

## ارزیابی کاربرد ترکیب سنتز شده جدید (متیل ۲' - متیل - ۳,۱ - دی اکسو - ۱', ۲', ۳', ۵', ۶', ۷' - اکتا هیدرو اسپایرو [ ایندن - ۲,۳' - پیرولیزیدین - ۲' ] - ۲ - کربوکسیلات بر روی التیام زخم های برداشتی تمام ضخامت پوست در موش صحرایی دیابتی

لیلا زارعی<sup>۱</sup>، مهری کوهکن<sup>۲\*</sup>، رحیم محمدی<sup>۳</sup>، امیر بلوری<sup>۴</sup>

- ۱- دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
- ۲- استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
- ۳- دانشیار گروه جراحی و تصویر برداری تشخیصی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۴- دانش آموخته دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

یافته / دوره بیست و دوم / شماره ۱ / بهار ۹۹ / مسلسل ۸۳

### چکیده

دریافت مقاله: پذیرش مقاله: ۹۹/۲/۱

**مقدمه:** التیام زخم حاصل برهم کنش پیچیده‌ای از وقایع سلولی و بیوشیمیایی می‌باشد که منجر به بازیابی انسجام بافتی و قدرت کششی آن می‌گردد. دیابت در انسان یک عامل موثر در تاخیر ترمیم زخم می‌باشد. تحقیقات انجام شده بر روی آلكالوئیدهای پیرولیزیدین موید خواص آنتی اکسیدانی آنها می‌باشد که سبب تسهیل روند التیام زخم می‌شوند. هدف ارزیابی کاربرد ترکیب سنتزی جدید (متیل ۲' - متیل - ۳,۱ - دی اکسو - ۱', ۲', ۳', ۵', ۶', ۷' - اکتا هیدرو اسپایرو [ ایندن - ۲,۳' - پیرولیزیدین - ۲' ] - ۲ - کربوکسیلات (ترکیب ۶) بر روی التیام زخم های برداشتی تمام ضخامت پوست در موش صحرایی دیابت بود.

**مواد و روش‌ها:** ۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار پس از ایجاد زخم به سه گروه ۲۰ تایی تقسیم‌بندی شدند. گروه ۱: کنترل سالم، گروه ۲: کنترل دیابتی (القای دیابت در موش‌ها و ایجاد زخم باز و تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ۰/۲۵ درصد به مدت ۱ هفته)، گروه ۳: گروه درمان (القای دیابت در موش‌ها و ایجاد زخم باز همراه با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر داخل صفاقی ترکیب (۶) به مدت ۱ هفته با دوز ۶۰ میکروگرم/کیلوگرم که در DMSO ۰/۲۵ درصد حل شده بود. مطالعات بافت شناسی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ و درصد کاهش سطح زخم در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ انجام گرفت.

**یافته‌ها:** مطالعات بافت شناسی بیانگر کاهش معنی‌دار سلول‌های التهابی و افزایش معنی‌دار فیبروبلاست‌ها در گروه درمان در مقایسه با گروه کنترل دیابتی بود ( $P < 0.05$ ). درصد سطح زخم در گروه درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** درمان با ترکیب جدید (۶) سبب افزایش سرعت ترمیم زخم برداشتی در موش‌های صحرایی دیابتی گردید.

**واژه‌های کلیدی:** زخم برداشتی، موش صحرایی، Indene-2,3'-pyrrolizidine بافت شناسی، دیابت

\*آدرس مکاتبه: ارومیه - دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی

پست الکترونیک: mehrikouhkan@gmail.com

## مقدمه

زخم و ترمیم آن یکی از مهمترین مسائل دنیای امروز از نظر زیبایی و در عین حال سلامتی و بهداشت جامعه است. التیام زخم فرآیند پیچیده ای است که توسط سیگنال‌های مولکولی متشکل از وقایع سلولی صورت می‌پذیرد. ثابت شده است که سلول‌های هسته‌دار مشتق از چربی دارای قابلیت‌های چندگانه‌ی مفیدی در ترمیم زخم‌های تمام ضخامت پوستی می‌باشند (۱).

در طی روند ترمیم، فرایندهای مشخص و هماهنگی از قبیل بازسازی، مهاجرت و تکثیر سلول‌های پارانشیمی و سلول‌های بافت همبند و ساخت مجدد بافت همبند و رگ‌زایی صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه مراحل متعددی در ترمیم زخم شامل: انعقاد، التهاب، گرانولاسیون، فیبروپلازی، کلاژن سازی، انقباض زخم و اپیتلیزاسیون وجود دارد، و بر اساس مطالعات فارماکولوژیکی، فعالیت تسریع‌کنندگی بسیاری از گیاهان داروئی حاوی مواد ترکیبات طبیعی از جمله تاننها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها که توانایی افزایش سرعت بهبود زخم ناشی از حوادث و برخی بیماریها را دارند به اثبات رسیده است (۲،۳).

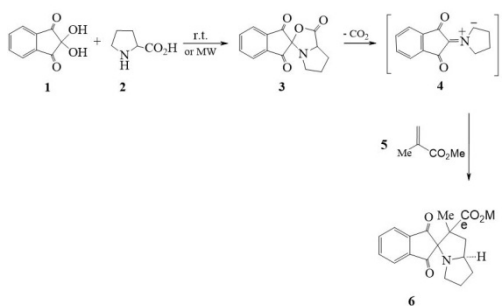
دیابت در انسان، یک علت قوی در به تاخیر انداختن ترمیم زخم می‌باشد، که قابل توجه‌ترین آنها ایجاد اولسرها غیر التیام‌یابنده مزمن است. این اولسرها در نتیجه ترکیبی از نوروپاتی محیطی، آنژیوپاتی و سایر اثرات نامطلوب ترمیم زخم شامل نواقصی در عملکرد لوکوسیت از قبیل کشتن باکتری، اتصال سلولی و کموتاکسی و نواقصی از سنتز کلاژن نتیجه می‌شوند (۴). تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد آلكالوئیدهای پیرولیزیدین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. مطالعه پانگ و همکاران با استفاده از شواهد اسپکتروسکوپی نشان دادند که گیاهان حاوی این آلكالوئیدها واجد خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. واضح است که مواد دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند سبب تسهیل روند التیام زخم شوند (۵).

سیلوا و همکاران ترکیبات فروسیل اکسایندول را مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه یک سری مشتقات اکس ایندول فروسنیل E و Z از طریق جایگزینی اکس ایندول با فروسنیل کربوکسی آلدئید در حضور مورفولین به عنوان کاتالیست تهیه شدند. تاثیرات مشتقات اکسایندول بر روی ترمیم زخم مورد تایید قرار گرفت (۶).

وو و همکاران گزارش کرده‌اند که مهارکننده‌های ۳،۷-دی اریلی میدا ازوپیریدیناز در گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF) وجود دارند (۷). VEGF یک تنظیم‌کننده نفوذپذیری عروق و القاکننده تکثیر، مهاجرت و بقاء سلول‌های اندوتلیال است. فعال‌سازی مسیر VEGF اساس مسیر آنژیوژنز و تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق خونی است. در مکانیزم‌های مولکولی، سیگنال میتوژنیک VEGF از طریق گیرنده تیروزین کیناز (KDR (VEGFR-2 منتقل می‌شود (۸).

اکسایندول‌های اسپیروسیکلی، حدواسطه‌های با ارزش سنتتیکی هستند که واحد‌های اصلی بسیاری از عوامل دارویی و آلكالوئیدها را تشکیل می‌دهند (۹). این ترکیبات به دلیل فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی آنتی‌باکتریال، ضد میکروبی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و بی‌حس‌کننده موضعی، مورد توجه بسیار شیمی‌دانان قرار گرفته‌اند (۱۰،۱۱). از این رو، مسیرهای سنتزی متعددی برای تهیه این مواد ابداع شده است (۱۲،۱۳). واکنش حلقه-زایی ۱،۳- دو قطبی یک روش کارآمد برای سنتز هتروسیکل‌های پنج‌عضوی و اسپیروهتروسیکل‌هایی نظیر پیرولیدین‌ها، پریازولیدین‌ها و پریرولیزین‌ها می‌باشد که به طور گسترده‌ای در محصولات طبیعی و ترکیبات فعال بیولوژیکی وجود دارند (۱۴،۱۵). با وجود روش‌های متعدد برای سنتز آنها، هنوز تهیه اسپیروهتروسیکل‌های جدیدتر، بسیار مورد توجه می‌باشد و تلاش زیادی از نظر تحقیقاتی برای سنتز این مواد انجام شده است. (۱۶،۱۷).

محلولی از نین-هیدرین (۰/۱۷۸ گرم، ۱ میلی مول)، پرولین (۰/۱۱۵ گرم، ۱ میلی مول) و متیل متاکریلات (۰/۰۸۶ گرم، ۱ میلی مول) در اتانول مطلق ریخته و به مدت ۲ دقیقه در دستگاه مایکروویو قرار داده شد، فرایند انجام واکنش با خروج گاز CO<sub>2</sub> مشخص گردید. کامل شدن واکنش با TLC (کروماتوگرافی لایه نازک) بررسی گردید. بعد از کامل شدن واکنش حلال را تحت شرایط خلاء حذف نموده و کریستال‌های زرد ترکیب جدید با بازده ۹۰٪ تولید گردید. (شکل ۱).



شکل ۱- ترکیب سنتز شده جدید (متیل ۲'-متیل-۳,۱-دی اکسو -۷'a'۷'۶'۵'۳'۲'۱'۱'-اکتا هیدرو اسپایرو[ ایندن-۲'۳'-پیرولیزیدین-۲] کربوکسیلات (۶))

### نحوه القای دیابت در موش های صحرائی

در این مطالعه برای دیابتی کردن موش ها از تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی گرم بر کیلو گرم داروی استرپتوزوتوسین شرکت سیگمای آلمان استفاده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت با استفاده از خون گیری از ورید دمی میزان قند خون با گلوکومتر اندازه گیری شد. مقادیر بالای ۳۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر به عنوان موش‌های دیابتی در نظر گرفته شدند.

### گروه بندی حیوانات

ابتدا موش‌ها به صورت شکمی بر روی میز جراحی قرار داده شدند، سپس سطح پشتی موش‌ها ناحیه بین دو کتف آماده‌سازی و اسکراب شده و یک زخم دایره‌ای شکل به قطر ۲۰ میلی‌متر در بین دو کتف با استفاده از تیغ بیستوری و قیچی ایجاد گردید. با ایجاد زخم به روش wounding excisional لایه‌های اپیدرم، درم،

استفاده از ترکیبات سنتز شده جدید و سنجش کارآمدی آنها موضوع تحقیقاتی ارزشمندی است که شایسته تحقیقات دامنه داری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی و ارزیابی کاربرد ترکیب سنتز شده جدید (متیل ۲'-متیل-۳,۱-دی اکسو -۷'a'۷'۶'۵'۳'۲'۱'۱'-اکتا هیدرو اسپایرو[ ایندن-۲'۳'-پیرولیزیدین-۲] کربوکسیلات (۶)) بر روی التیام زخم‌های برداشتی تمام ضخامت پوست در موش صحرائی دیابتی می‌باشد.

### مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آینده نگر بود. در این تحقیق از ۶۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۰±۱۹۰ گرم، تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، استفاده شد. این حیوانات به مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی کلینیک دامپزشکی منتقل شدند و در قفس‌های استاندارد نگهداری موش تحت شرایط نوردهی طبیعی و دمای اتاق یکسان برای تمامی موش‌ها نگهداری شدند.

حیوانات قبل از انجام مطالعات به مدت دو هفته دوره تطابق را گذراندند تا تاثیر منفی استرس ناشی از محیط ناآشنا بر روی نتایج مطالعه‌ی مورد نظر به حداقل برسد. موش‌ها با آب و غذا (پلت) تغذیه شدند و به پلت دسترسی آزاد داشتند. بعد از تصویب طرح در شورای پژوهشی و اخذ مجوز کمیته اخلاقی دانشگاه و دریافت کد اخلاق (ir.umsu.rec.1396.393.) این مطالعه تجربی در بین جمعیت موش‌های صحرائی نر انجام شد. تمام ملاحظات اخلاقی لازم به ویژه نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

### سنتز ترکیب جدید (۶)

برای سنتز استخلاف جدید (متیل ۲'-متیل-۳,۱-دی اکسو -۷'a'۷'۶'۵'۳'۲'۱'۱'-اکتا هیدرو اسپایرو[ ایندن-۲'۳'-پیرولیزیدین-۲] کربوکسیلات (۶)) به شیوه شیمی سبز و جدید در یک ارلن ۵۰ سی سی

آخرین عکس برداری با دوز بالای بیهوشی آسان کشی شدند.

### روش برداشت نمونه‌های بافتی، تهیه و بررسی مقاطع برای بررسی هیستوپاتولوژیک

در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ پس از جراحی از زخم‌های گروه‌های شاهد، کنترل، تیمار نمونه‌ی بافتی برداشته شد. بدین ترتیب که ۴ حیوان بطور تصادفی از هر گروه انتخاب می‌گردید 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 و پوست سالم اخذ گردید. نمونه‌ی بافتی اخذ شده به منظور پایدار کردن در فرمالین ۱۰٪ خنثی بافر دار قرار داده شد پس از تثبیت و قالب‌گیری نمونه‌های بافتی در پارافین، توسط میکروتوم، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. بررسی پراکندگی سلول‌های دخیل در فرآیند ترمیم از قبیل سلول‌های ایمنی، شمارش تعداد و پراکندگی عروقی در یک میلی‌متر مربع محل ترمیم زخم، فیبروبلاست‌ها و فیبروسیت‌ها با استفاده از نرم افزار تصویری

(Image Focus v2.0 build 70723d, Euromex Microscopen bv, 6836 BD Arnhem, The Netherlands.)

ارزیابی گردید. با توجه به اینکه به محض نمونه برداری از زخم در واقع یک زخم جدید بر روی زخم قبلی ایجاد می‌شد، ناگزیر حیوان مورد نمونه برداری از دور مطالعه کنار گذاشته می‌شد تا خدشه‌ای در نتایج ایجاد نگردد.

### ارزیابی پلانی متری (اندازه گیری مساحت زخم)

از تمامی زخم‌های ایجاد شده، همراه با یک خط‌کش به عنوان مقیاس اندازه گیری برای نرم افزار، با دوربین عکاسی دیجیتال عکس برداری شده و روز صفر در نظر

هایپودرم و پنیکولوس به طور کامل برداشته شدند (۳). پس از ایجاد زخم، موش‌ها به صورت زیر در سه گروه ۲۰ تایی تقسیم‌بندی شدند. در هر گروه ۱۵ سر برای مطالعات بافت شناسی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در نظر گرفته شد و ۵ سر برای مطالعات پلانی‌متری در نظر گرفته شد:

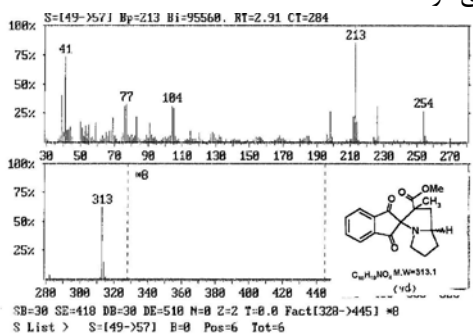
گروه ۱: کنترل سالم (ایجاد زخم باز بدون هیچ گونه دخالتی)

گروه ۲: کنترل دیابتی (القای دیابت در موش‌ها و ایجاد زخم باز و تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ۰/۲۵ درصد به مدت یک هفته)

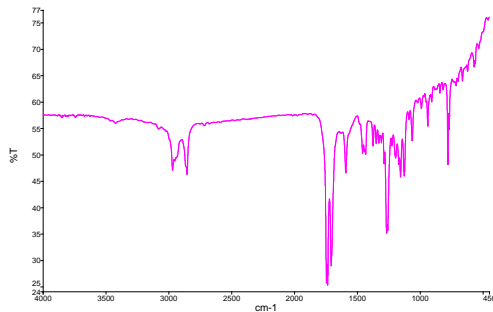
گروه ۳: گروه درمان (القای دیابت در موش‌ها و ایجاد زخم باز همراه با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر داخل صفاقی ترکیب سنتز شده جدید (۶) به مدت یک هفته با غلظت ۶۰ میکروگرم بر کیلوگرم که در DMSO ۰/۲۵ درصد حل شده بود. غلظت انتخاب شده بر اساس مطالعات دیگران صورت گرفته است (۶ و ۸).

به منظور القای دیابت در موش‌های گروه ۲ و ۳ از استریتوزوتوسین استفاده گردید. پس از القای دیابت به منظور تزریق ترکیب سنتز شده جدید، از DMSO به عنوان حلال استفاده گردید. بنابراین به منظور بررسی اثرات DMSO بر روی ترمیم زخم گروه ۲ طراحی گردید تا در نتیجه گیری اثرات داروی حل شده در گروه ۳، بتوان اثر DMSO را نیز تحلیل نمود. زخم‌ها هر روز به مدت ۱۰ روز با محلول سالین نرمال شستشو داده شدند. مطالعات بافت شناسی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام گرفت. موش‌های صحرائی پس از اخذ نمونه با دوز بالای بیهوشی آسان کشی شدند. درصد کاهش سطح زخم (مطالعه پلانی متری) در تمامی گروه‌ها در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ با گرفتن عکس و محاسبات پلانی متری با اندازه گیری مساحت زخم توسط نرم افزار آدوب-آکروبات انجام گرفت. موش‌های صحرائی پس از

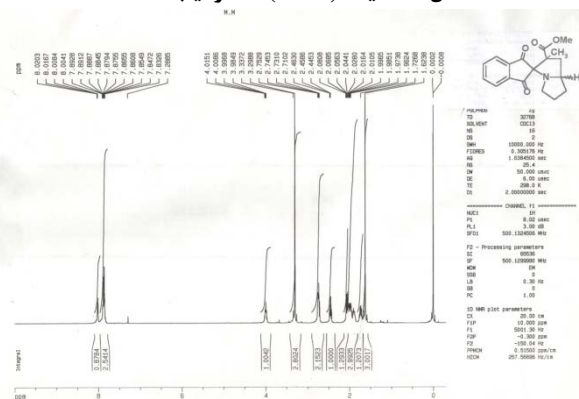
شد و محصولات مشابه با بازده بالا بدست آمد. ساختار ترکیبات حاصل با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی (Mass, IR, <sup>13</sup>CNMR, <sup>1</sup>HNMR) و آنالیز عنصری مورد تایید قرار گرفت. در طیف Mass (شکل ۳) پیام مولکولی M+ در ۳۱۳ = m/e جرم مولکولی این ترکیب را تایید می‌کند. همچنین گسست‌های اولیه با از دست دادن گروه استری (M+CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 30%) حاصل می‌شود. در طیف IR (شکل ۴) ترکیب (۶) ارتعاش کشش کربونیل استری در ۱۱۶۸۰ cm<sup>-1</sup> و کربونیل کتون در ۱۱۵۸۴ cm<sup>-1</sup> ظاهر می‌شود.



شکل ۳- طیف Mass ترکیب (۶).



شکل ۴- طیف IR (cm<sup>-1</sup>) ترکیب (۶)



شکل ۵- طیف <sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>) ترکیب (۶)

ترکیب (۶)

گرفته شد. این کار در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ تکرار گردید. با ابزار اندازه گیری نرم افزار آکروبات ۱ مقیاس لازم تعریف و مساحت زخم محاسبه گردید (شکل ۲).



شکل ۲- نحوه اندازه گیری مساحت زخم با استفاده از نرم افزار Adobe Acrobat 9 Pro Extended software (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA). توجه شود که از یک خط کش به منظور مقیاس استفاده گردید.

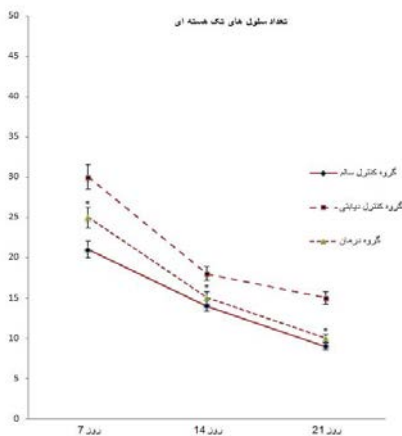
### روش تحلیل داده ها

بعد از انجام کار و اخذ نهایی نتایج، اطلاعات وارد SPSS version 20 شده و داده های توصیفی به صورت میانگین و انحراف معیار (mean ± standard deviation) نشان داده شد. در خصوص انقباض زخم مقادیر بدست آمده با استفاده از تست ANOVA Repeated-Measures و در مطالعه آسیب شناسی مقادیر بدست آمده با ANOVA دوطرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطح معنی داری با  $P > 0.05$  بیان شد.

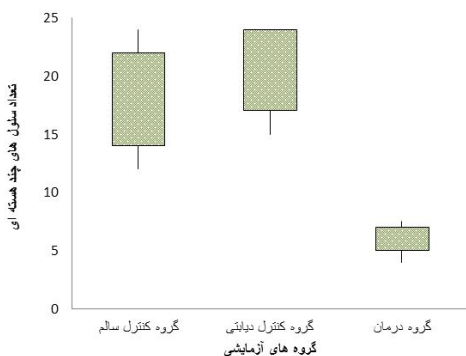
### یافته‌ها

در نتیجه این تحقیق، ترکیب جدید فضا ویژه (متیل-۲'-متیل-۱-۳-دی اکسو-۱'۱-۲'۳'۵'۶'۷'a-اکتا-هیدرو اسپایرو [ایندن-۲,۳'-پیرولیزیدین-۲'-۲-کربوکسیلات (۶) به صورت تک ظرف سنتز شد. این ترکیب از واکنش تک ظرف، نین هیدرین (۱)، آمینو اسید پیرولین (۲) و استرمتیل متاکریلیک اسید (۳) بدست آمد. واکنش با استفاده از دو روش (تشعشع مایکروویو، اتانول، 800 وات) و (دمای اتاق، اتانول، ۳ ساعت) انجام

به محل زخم در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید (شکل ۸). هرچه زخم کمتر در معرض آلودگی و اجرام پاتوژن قرار بگیرد، مرحله‌ی پاک‌سازی زخم زودتر سپری شده و سایر سلول‌های التیامی نقش خود را در ارتباط با التیام زخم بهتر و کامل‌تر ایفا می‌کنند.



شکل ۷- نمودار مربوط به سلول‌های تک هسته ای و روند تغییرات این سلول‌ها در طول دوره‌ی مطالعه. مقادیر بر حسب میانگین  $\pm$  خطای معیار می باشند. \* بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی است ( $P < 0.05$ ).

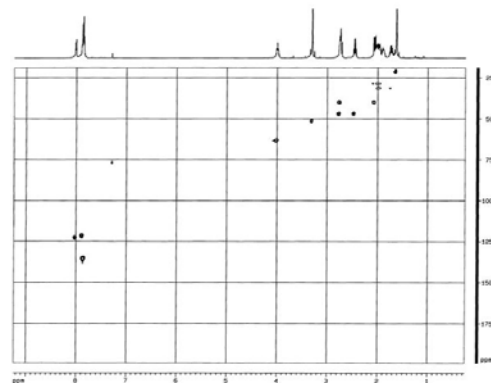


شکل ۸- نمودار Box plot مربوط به سلول‌های چند هسته ای و روند تغییرات این سلول‌ها در طول دوره‌ی مطالعه. مقادیر بر حسب میانگین  $\pm$  خطای معیار می باشند. \* بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی است ( $P < 0.05$ ).

### نتایج ارزیابی‌های پلانی متری

پس از بررسی نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی ترکیب سنتز شده جدید (۶) مشاهده گردید که استفاده از

در طیف  $^1\text{H-NMR}$  این ترکیب (شکل ۵) رزونانس 7a-H به صورت سه تایی سه تایی در هم رفته در ناحیه ۳/۹۹ مشاهده می‌شود. پروتون 1a-H در ناحیه ۲/۰۳ به صورت دوتایی دوتایی با ثابت کوپلاژ  $J=6.8, 12.72$  Hz ظاهر می‌شود. پروتونهای 5a-H و 5b-H در ناحیه ۲/۴۵ و ۲/۷۶ به صورت چندتایی ظاهر می‌شوند. پروتونهای 6,7-H به صورت چندتایی در ناحیه ۱ و ۱ پروتونهای متیل به صورت پیک یکتائی در ۱,۶۷ و پروتونهای متوکسی به صورت یکتایی در ۳,۳۳ مشاهده می‌شوند. ۴ هیدروژن آروماتیک در ۷/۸۴-۸/۰۲ به صورت چندتایی ظاهر می‌شوند. طیف CH-COSY ارتباطات بیان شده را تایید می‌کند (شکل ۶).



شکل ۶- طیف  $^1\text{H-COZY NMR}(\text{CDCl}_3)$  ترکیب (۶)

### نتایج ارزیابی‌های بافت شناسی

باتوجه به یافته‌های هیستوپاتولوژی و آنالیز داده‌های به دست آمده در روزهای مختلف ۱۴، ۷ و ۲۱ تزریق داخل صفاقی ترکیب سنتز شده جدید (۶)، در روزهای ابتدایی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی باعث افزایش بیشتر فراخوانی سلول‌های تک هسته ای (MNC) به محل زخم در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید ( $P < 0.05$ ) (شکل ۷).

عامل بیشتر ترشح فاکتورهای رشد این سلول‌ها می‌باشند. از طرف دیگر با توجه با نمودار Box plot مربوط به سلول‌های چند هسته ای (PMN) تزریق داخل صفاقی ترکیب سنتز شده جدید (۶) باعث ورود کمتر سلول‌های PMN

سلول‌های محل را برای تکثیر آماده می‌سازند. سپس، خود فیبرین باعث تحریک ماکروفاژها برای ترشح سیگنال‌های ترمیمی بیشتر می‌شود. هنگامی که سلول‌های اندوتلیال آسیب‌دیده سیتوکین ترشح می‌کنند، اینترگرین و رسپتور آن در سطح لکوسیت‌های در حال عبور ظاهر شده، التهاب آغاز می‌شود. سلول‌های التهابی تازه رسیده، نیاز متابولیکی را افزایش می‌دهند. از آنجا که ساختار میکروواسکولر موضعی آسیب‌دیده است، کاهش انرژی در محل رخ داده، فشار  $O_2$  کاهش یافته،  $CO_2$  و لاکتات در منطقه آسیب‌دیده تجمع می‌یابند. این وقایع روند ترمیم را آغاز نموده، تداوم آن را تضمین می‌نمایند. در افراد مبتلا به دیابت سطح فاکتورهای رشد، بخصوص فاکتور رشد انسولینی-۱ و فاکتور رشد شبه انسولینی کاهش می‌یابد. نتیجه کاهش سطح این هورمون، کاهش ورود گلوکز به درون سلول‌ها، فیبروپلازی و بطور خاص کاهش مهاجرت و فعالیت فیبروسیتها به محل زخم و در نهایت کاهش سرعت ترمیم زخم می‌باشد و در نتیجه احتمال بروز عفونت در زخم به شدت افزایش می‌یابد (۱۹).

در مرحله اول ترمیم زخم، پس از ایجاد لخته خونی سلول‌های نوتروفیل جهت از بین بردن عوامل عفونت‌زا توسط فاگوسیتوز و ترشح رادیکال‌های آزاد به محل زخم مهاجرت می‌کنند. حضور عوامل عفونت‌زا موجب افزایش تعداد سلول‌های نوتروفیل و بدنبال آن ترشح بیشتر رادیکال‌های آزاد در محل زخم و در نتیجه بروز ادم بافتی بیشتر می‌گردد. پس از نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها به محل زخم مهاجرت می‌کنند و ترشح انواعی از فاکتورهای رشد، موجب تداوم و افزایش سرعت ترمیم می‌گردند (۲۰).

در بررسی روز سوم نمونه برداری، مشخص گردید در گروه درمان میزان ادم در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش یافته بود، از سوی دیگر در همین روز میزان حضور سلول‌های ایمنی در بافت ترمیمی افزایش معنی‌داری را نشان داد. این امر نشان دهنده کوتاه شدن مرحله اول

این ترکیب جدید باعث افزایش میزان جمع شدگی زخم در مقایسه با گروه‌های کنترل دیابتی گردید. به طوریکه با توجه به جدول (۱) میزان جمع شدگی زخم‌ها در گروه درمان بطور معنی‌داری سریعتر از گروه کنترل دیابتی بود ( $P = 0.002$ ).

## بحث و نتیجه گیری

دیابت یک بیماری مزمن است که در آن بدن قادر به استفاده از قند خون از راهی که در افراد طبیعی انجام می‌گیرد، نیست. این بیماری سبب ایجاد عوارضی می‌شود که برخی از این عوارض سبب تأخیر در ترمیم زخم‌ها با مستعد شدن زخم برای عفونت می‌گردد؛ این عوارض شامل: تخریب عصب (نوروپاتی)، ضعف سیستم ایمنی، باریک شدن سرخرگ‌ها می‌باشد. در طی ۲۰ سال اخیر افزایش مرگ و میر ناشی از دیابت بیشتر ناشی از عوارض عروقی دیابت بوده است که شامل درگیری عروق ریز مانند درگیری‌های کلیه و رتینوپاتی و درگیری عروق بزرگ شامل عروق انتهایی اندام تحتانی که به دنبال آن اختلال در فرایند ترمیم زخم رخ می‌دهد (۱۸).

درمان معمول زخم‌های دیابتی شامل شستشو و پانسمان مناسب و استفاده از آنتی‌بوتیک و در صورت نیاز پاک سازی زخم می‌باشد. از این رو بدلیل تعداد بسیار اندک داروهای موجود و با توجه به پیچیدگی روند ترمیم زخم از نظر سرعت و کیفیت بافت التیامی، نتیجه این فرایند طبیعی همواره مطلوب نمی‌باشد و به همین دلیل تحقیقات و مطالعات زیادی در جهت تاثیرگذاری مثبت و یا جلوگیری از تاثیر عوامل منفی بر این روند از هر دو جنبه سرعت تشکیل و کیفیت مناسب بافت التیامی در حال انجام است (۱۸).

بدنبال ایجاد زخم، لخته شدن خون، اولین سیگنال ترمیمی می‌باشد. فیبرینوپتید و ترومبین، ماکروفاژها را به سوی بافت آسیب دیده جذب کرده، پلاکت‌های فعال شده فاکتورهای متعددی ترشح می‌کنند که همگی

طرف دیگر چون گردش خون بالایی دارد حضور سیستم دفاعی و سلول‌های دفاعی در محل بیشتر می‌گردد (۲۴،۲۵).

مهاجرت سلول‌های پوششی به سمت مرکز جغرافیایی زخم به بستری نیاز دارد که این بستر بافت جوانه‌ای است. همچنین بافت جوانه‌ای منبع مهمی از میوفیبروبلاست‌ها است که برای روند جمع شدن و پدیده جمع شدگی لازم است. پدیده جمع شدگی در واقع از پدیده اپیتلیالیزیشن مستقل است، یعنی همزمان با پدیده اپیتلیالیزیشن که بافت پوششی تازه تشکیل به سمت مرکز زخم در حال حرکت است پوست موجود هم حرکتی مستقل دارد این دو پدیده مستقل از هم هستند ولی محصول نهایی هر دو، پوشش دادن منطقه‌ای است که فاقد بافت پوششی است. در زخم‌های که که لبه‌های زخم به وسیله‌ی نخ بخیه به خوبی رو به روی هم قرار گرفته باشند پدیده اپیتلیالیزیشن ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد شروع شده چون نقیصه‌ای وجود ندارد تا به وسیله‌ی بافت جوانه‌ای پر گردد. ولی در زخم‌های باز پدیده اپیتلیالیزیشن تا زمانی که بستری از بافت جوانه‌ای شکل نگیرد و بستر زخم را پوشش ندهد صورت نمی‌گیرد (۲۴). با توجه به یافته‌های این مطالعه مشاهده گردید که گروه درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی باعث شکل‌گیری بافت جوانه‌ای مناسب‌تری گردیده و روند جمع‌شدگی زخم سریعتر بود. افزایش سنتز کلاژن در گروه درمانی نسبت به گروه کنترل دیابتی در این مطالعه بیانگر تاثیر مثبت ترکیب سنتز شده جدید ۶ در بهبود و تسریع سنتز کلاژن و همچنین آرایش و سازمان یافتگی فیبریل‌های کلاژنی و در نهایت افزایش قدرت کششی زخم و جمع شدن سریعتر زخم بود. باتوجه به نتایج به دست آمده از یافته‌های پلانی متری می‌توان این نتیجه را استنباط کرد که ترکیب سنتز شده جدید ۶ به صورت موثرتر و با سرعت بالاتری نسبت به دیگر گروه کنترل دیابتی باعث بسته شدن زخم

ترمیم زخم، یعنی مرحله التهابی، به دلیل کاهش نوتروفیل‌ها و افزایش ماکروفاژها در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت تحت درمان بود.

در ادامه روند ترمیم، مرحله دوم روند التیام زخم با افزایش سلول‌های فیبروبلاست (به دلیل افزایش تولید فاکتورهای رشد) و ساخت و ترشح کلاژن مشخص می‌گردد (۲۱). در این مرحله سلول‌های فیبروبلاست منبع سلولی اصلی در بافت همبند هستند که در ساخت و ترشح کلاژن نقش اصلی را ایفا می‌کنند. بررسی در روز هفتم افزایش معنی‌دار انتشار سلول‌های فیبروبلاست و فیبروسیت را در نمونه بافت ترمیمی گروه درمانی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی را نشان داد. همچنین میزان رتبه‌بندی ساخت و ترشح کلاژن در نمونه بافت ترمیمی گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی را نشان داد. این رخداد را می‌توان به افزایش سلول‌های ایمنی (بخصوص سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای) و به دنبال آن افزایش ترشح فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها بخصوص فاکتور رشد انسولینی و شبه انسولینی در گروه‌های درمانی نسبت داد. یافته‌های مذکور موید گزارشات قبلی می‌باشد (۲۲،۲۳).

همزمان با افزایش ساخت کلاژن و کوچک شدن اندازه زخم، سلول‌های بافت پوششی نیز از سمت لبه‌های زخم به سمت مرکز زخم شروع به ساخت و حرکت می‌کنند. این امر به کوچکتر شدن سطح زخم و عوارض ناشی از بزرگی سطح زخم کمک می‌کند (۲۴).

بافت جوانه‌ای مجموعه‌ای از عروق مویرگی جدید، عروق لنفاوی، ماتریکس بی‌شکل، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و فیبرهای الاستین می‌باشد که یک هفته بعد از جراحی وارد شده توسعه پیدا می‌کند. وجود بافت جوانه‌ای از اهمیت بسیاری برخوردار است. بافت جوانه‌ای محل زخم را پر کرده و به مانند یک سد فیزیکی عمل کرده و از ورود اجرام به داخل زخم جلوگیری می‌کند و از



گردیده است.

به طور کلی، نتایج حاصل از ارزیابی‌های بافت شناسی و پلانی‌متری این مطالعه نشان دادند که ترکیب سنتز شده جدید ۶ توانایی بهتر و سریع‌تری را در التیام زخم-های باز تمام ضخامت در موش صحرایی دیابتی دارد. با توجه به نتایج حاصل و مطالب ذکر شده می‌توان بیان کرد که استفاده از ترکیب سنتز شده جدید ۶ شکل‌گیری بافت جوانه‌ای با ضخامت مناسب‌تر، عروق زایی بهتر، افزایش تزاید فیبروبلاست‌ها، رسوب کلاژن بیشتر در زخم می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان نامه دکتری عمومی نویسنده چهارم می‌باشد که به تصویب معاونت پژوهشی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه رسیده و بخشی از هزینه‌های آن نیز مورد حمایت مالی آن معاونت محترم قرار گرفته است که بدینوسیله تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

## References

1. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6 and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *The Journal of the American Medical Association*. 2001; 286(3): 327-334.
2. Zhang L, Qin Y, Liang D, Li L, Liang Y, Chen L, et al. Association of polymorphisms in LEPR with type 2 diabetes and related metabolic traits in a Chinese population. *Lipids in Health and Disease*. 2018; 17(2): 1-8.
3. Nasli-Esfahani E, Farzadfar F, Kouhnavard M, Ghodssi-Ghassemabadi R, Khajavi A, Peimani M, et al. Iran diabetes research roadmap (IDRR) study: a preliminary study on diabetes research in the world and Iran. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2017; 16(9): 1-8.
4. Mujgan Gurler AC, Koc DO, Ozdemir AA, Ekizoglu I, Altay M, Degirmencioglu S. Serum visfatin levels in patients with subclinical and newly diagnosed type2 diabetes mellitus. *Acta Medica Mediterranea*. 2017; 33: 197-201.
5. Yip Y, Sequeira R, Plank D, Poppitt D. Prevalence of Pre-Diabetes across ethnicities: A review of impaired fasting glucose (IFG) and impaired glucose tolerance (IGT) for classification of dysglycaemia. *Nutrients*. 2017; 9(11): 1-18.
6. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55(3): 774-779.
7. Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103(4): 1036-1042.
8. Romacho T, Elsen M, Rohrborn D, Eckel J. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (oxf)*. 2014; 210(4): 733-753.
9. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005; 307(5708): 426-430.
10. Samal B, Sun, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*. 1994; 14(2): 1431-1437.
11. Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, Ggiot D, Uebain j, Leo O. Pre-B-cell colony – enhancing factor, Whose expression is upregulated in activated lymphocytes, , is a nicotinamide phosphoribosyltransfrase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur Immunol*. 2002; 32(11): 3225-3234.
12. Haider DC, Schindler K, Schaller G, Prager G, Wolzt N, Ludvic B. Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(4): 1578-1581.
13. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/ obesity, type2 diabetes mellitus, insulin resistance,

- metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 27(6): 515-527.
14. Kabir F, Jahan FA, Khan I, Faruque MO, Hassan Z, Ali L. Increased concentration of circulating visfatin associates with post-challenged hyperglycaemia and insulin resistance in IGT subjects. *Journal of Taibah University Medical Sciences.* 2015; 10(4): 481-487.
  15. Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, et al. Nampt /PBEF/ Visfatin Regulates Insulin Secretion in  $\beta$  Cells as a Systemic NAD biosynthetic Enzyme. *Cell Metabolism.* 2007; 6(5): 363-375.
  16. McGee KC, Harte AL, da silva NF, Al-Daghri N, Creely SJ, Kusminsky SM, et al. Visfatin is regulated by rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus and influenced by NF $\kappa$  $\beta$  and JNK in human abdominal subcutaneous adipocytes. *PLoS one.* 2011; 6(6): e 20287.
  17. Kaminska A, kopczynska E, Bronisz A, Żmudzińska M, Bieliński M, Borkowska A. An evaluation of visfatin levels in obese subjects. *Endokrynol PoL.* 2010; 61: 169-173.
  18. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulation of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1212: E1-E19.
  19. Piveta VM, Bittencourt CS, Oliveira CSV, Saddi-Rosa P, Meira DM, Giuffrida FMA, et al. Individuals with prediabetes identified by HbA1c undergoing coronary angiography have worse cardiometabolic profile than those identified by fasting glucose. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2014; 6(138): 1-7.
  20. Dogru T, Sonmez A, Tasci I, Bozoglu E, Yilmaz MI, Genec H, et al. Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 2007; 76(1): 24-29.
  21. Hammarstedt A, Pihlajamaki J, Rotter S V, Gogg S, Jansson PA, Lakso M, et al. Visfatin is an adipokine, but it is not regulated by thiazolidinediones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91(3): 1181-1184.
  22. Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with Type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91(1): 295-299.
  23. Lopez-Bermejo A, Chico-Julia B, Fernandez-Balsells M, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, et al. Serum visfatin increases with progressive  $\beta$ -cell deterioration. *Diabetes.* 2006; 55(10): 2871-2875.
  24. Yaturu S, Davis J, Franklin L, Shi R, Venkatesh P, Jain SK. Visfatin levels are low in subjects with type 2 diabetes compared to age-matched controls. *Journal of Diabetes Mellitus.* 2012; 2(4): 373-377.
  25. Baltaci D, Tuncel MC, Cetinkaya M, Gunduz MT, Ozbey Z, Ozlem Admis O, et al. Evaluation of Visfatin in Patients with Obesity, Metabolic Syndrome, Insulin Resistance and Impaired . Glucose

- Tolerance; Case-Control Study. *Acta Med Anatol.* 2016; 4(2): 61-67.
26. Pagano C, Pilon C, Olivieri M, Mason P, Fabris R, Serra R, et al. Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91(8): 3165-3170.
27. Berndt J, Klöting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-Specific mRNA expression in humans. *Diabetes.* 2005; 54(10): 2911-2916.
28. Martínez Larrad MT, Anchuelo AC, Pérez CF Barba MP, et al. Obesity and Cardiovascular Risk: Variations in Visfatin Gene Can Modify the Obesity Associated Cardiovascular Risk. Results from the Segovia Population Based-Study. Spain. *PLOS ONE.* 2016; 11(5): e0153976.
29. Fayad MH, Mohammed M, Megid A, Ahmed SS, Amer Amer AA. Serum visfatin, ferritin and lipid Atherogenic risk ratios as predictors of cardiovascular diseases. *Annals of medical and biochemical sciences.* 2017; 3(1): 27-34.

## An Evaluation of the Application of a Novel Synthetic Compound of Methyl 2'-Methyl-1,3-dioxo-1,1',2',3,5',6',7',7a'-octahydrospiro[indene-2,3'-pyrrolizidine] - 2' Carboxylate (6) on the Full-Thickness Excisional Wound Healing in Diabetic Rats

Zaeri L<sup>1</sup>, Kouhkan M<sup>2\*</sup>, Mohammadi R,<sup>3</sup> Bolouri A<sup>4</sup>

1. Associate Professor of Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

2. Assistant Professor of Department of Medical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, mehrikouhkan@gmail.com

3. Associate Professor of Department of Surgery and Diagnostic Imaging, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

4. Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Received: March. 18, 2020 Accepted: Apr. 20, 2020

### Abstract

**Background:** Wound healing is the interaction of a complex cascade of cellular and biochemical actions leading to the restoration of structural and functional integrity with regaining the strength of injured tissues. Diabetes is effective in delaying the wound healing process in human beings. It has been reported that pyroizilidine derivatives bear antioxidant activity and antioxidant agents that accelerate wound healing process. The aim of the present study was to assess the activity of Methyl 2'-Methyl-1,3-dioxo-1,1',2',3,5',6',7',7a'-octahydrospiro[indene-2,3'-pyrrolizidine]-2' carboxylate (6) on the full-thickness excisional wound healing in diabetic rats.

**Material and Methods:** 60 male Wistar rats were randomized into three groups of 20 animals following the creation of the wound. Group 1 (normal control): creation of the wound with no further intervention. Group 2 (diabetic control): induction of diabetes in the animals and creation of the wound with the intraperitoneal administration of 100 microliter DMSO (0.25%) for one week. Group 3 (treatment): induction of diabetes in the animals and creation of the wound with the intraperitoneal administration of 100 microliter of the synthesized agent (60 µg/kg) dissolved in DMSO (0.25%) for one week. Induction of diabetes in the animals of groups 2 and 3 was performed using streptozotocin. Histologic studies were conducted on the days 7, 14 and 21 post wounding. Planimetric studies were carried out on the days 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 post wounding.

**Results:** The histologic studies indicated a significant decrease in inflammatory cells and a noticeable increase in fibroblasts (P<0.05).

**Conclusion:** It could be concluded that treatment with the synthesized agent (6) could increase wound healing rate in diabetic rats.

**Keywords:** excisional wound, Wistar rats, Indene-2, 3'-pyrrolizidine, histology, diabetes

\***Citation:** Zaeri L, Kouhkan M, Mohammadi R, Bolouri A. An Evaluation of the Application of a Novel Synthetic Compound of Methyl 2'-Methyl-1,3-dioxo-1,1',2',3,5',6',7',7a'-octahydrospiro[indene-2,3'-pyrrolizidine] -2' Carboxylate (6) on the Full-Thickness Excisional Wound Healing in Diabetic Rats. *Yafte*. 2020; 22(1):56-68.