفظه مخصوص قرار داده شد. از دستگاه پانچی با قطر سوراخ به اندازه ی ۶ میلی‌متر استفاده شد و گوش خرگوش‌ها در بازه‌های زمانی مشخص (روزهای ۳، ۵، ۷، ۱۰ و...) در موقعیت‌های در حال ترمیم مجدداً سوراخ گردید. هم‌چنین از بافت سالم پانچ شده نوبت اول به عنوان نمونه شاهد (دست نخورده) استفاده شد. سپس بافت‌ها به فیکساتور بوئن انتقال داده شد و مراحل مختلف آبگیری با درجات صعودی اتانول، پارافین دهی، قالب گیری، برش‌گیری (توسط دستگاه میکروتوم Leitz ۱۵/۲ و برش‌هایی با ضخامت ۷ میکرون) انجام گردید. پس از آن مقاطع روی لام تمیز قرار گرفتند، آبدهی با درجات

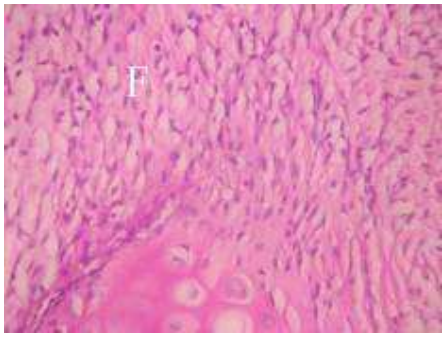
نزولی اتانول و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین و تری کرم انجام پذیرفت. طی مطالعه میکروسکوپی لام‌ها، فاصله دو لبه غضروف از یکدیگر و ضخامت غضروف با میکرومتر چشمی برای نمونه‌های تست و کنترل اندازه‌گیری شد و آنالیز آماری مقایسه میانگین‌ها و رسم نمودار صورت گرفت. هم‌چنین تراکم فیبروبلاست ها در بافت تازه تمایز یافته ارزیابی شد.

نتایج

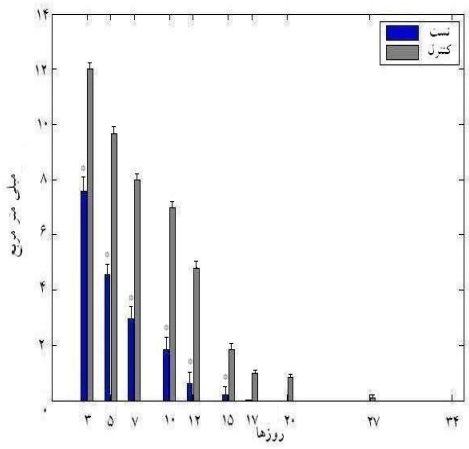
نتایج ماکروسکوپی حاصل از از مقایسه مساحت سوراخ‌های تیمار با سوراخ‌های کنترل در روزهای مختلف به صورت زیر بود:

۱ - افزایش سرعت بسته شدن سوراخ‌های تیمار شده با عصاره یونجه نسبت به سوراخ‌های کنترل (شکل و نمودار۱). میانگین زمان بسته شدن کامل سوراخ‌های تست در روز ۲۰ و در سوراخ‌های کنترل روز ۳۰ بود.





شکل ۲. شکل بالا فیبروبلاست‌های کنترل و شکل پایین فیبروبلاست‌های نمونه تیمار شده با عصاره یونجه در روز ۵ را نشان می‌دهد (هماتوکسیلین و ائوزین)- درشت نمایی ۱۰*



نمودار ۱ . مقایسه مساحت سوراخ‌های تیمار شده با عصاره‌ی یونجه با مساحت سوراخ‌های کنترل در دوره‌ی مورد مطالعه (برای تمامی روزها $p<0/004$)

۲- با توجه به بررسی‌های انجام شده، میزان آماس، تورم و التهاب در سوراخ‌های تیمار شده با عصاره یونجه نسبت به سوراخ‌های کنترل کاهش یافت.

به طور کلی در این تحقیق مشاهدات میکروسکوپی زیرحاصل شد:

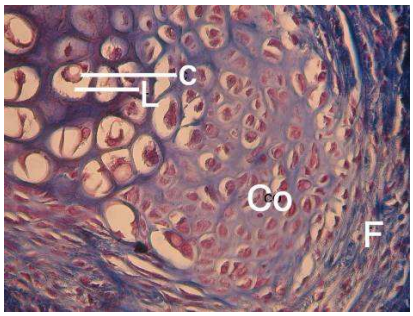
۱- افزایش فیبروبلاست‌ها در بافت همبند تازه تشکیل شده در نمونه تست نسبت به کنترل (شکل ۲- روز ۵).

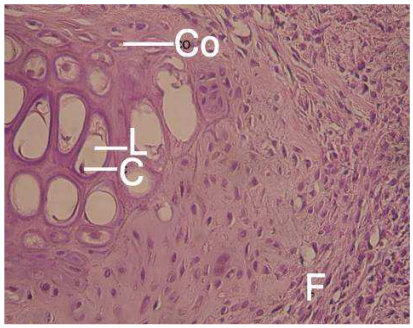
۲- افزایش تعداد کندروسیت‌ها و کندروبلاست‌ها در غضروف تست نسبت به کنترل که با نزدیک شدن به انتهای دوره‌ی ترمیم مشهودتر به نظر می‌رسید(شکل ۳-روز ۱۰).

۳- فاصله دو لبه زخم در نمونه تست کمتر از کنترل می‌باشد(شکل ۴، روز ۱۵).

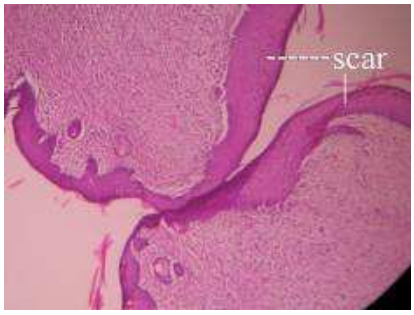
۴- افزایش ضخامت غضروف که با گذشت زمان ترمیم در سوراخ‌های تست نسبت به سوراخ‌های کنترل واضح‌تر و بارزتر شد(شکل ۵- روز ۲۰).

۵- فاصله دو لبه غضروف در سوراخ‌های تست بسیار کمتر از سوراخ‌های کنترل است(شکل ۶-روز۲۷ و نمودار ۲)

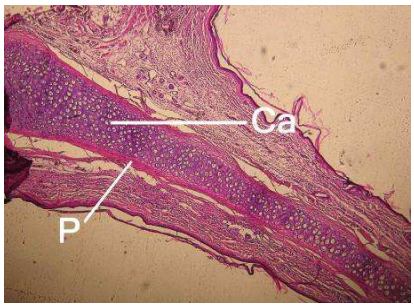


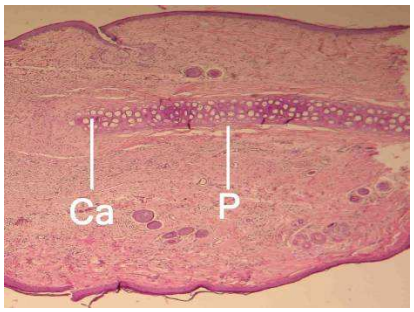


شکل ۳ . شکل بالا کندروسیت‌های کنترل و شکل پایین کندروسیت‌های نمونه تیمار شده با عصاره یونجه (تری کرم) در روز ۱۰ را نشان می‌دهد. کندروسیت(c)، کندروبلاست(co)، فیبروبلاست(F) و لاکونا (L) درشت نمایی ٭۴۰

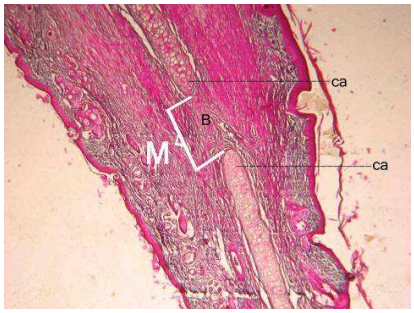


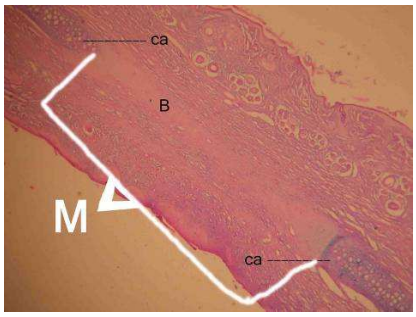
شکل ٤. شکل بالا فاصله دو لبه زخم نمونه کنترل و شکل پایین فاصله‌ی دو لبه زخم نمونه تیمار شده با عصاره یونجه در روز ۱۵ را نشان می دهد(هماتوکسیلین و ائوزین)، درشت نمایی٭۱۰





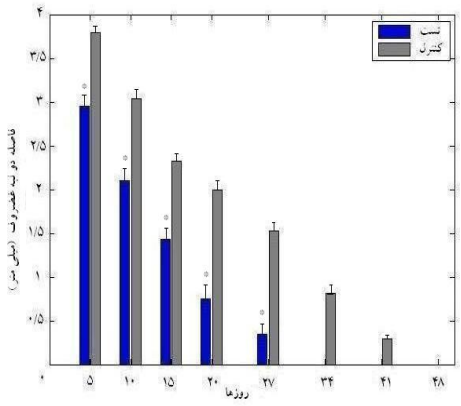
شکل ٥. شکل بالا ضخامت غضروف کنترل و شکل پایین ضخامت غضروف تیمار شده با عصاره یونجه در روز ۲۰ را نشان می دهد (هماتوکسیلین و ائوزین)، (P پری کندریوم و Ca نشان دهنده غضروف است) -درشت نمایی ٭۱۰





شکل ٦. شکل بالا فاصله دو لبه غضروف را در نمونه کنترل و شکل پایین فاصله دو لبه غضروف را در نمونه تیمار شده با عصاره یونجه در روز ۲۷ را نشان می‌دهد (هماتوکسیلین و ائوزین)، (فاصله دو لبه غضروف با M مشخص شده است)- درشت نمایی ٭۱۰

(n = 8 ،p< ۰/۰۰٤)



نمودار ۲. مقایسه فاصله دو لبه غضروف سوراخ‌های تیمار شده با عصاره یونجه و سوراخ‌های کنترل (برای تمامی روزها ۰/۰۰٤ >p)

بنابراین تفاوت آشکاری در هیستولوژی زخم‌های در حال ترمیم تست نسبت به کنترل مشاهده می‌شود. بدین مفهوم که سرعت بسته شدن سوراخ‌ها، هم‌چنین سرعت پیشروی و ترمیم تیغه غضروف، ضخامت غضروف، تعداد کندروسیت‌ها، کندروبلاست‌ها و فیبروبلاست‌ها در بافت تازه تشکیل شده در سوراخ‌های تست نسبت به کنترل به طور آشکارا بیشتر گردید.

بحث

نتایج تحقیق حاضر مبنی بر سرعت بخشیدن ترمیم غضروف در حضور عصاره گیاه یونجه هم راستا با نتایج تحقیقات متعددی است که تاثیر ویتامین A و ویتامین C و مشتقات آن‌ها بر رشد غضروف را نشان می‌دهد. از جمله در مورد اسید رتینوئیک اسید که هم کاهش و هم افزایش آن بر یکپارچگی ماتریکس خارج سلولی تاثیر می‌گذارد. ضمن این که اثرات رتینوئیک اسید برکاتابولیسم غضروف به اثبات رسیده است. استفاده از رتینوئیک اسید در نمونه‌های غضروف انسانی و حیوانی سبب تولید کلاژن و پروتئوگلیکان می‌شود. مشاهدات اخیر نشان می‌دهد که رتینوئیک اسید به همراه انکوسین (oncostain) اثر عمیقی بر بازگرداندن ماتریکس خارج سلولی از دست رفته دارد. این دو ترکیب میزان ماتریکس متالوپروتئاز را تنظیم می‌کند. حضور ویتامین A سبب افزایش میزان پروتئین سازی برای همانندسازی و به تبع آن افزایش تقسیم سلولی می‌گردد. شینگتون و همکاران در سال ۲۰۰۶ اسید رتینوئیک را بر صفحه رشد بررسی و این ویتامین را یک تنظیم کننده بالقوه‌ی کندروژنزیس شناختند(۹).

بارنهیل و همکاران در سال ۲۰۰۶ ثابت نمود که غلظت‌های بالای ویتامین A از بیان فنوتیپ‌های متفاوت کندروسیت‌های دنده‌ای در محیط کشت جلوگیری و آن‌ها را یکپارچه می‌کند. آن‌ها نقش فیزیولوژیکی رتینوئیک اسید را در تحریک تکثیر و رشد سلول‌های غضروفی بدون تغییر موثر در تمایز فنوتیپشان به اثبات رساندند(۱۰).

مطالعات گودمن و همکاران سبب هدایت آن‌ها به کشف ارتباط بین اثر ویتامین A بر روی غضروف و نقش بیولوژیکی در ادامه رشد و بقای موجود شده است. رتینوئیک اسید، α رتینوئیک اسید و Ro8-7669 (acyclopentlyl analogy of retinoid acid) در رشد غضروف در کشت اندام در محیط آزمایشگاه بسیار موثر بود(۱۱).

نقص در ویتامین A و همین طور ویتامین A زیادی سبب رشد غیر طبیعی استخوان می‌شود و صفحه رشد کندروژنز را تنظیم می‌کند و این فرضیه را که مقدار دهانی رتینوئیک اسید، بلند صفحه رشد درشت نی را کاهش می‌دهد، مطرح می‌کند. برای تعیین این که آیا رتینوئیک اسید به طور مستقیم بر صفحه رشد تاثیر دارد یا خیر استخوان‌های قوزک پای جنین رت را در محیط آزمایشگاه در حضور اسید رتینوئیک کشت دادند. در این سیستم رتینوئیک اسید از رشد بیش از اندازه استخوان‌های طولی به وسیله‌ی سه مکانیسم جلوگیری نمود که شامل:

کاهش تکثیر کندروسیت‌ها به وسیله‌ی اتصال به H-thymidine مخصوصاً در منطقه ی تکثیر و رشد صفحه۲- کاهش سنتز ماتریکس به وسیله‌ی اتصال به گلیکوزآمینوگلیکان و ۳- کاهش هایپرتروفی می باشد. لذا نتیجه گرفتند که رتینوئیک سبب تنظیم رشد طولی از طریق

جلوگیری از تکثیر صفحه رشد کندروسیت، هایپرتروفی کندروسیت و سنتز ماتریکس می‌شوند(۱۲).

با تمام این تفاصیل حضور مقادیر مناسب ویتامین A (به تناسب جاندار) برای تسریع روند ترمیم و بازسازی (به خصوص در غضروف) ضروری است. با توجه به این که در گیاه یونجه مقادیر بالای ویتامین A وجود دارد(۸، ۱۳) به نظر می‌رسد نقش التیام بخشی عصاره این گیاه بر ترمیم غضروف می‌تواند احتمالاً به حضور ویتامین A بالا یا مشتقات آن مربوط باشد، هر چند برای تایید این مطلب پیشنهاد می‌شود در طرح های آینده تاثیر فراکسیون‌های مختلف موجود در عصاره به طور جداگانه و خالص شده مورد مطالعه قرار گیرد. از طرفی در سال ۱۹۹۷ کوپمن و همکاران نشان دادند که تزریق بالای اسید رتینوئیک (۶۰ میلی‌گرم در روز) موجب افزایش تراکم سلول‌های آماسی می‌شود(۱۴). در سال ۲۰۰۶ آبدلمالک و اسپنسر نیز نشان دادند که اسید رتینوئیک ۱ درصد باعث افزایش سلول‌های آماسی، التهاب و آشوب بافتی می‌گردد(۱۵). این نتایج نیز منطبق برمشاهدات تحقیق ما است که در آن استفاده از عصاره گیاه یونجه نشانه‌های التهاب و آماس را کاهش می‌دهد و لذا این نکته نیز مجدداً تاییدی بر این احتمال است که شاید بتوان یک علت بروز نتایج فوق در عصاره یونجه را به وجود مشتقات ویتامین A مربوط دانست.

از طرفی عصاره یونجه حاوی ویتامین C می‌باشد(۱۳). از آنجا که ویتامین C دارای عملکردهای فیزیولوژیک بسیاری در بدن است و اغلب همراه با ترمیم زخم به خاطر شکل‌گیری و تنظیم آرایش رشته‌های کلاژن مطرح می‌شود شاید بتوان قسمتی از اثر التیام بخشی عصاره یونجه را به حضور این ماده مربوط دانست. ویتامین C یک کوفاکتور است که دارای هیدروکسی پرولین و هیدروکسی لیزین می باشد که دو جز ضروری در شکل‌گیری کلاژن با پیوندهای هیدروژنی قوی هستند. این ویتامین هم‌چنین برای عملکرد مناسب سیستم ایمنی نیاز است که در بیماران با زخم‌های باز قابل ملاحظه است. برخی عملکردهای دیگر ویتامین C عبارتند از:آنتی اکسیدانی برای جلوگیری از صدمه‌هایی که به سلول‌های بدن وارد می‌شود، اثرات ضد التهاب و محافظت ویتامین E از اکسایش در خون و بازیابی آن برای شکل دادن به فعالیت‌هایش(۱۶).

زخم بسیاری از بیماران با وجود سادگی بدون ویتامین C ترمیم نخواهد شد و در واقع کاهش یا نقص در ویتامین C باعث کاهش فراوانی در سرعت بسته شدن زخم می‌گردد(۱۷).

برگ و همکاران در طی آزمایش‌های گوناگون متوجه شدند که ویتامین C در مقادیر بالا (مولتی‌گرم نه میلی‌گرم) در جلوگیری از خونریزی و بازگشت به حالت اول موثر است. هم‌چنین بدون حضور ویتامین C شکل گیری و جایگزینی بافت‌های جدید امکان پذیر نیست. آن‌ها هم‌چنین با بررسی توسط پرتوی X دریافتند که غضروف (هم در ماتریکس بین سلولی و هم در پری کندریوم) دارای مقادیر بالایی فیبرهای کلاژن است که بدون وجود ویتامین C فاقد عملکرد است و حضور آن سبب تسریع روند رشد و بازسازی در غضروف می‌شود. آن‌ها نشان دادند حتی استخوان هم به طور ظریفی دارای سازماندهی کابل های کلاژن بین سلول‌ها بوده که بدون ویتامین C فاقد عملکرد می‌باشد(۱۸). لذا نتایج این تحقیق در ارتباط با ازدیاد رشد تیغه غضروفی و ضخامت آن در لاله گوش خرگوش هم راستا با نتایج مرتبط با حضور ویتامین C در مقالات دیگر است و از این نظر شاید بتوان توجیه تاثیرات عصاره یونجه را به حضور ویتامین C نیز (علاوه بر ویتامین A) مربوط دانست.

از جمله مواد موثر در ترمیم زخم‌ها اسیدهای آمینه می‌باشند. لیزین یک آمینواسید ضروری است که بدن نمی‌تواند تولید کند و باید در رژیم غذایی وجود داشته باشد در حالی که توانایی ساخت پرولین را دارد. یک زخم ممکن است روزانه ۱۰۰ گرم پروتئین استفاده کند و نیاز برای آمینواسیدهای ضروری برای درمان زخم را بالا ببرد(۱۸). در سال ۲۰۰۱ روسل نشان داد که نقص در لیزین و پرولین از

ترمیم زخم جلوگیری می‌کند. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که نه تنها ویتامین C، لیزین و پرولین برای ساختن بافت آسیب دیده ضروری است بلکه یک تعداد از ماکرومولکول‌های ویژه که تولید انرژی کرده و کوفاکتورهای آنزیمی لازم برای ساخت و ساز هستند، نیز لازمند. هم راستا با این نتایج، از آنجا که عصاره یونجه نیز حاوی برخی اسیدهای آمینه از جمله لیزین می‌باشد(۱۹) لذا نقش ترمیمی این گیاه قابل توجیه به نظر می‌رسد.

در تحقیقات تن کوپل و همکاران در سال ۲۰۰۱ اهمیت غضروف در ترمیم کامل بافت گوش خرگوش به اثبات رسیده است به طوری که اگر سوراخ‌های ایجاد شده بر روی لبه گوش که ناحیه بازی از آن باقی می‌ماند انجام شود، ترمیم با شکست روبرو می‌گردد و در واقع حضور پری کندریوم ضروری است(۲۰).

در تحقیق حاضر در روند ماکروسکوپی ترمیم سوراخ‌ها، سرعت بسته شدن نمونه تست به طور معنی‌داری از نمونه کنترل بالاتر بود و این مسئله احتمالاً گویای وجود مواد موثره‌ای در عصاره‌ی آبی الکلی گیاه یونجه است که بر روند تکثیر سلولی اپیتلیوم و لذا ترمیم زخم موثرند. از آنجا که سرعت رشد و ترمیم تیغه غضروفی در نمونه‌های تیمار افزایش معنی داری نسبت به کنترل داشته است، لذا عصاره‌ی آبی الکلی گیاه یونجه ظاهراً علاوه بر اپیتلیزاسیون، بر کندروژنز و تمایز سلول‌های کندروبلاست و سرعت بازسازی غضروف و ازدیاد آن نیز موثر است.

نتیجه گیری

با توجه به این که عصاره یونجه حاوی بسیاری مواد موثر است که هر یک مطابق مقالات متعدد بر ترمیم زخم موثر بوده‌اند، حضور توأم ویتامین A ، C و اسیدهای آمینه در این عصاره دلایل کافی جهت توصیه مکانیسم‌های احتمالی تاثیر گذار بر روند ترمیم غضروف را در اختیار می‌نهد و با توجه به ارزان بودن و سهولت تهیه این گیاه و عدم مشاهده برخی اثرات سوء مواد دارویی و صنعتی، استفاده فارماکولوژیک از این گیاه در ترمیم زخم‌ها از دلایل متعدد برخوردار است و امید است نتایج این تحقیق زمینه استفاده های فوق را فراهم کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کمک‌ها، رهنمودها و فداکاری بی‌پایان جناب آقای دکتر امین رفیعی، کمک‌های بی شائبه سرکار خانم زهرا وحدتی و همین طور پرسنل زحمتکش بخش حیوانات موسسه واکسن و سرم سازی رازی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Mescher AL, Neff A, King M. Proteomic analysis of changes during the onset of amphibian limb regeneration. The FASEB J 2008; 22:984-5.
2. Stocum DL. Self-organization of the limb bud and regeneration blastema: mechanisms to establish proximal and distal boundaries. Faseb J 2007; 21: A203.
3. Mead KS. An investigative laboratory exercise examining the cell signaling and regulatory properties of neurons in the regenerating forelimbs of the Axolotl ambystoma mexicanum. J of Undergraduate Neurosci Edu 2005; 4(1): A17-A21.
4. Grey JE, Harding KG. ABC of Wound Healing, Philadelphia: Blackwell 2006. p. 1-5.
5. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. American J of Surgery 1998; 176 (2): 26S-38S.
6. Stolz JF. Mechanobiology: cartilage and Chondrocyte. Lancaster: IOS press; 2008. Vol 5. p. 202-10.
7. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. 9th ed. Stamford: Appleton & lange; 2005. p. 22-9
8. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Brielmann HL. Natural products from plants, 2th Edition, CRC Press, 2006, 8(3):268-77.

9. Shington WD, Jones D, Xu X, Cawston TE, Rowan AD. Retinoic acid and Oncostatin M combine to promote cartilage degradation via matrix metalloproteinase-13 expression in bovine but not human chondrocyte. Rheumatology J 2006; 45:958-65.
10. Barnhill JG, Fye CL, Williams DW, Reda DJ, Harris CL, Clegg DO. Chondroitin product selection for the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial. J Am Pharm Assoc 2006; 46 (1): 14–24.
11. Goodman De Witt S, Smith JE, Hembry RM, Dingle JT. Comparison of effects of vitamin A and its analog upon rabbit ear cartilage in organ culture and upon growth of vitamin A-defficient rat. J of Lipid Research 1974; 15: 406-14.
12. Enomoto M, Pan H, Suzuki F, Takigawa M. Physiological role of vitamin A in growth cartilage cells: low concentrations of retinoic acid strongly promote the proliferation of rabbit costal growth cartilage cells in culture. J Biochem 1990; 107(5):743-8.
13. Foster S, Johnson RL. National geographic desk reference to nature's medicine.Desk reference to nature medicine Washington DC: National geographic Society; 2006.
14. Liaudet-Coopman ED, Berchem GJ, Wellstein A. In vivo inhabitation of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma. Clinical Cancer Research 1997; 3(2)179-84.
15. Abdelmalek M, Spencer J. Retinoids and wound healing. Dermatol Surg 2006; 32(10) 1219-30.
16. Parsons KK, Maeda N, Yamauchi M, Banes AJ, Koller BH. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 290:1131–9.
17. Ter Riot G, Kessels AG, Knipschild PG. Randomize clinical trial of ascorbic acid in the treatment of pressure ulcers. J Clin Epidemiol 1995; 48(12):1453-60.
18. Berg RA, Steinmann B. Ascorbate deficiency results in decreased collagen production: under-hydroxylation of praline lead to increased intracellular degradation. Arch Biochem Biophys 2003; 22(6):681-6.
19. Russell L. The importance of patient' s nutritional status in wound healing. Br J Nurs 2001; 10(6):42, 44-9.
20. Ten Koppel PG, Van Osch GJ, Verwoerd CD, Vorwoerd-Verhoef HL. A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the rabbit pinna punch hole model. Biomaterial 2001; 22:1407-14.

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
Autumn 2009; 12(3): 29-38

The wound healing effect of Medicago sativa extract on pinna rabbit cartilage

Khayatzadeh J[1], Farhoodi M[2], Rafiei H[3]*

1- Assistant Professor, PhD of Animal and Developmental Biology, Department of Biology, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2- Research Assistant Professor, PhD of Veterinary Pathology, Department of Pathology, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran
3- MSc of Developmental Biology, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received 16 Jun, 2009 Accepted 17 Aug, 2009

Abstract

Background: Cartilaginous and movement diseases are the most prevalent problem in human. Various vitamins like A and C increase the process of regeneration and wound healing. In this research, the Alfalfa plant with scientific name Medicago sativa, that contains a lot amount of A, C, E and K vitamins, was used and effect of its extract on regeneration of pinna rabbit cartilage was studied.

Materials and Methods: In this experimental laboratory study, 6 New Zealand male rabbits with 2.5-3 kg weight have been selected. After shaving hairs on ears with depilation cream, the ear were anesthetized by lidocaine 10% and 4 holes were punched with 4 mm diameter in medial situation of each ear. Test ears by extract of Medicago sativa and control ear were treated by normal saline every day. Holes era and the distance of two edges of cartilage were measured in various days of healing. Also, tissue sampling for microscopic observation by H&E color (day 0-50) was done.

Results: Regeneration and healing of the treated holes with extract of Medicago sativa was faster than the control holes ($p<0/004$). Also, thickness of cartilage and cell density of chondrocytes and fibroblasts in the newly formed connective tissues in test were more than control.

Conclusion: The extract of Medicago sativa because of A, C vitamins containing, probably increased the wound healing and regeneration of the rabbit ear cartilage and suggest the pharmacological usages.

Keywords: Medicago Sativa, Wound healing, Ear cartilage, Rabbit

*Corresponding author;
Email: rafiei.hossein@gmail.com
Address: Razi Reseach Center, Mashhad, Iran