

بررسی هیستوپاتولوژیکی اثر سینرژیک مصرف موضعی اسانس *Mentha pulegium* و عسل در ترمیم پذیری بستر زخم باز پوستی

علیرضا تک‌زارع^۱، مهرداد گودرزی^۱، طیبه رستگار^۲، شکبیا شاه‌بابایی^۳، نسرين تک‌زارع^{۲*}

- ۱- گروه بیهوشی، بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۲- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
 تلفن و نمابر: ۸۸۹۵۳۰۰۸ (۰۲۱)
 پست الکترونیک: takzaree@tums.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.4.72.s12.274

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۱۰

چکیده

مقدمه: یکی از اهداف درمان علم پزشکی، ترمیم زخم در زمان کوتاه‌تر، با عوارض جانبی کمتر می‌باشد. اهمیت و اثربخشی استفاده از گیاهان دارویی در سالیان اخیر افزایش یافته است.

هدف: مطالعه حاضر جهت بررسی اثر سینرژیک مصرف موضعی اسانس نعنا و عسل در ترمیم‌پذیری بستر زخم باز پوستی رت انجام شده است. روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۷۵ سر رت نژاد Wistar انجام گرفت. تحت بیهوشی، زخمی مربع به ابعاد ۱۵ × ۱۵ میلی‌متر ایجاد شد. برای توزیع موش‌ها روش تصادفی اعمال شد. سطح زخم‌ها در گروه‌های تجربی روزانه یک بار با نعنا، عسل، ترکیبی از هر دو و پماد فنی توئین پوشانیده شد. در گروه شاهد هیچ گونه تیماری انجام نشد. در بررسی ماکروسکوپی و اندازه‌گیری سطح زخم، در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ ارزیابی شد. در بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی، یک نمونه از بستر زخم از تمام گروه‌های مورد مطالعه برداشته شد و مورد پردازش بافتی قرار گرفت. برای بررسی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و یا دوطرفه استفاده شد. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شده و نیز مقدار $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: در گروه درمانی ترکیب عسل و نعنا در مقایسه با گروه‌های دیگر (درصد بهبودی بیشتر و مساحت زخم کمتر) اثربخشی بر روی تسریع ترمیم زخم، به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: مصرف ترکیب اسانس نعنا و عسل در ترمیم‌پذیری زخم باز پوستی مؤثر بوده و باعث تسریع ترمیم زخم شده است.

کل واژگان: ترمیم زخم پوستی، سینرژیک، عسل، نعنا



مقدمه

یکی از مهم‌ترین مسائلی که علم پزشکی با آن روبرو بوده و می‌باشد، مسأله تسریع ترمیم زخم‌ها است. از گذشته‌های دور پزشکان با توسعه‌ی روش‌های مؤثر در پی درمان زخم در کوتاه‌ترین مدت با کمترین عارضه بوده‌اند [۱، ۲].

در حال حاضر در ایران برای درمان جراحات‌ها از محلول‌های ضد عفونی کننده نظیر بتادین، اسید استیک، شستشو با محلول سرم فیزیولوژی و استفاده از پمادهای آنتی‌بیوتیک و هیدروکورتیزون مرسوم است. در صورتی که نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از محلول‌های ضد عفونی کننده بر روی زخم‌های باز برای فعالیت طبیعی فیبروبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های مورد نیاز ترمیم زخم سمی هستند [۲].

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی بخصوص گیاهان دارویی اساس درمان محسوب می‌شدند و در همین حال مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت [۳، ۴]. امروزه به علت کم بودن عوارض جانبی گیاهان دارویی، گوناگونی ترکیبات مؤثر موجود در گیاهان، گرایش مجددی به مصرف گیاهان دارویی به وجود آمده است [۵، ۶].

زخم، به معنای تخریب ساختمان آناتومیکی و عملکردی پوست است و در پی آن عمل ترمیم شروع می‌شود. ترمیم بافت‌های آسیب دیده در بدن، شامل یک سری روند پیچیده و منظم است. سرعت بهبودی زخم تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل تغذیه، ویتامین‌ها، هورمون‌های استروئیدی، فاکتورهای رشد، اکسیژن و عوامل محیطی قرار دارد [۷، ۹].

التیام زخم یک پاسخ دینامیک به آسیب بوده و مستلزم تعامل بین انواع مختلف سلول‌ها، پروتئین‌های ساختمانی و فاکتورهای رشد می‌باشد. سلول‌های ماکروفاژ، نوتروفیل و فیبروبلاست‌ها نقش مهمی در ترمیم زخم دارند. عملکرد اصلی عوامل رشد، فراخواندن سلول‌های مختلف به زخم، تحریک تزاید سلولی، تحریک آنژیوژنز و تنظیم سنتز، تجزیه ماتریکس خارج سلولی و اپی‌تلیزاسیون می‌باشد. در فرایند ترمیم، سلول‌های فیبروبلاست در محل آسیب تجمع می‌کنند و از فعالیت آنها، رشته کلاژن و پروتئوگلیکان بافت همبند ترشح می‌شود که لبه‌های زخم را به هم نزدیک کرده و سبب ترمیم می‌شود [۱۰].

پس از ایجاد زخم و آسیب سیستم عروقی، پلاکت‌ها باعث فعال شدن روند انعقاد و ایجاد فیبرین می‌شوند. در ادامه سیستم کمپلمان فعال شده و افزایش پروستاگلاندین‌ها، سبب اتساع عروق کوچک و موضعی شده و پروتئین‌های پلازما و گلبول‌های سفید، وارد محل زخم می‌شوند. ماکروفاژها، چندین فاکتور رشد ترشح می‌کنند که این فاکتورها؛ فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال را برای ترمیم زخم تحریک می‌کنند. آنژیوژنز یا رگزایی، رکن لازم ترمیم می‌باشد، با اضافه کردن مواد کموتاکتیک به سلول‌های اندوتلیال، عمل رگزایی قابل القاء می‌باشد [۱۱، ۱۲].

سلول‌های کراتینوسیت اپیدرم، فیبروبلاست‌های ویژه درم و سلول‌های اندوتلیال دیواره عروق، شرایط لازم برای ترمیم بستر زخم را فراهم می‌نمایند. این سلول‌ها، فرآیند ترمیم را با تولید ماتریکس خارج سلولی، پروتئازها، رشته‌های کلاژن، فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌هایی که تحریک‌کننده یا بازدارنده‌ی فعالیت‌های خاص سلول هستند، هماهنگ می‌کنند [۱۳].

نعنا فلفلی با نام علمی *Mentha pulegium* از خانواده نعنائیان (Labiatae = Lamiaceae) بوده و گیاهی است علفی و چندساله که دارای ساقه‌های چهارگوش و گل‌های بنفش روشن که به صورت خوشه‌های مرکب می‌باشد. نعنا فلفلی مقادیر بالایی منتول (۴۰/۷ درصد) دارد. علاوه بر این، دارای منتون (۲۳/۴ درصد)، استرهای منتیل، لیمونین، Pulegone، Caryophyllene و پینن است. علاوه بر این، نعنا فلفلی دارای فلاونوئیدهایی مانند Eriocitrin، هسپریدین و کامپفرول است [۱۴، ۱۵]. نعنا، ضداسپاسم بوده و برای درمان التهابات روده ای، التهاب مخاط دهان، زکام و مشکلات تنفسی مناسب است. استفاده خارجی از روغن نعنا برای کاهش دردهای عصبی و عضلانی مفید است [۱۶، ۲۰]. در مطالعاتی که بر روی اثرات درمانی عصاره‌ی نعنا انجام شده، نشان می‌دهند که این عصاره القاکننده‌ی اثرات ضد درد می‌باشد [۲۱]. همچنین نعنا باعث تسریع بسته شدن محل زخم می‌شود [۲۲]. به علت اثرات ضد دردی و ضدباکتریایی این گیاه و تأثیر آن در ترمیم زخم، ما از عصاره‌ی این گیاه (نعنا) در ترکیب خود استفاده کردیم.



تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنائی قرار گرفتند و به آب و غذای آماده موش دسترسی آزاد داشتند. رت‌ها در قفس‌های استاندارد به صورت مجزا نگهداری شدند. شرایط حیوانخانه در حد استاندارد با محدوده دمای ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعبیه شد. در روز جراحی، ابتدا رت‌ها بیهوش شدند. برای بیهوش کردن رت‌ها کتامین هیدروکلراید کالیسول به میزان ۵ میلی‌گرم (Ketalar, Gedeon Richter, Budapest, Hungary) به ازای هر صد گرم وزن بدن به عنوان داروی بیهوشی اصلی و دیازپام به میزان ۰/۴۵ میلی‌گرم به ازای هر صد گرم وزن بدن به منظور شل کردن (Valium, Chemidarou, Iran) و پنتازوسین برای پیش بیهوشی، (Pentazocine, Chemidarou, Iran) با مقدار ۰/۰۴ میلی‌گرم به ازای هر صد گرم وزن بدن به کار رفت. داروهای بیهوشی به صورت داخل صفاقی به حیوان تزریق شدند. ترکیب کتامین - دیازپام عمدتاً برای القاء بیهوشی و نیز انجام اعمال بدون درد توصیه شده است. این ترکیب خواص ضددردی احشایی ضعیفی داشته و عمدتاً برای اعمال جراحی بر روی پوست مناسب است [۳۳]. تحت بیهوشی عمومی موهای ناحیه پشت گردن حیوان تراشیده شد و با پویدین - آیودین ضد Povidin-Iodine (Betadine, Chemidarou, Iran) عفونی شد. تحت شرایط استریل با تیغ بیستوری شماره ۲۱، زخمی مربع به ابعاد ۱۵ × ۱۵ میلی‌متر با ضخامت کامل پوست ایجاد شد. روز جراحی روز صفر محسوب شد و روز بعد، روز یک و به همین صورت الی آخر. برای توزیع موش‌ها در گروه‌های شاهد و تجربی روش تصادفی اعمال شد. رت‌ها به طور تصادفی در گروه‌های کنترل، تجربی یک، تجربی دو، گروه ترکیبی و گروه کنترل مثبت، تقسیم شدند. هر گروه به سه دسته کوچک‌تر با دوره‌های بررسی چهار، هفت و ۱۴ روزه تقسیم شدند. پس از روز صفر سطح زخم‌ها در گروه تجربی اول روزانه یک بار صد میلی‌گرم اسانس *Mentha piperita* Linn. گروه تجربی دو روزانه یک بار صد میلی‌گرم عسل؛ در گروه ترکیبی صد میلی‌گرم از ترکیب *Mentha piperita* Linn. و عسل، در نهایت در گروه کنترل مثبت روزانه یک بار از صد میلی‌گرم کرم فنی توین ۱ درصد استفاده شد. بر روی زخم‌های گروه کنترل هیچ‌گونه تیماری انجام نمی‌گرفت [۳۴].

عسل، محصول طبیعی است که دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی است و در جلوگیری و پاکسازی عفونت‌های زخم مؤثر می‌باشد. این محصول در علم پزشکی به عنوان یک محصول مراقبت از زخم مورد استفاده قرار گرفته است [۲۳]. عسل دارای چندین مکانیسم از جمله اثر اسمزی، pH پایین و تولید پراکسید هیدروژن است که به فعالیت ضد میکروبی آن کمک می‌کند. عسل مانع رشد باکتری‌ها و تولید محصولات متابولیکی شده و ترمیم زخم را بواسطه رگزایی، گرانولاسیون و اپی‌تلیالیزاسیون سرعت می‌بخشد [۲۴].

خاصیت ضد میکروبی عسل در رابطه با قند فراوان، اسمولاریتی بالا، اسیدیته، وجود مهارکننده‌هایی مانند پراکسید هیدروژن، اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها می‌باشد [۲۵، ۲۶]. عسل محتوی ۸۰ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد آب می‌باشد. عسل حاوی مواد معدنی و انواع ویتامین‌های محلول در آب و محلول در چربی و نیز اسیدهای چرب می‌باشد [۲۷، ۲۸]. مقدار ویتامین C عسل، سه برابر بیشتر از پلاسما است و نقش تغذیه‌ای روی بافت آسیب دیده در حال ترمیم دارد. همچنین خواص میتوژنیک بر روی لنفوسیت‌های B و T نیز، با استفاده از عسل، گزارش شده است [۲۹، ۳۲].

تسریع روند فعالیت و ترمیم زخم‌ها، با تحریک یک عامل خارجی قادر است مدت زمان بی‌حرکتی بیمار و هزینه‌های درمانی وی را کاهش دهد و باعث بازگشت سریع‌تر مجروحان به کار و فعالیت روزمره شود. به همین علت مطالعه حاضر با هدف تسریع ترمیم زخم، به منظور ساخت ترکیبی که منشاء گیاهی و طبیعی دارد، طراحی شد تا تسریع ترمیم زخم و اثر سینرژیک و هم‌افزایی مصرف موضعی اسانس نعنا و عسل در ترمیم‌پذیری بستر زخم باز پوستی رت مورد بررسی قرار گیرد و نتایج آن در اختیار علم پزشکی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و ایجاد زخم

در این مطالعه تجربی ۷۵ سر (Rat) بالغ نر سالم نژاد wistar با محدوده وزنی ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم و محدوده سنی ۳ تا ۴ ماه انتخاب شدند. رت‌ها در طی دوره آزمایش، ۱۲ ساعت در



درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه، نگه داری شد [۲۷]. در هنگام تهیه ترکیب، با حرارت ملایم عسل و نعنا مخلوط شده و به آرامی هم زده شد تا مخلوط یکنواخت و همگنی به دست آید.

بررسی ماکروسکوپی بهبودی زخم

بهبودی زخم از طریق اندازه‌گیری سطح زخم، درصد بهبودی زخم و مدت زمان لازم جهت بسته شدن و ترمیم کامل زخم ارزیابی شد. به منظور انجام ارزیابی‌های ماکروسکوپی اندازه‌گیری سطح زخم در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ از سطح زخم انجام شد. برای اندازه‌گیری سطح زخم و درصد بهبودی زخم در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ عکس تهیه شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Image J مساحت سطح زخم به میلی‌متر اندازه گرفته شد و بعد از آن درصد بهبود زخم با فرمول زیر محاسبه شد [۳۴]:

$$100 * \frac{(\text{سطح زخم در روز } X) - (\text{سطح زخم در روز اول})}{(\text{سطح زخم در روز اول})} = \text{درصد بهبودی زخم}$$

که در آن X روز اندازه‌گیری سطح زخم است.

بررسی میکروسکوپی بهبودی زخم

به منظور انجام بررسی‌های میکروسکوپی و مطالعه سلولی بستر زخم در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ در زمان مشخصی از روز رت‌ها بیهوش شدند و سپس یک نمونه از بستر زخم و پوست سالم مجاور برداشته شد. نمونه برداشته شده بلافاصله در محلول فیکساتیو فرمالین ده درصد قرار داده شد. نمونه مورد پردازش بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E stain) و تری‌کروم ماسون (Masson's trichrome stain) قرار گرفت [۲۷، ۳۴].

مشخصات ابزار جمع‌آوری اطلاعات

برای بررسی‌های کمی جهت اندازه‌گیری زخم و شمارش سلول‌های بستر زخم از عدسی ابژکتیو، میکروسکوپ نوری Olympus CX31 Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) و نرم‌افزار Image J استفاده شد.

(Digital Image Processing for Medical Applications Image J 1.46r, Java 1.6.0-20 Cambridge University)

روش تهیه اسانس *Mentha pulegium*. Essence preparation

جهت تهیه اسانس نعنا، برگ‌های تازه گیاه *Mentha pulegium* در خرداد ماه از باغ گیاهان دارویی کاشان با کد هرباریومی ۸۳۴۵۳ جمع‌آوری شد و پس از تأیید گروه فارماکوگنوزی در سایه و در دمای اطاق خشکانیده و خرد شد. سپس جهت اسانس‌گیری حدود ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در بالن نیم لیتری دستگاه کلونجر (Rotary Evaporator, Heidolph, Germany) ریخته شد و مقدار چهار برابر وزن گیاه به آن آب اضافه شد. اسانس موجود در گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۵ ساعت استخراج شد. اسانس به دست آمده پس از آبگیری با سولفات سدیم انیدرید درون شیشه تیره رنگی جمع‌آوری شد و تا ساخت ترکیب در یخچال نگه داری شد [۴۰].

روش تهیه عسل

عسل مورد استفاده در این مطالعه از کندوهای زنبور عسل واقع در آذربایجان در خرداد و تیرماه (عسل آویشن) تهیه شد. نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه تحقیقاتی فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی منتقل شد. در ابتدا عسل در حرارت ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد از صافی عبور داده شده و در پروسه تهیه به هیچ عنوان از حرارت مستقیم استفاده نشد، زیرا آمینو اسید پرولین که در روند ترمیم زخم از ترکیبات مهم است، در اثر حرارت از بین می‌رود. در مرحله بعد عسل، در آزمایشگاه بیوشیمی آنالیز شده عسلی وارد پروسه تحقیق شد که دارای رطوبت ۱۵ درصد، pH ۳/۸، گلوکز ۴۰ درصد، فروکتوز ۳۵ درصد، سوکروز ۳ درصد و شامل مقادیری سدیم، منیزیم، پتاسیم، کلسیم، منگنز، روی و مس باشد. پرتودهی گاما برای ضدعفونی عسل صورت گرفت. پرتودهی گاما نوعی از انرژی تشعشعی است که به روش یونی عمل می‌کند و در این روش یون‌ها به صورت موج نامرئی از میان فضای مولکولی حرکت می‌کنند و جانداران ریز و عواملی را که باعث آلودگی می‌شود، از بین می‌برند و یا کاهش می‌دهند. عسلی که با این پروسه تهیه شد، تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۴



روش محاسبه حجم نمونه و تعداد آن

با استفاده از داده‌های مقاله مشابه که مشتمل بر میانگین و انحراف معیار متغیرهای پیامد در گروه‌های مختلف است، با استفاده از نرم‌افزار G-Power version 3.1.7 و در دو وضعیت (آنالیز واریانس یک‌طرفه و دیگری آنالیز واریانس داده‌های تکراری برای ارزیابی تغییرات درون گروهی در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰، ۱۴) حجم نمونه محاسبه شد. در تمامی حالات، ۵ رت در هر گروه (مجموعاً ۷۵ رت در ۵ گروه ۱۵ تایی) برای رسیدن به اهداف مطالعه مناسب بیان شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز داده‌ها، بوسیله آمار توصیفی و تحلیلی صورت پذیرفت. برای توصیف متغیرها در هر گروه از میانگین و انحراف معیار استفاده شد. برای بررسی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و یا دوطرفه برحسب نیاز مورد استفاده قرار گرفت. برای نشان دادن تغییرات هر گروه در روزهای مختلف از نمودار خطی استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شده و نیز مقدار $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

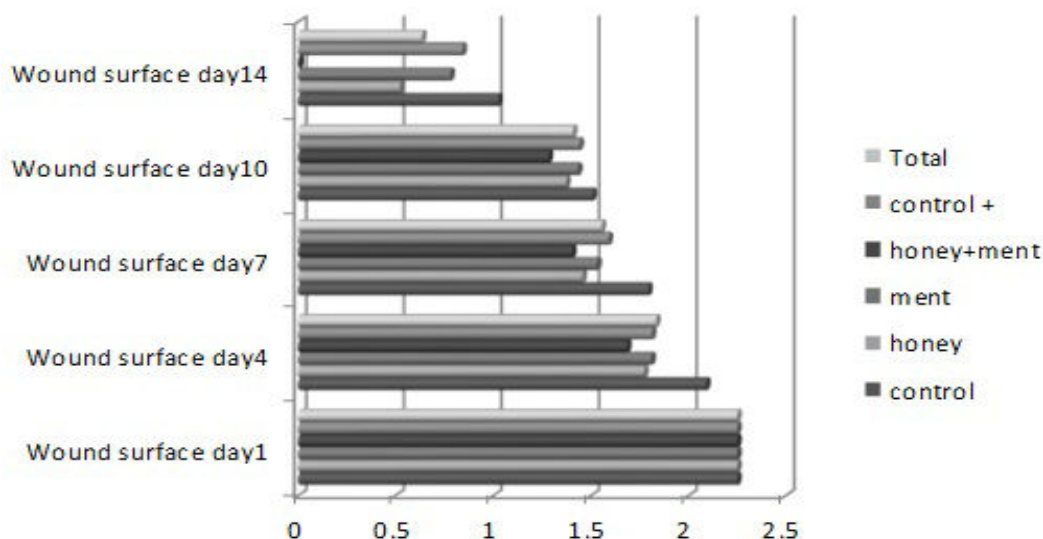
نتایج

نتایج بررسی‌های ماکروسکوپی

نتایج بررسی ماکروسکوپی و بررسی میانگین سطح زخم بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی اختلاف معناداری را نشان داد. ارزیابی میزان سطح زخم در روزهای مختلف (۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴) در نمودار شماره ۱ وارد شده است. مقایسه درصد بهبودی زخم در گروه‌های مطالعه در روزهای مختلف و مقایسه آن با گروه کنترل در نمودار شماره ۲ وارد شده است.

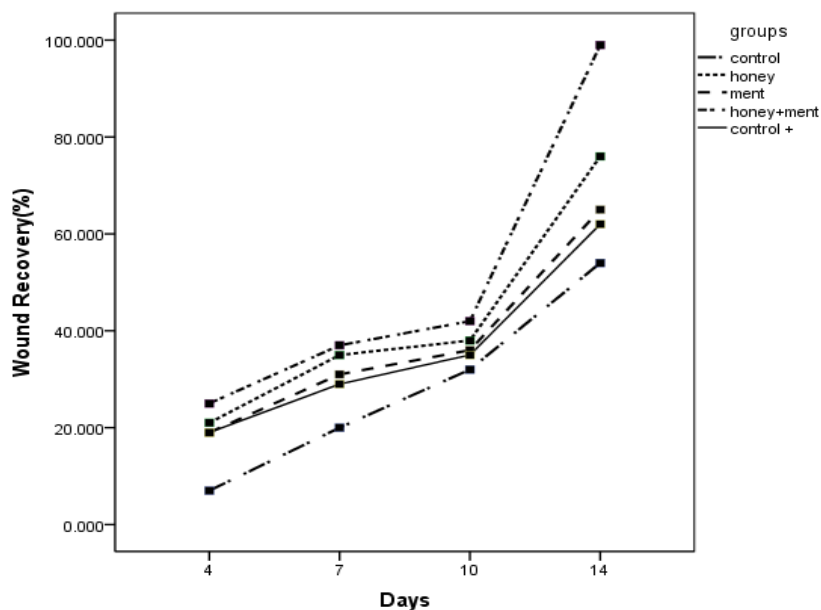
نتایج بررسی‌های میکروسکوپی

نتایج بررسی میکروسکوپی پارامترهای هیستولوژیکی بستر زخم (میانگین تعداد فیبروبلاست، نوتروفیل و ماکروفاژ) (تصویر شماره ۱) در گروه‌های مورد مطالعه در روزهای چهار، هفت و چهاردهم در جدول شماره ۱ وارد شده است. نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های نوتروفیل، ماکروفاژ، فیبروبلاست و سطح زخم در گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل اختلاف معنادار آماری دارند ($P < 0/05$).



نمودار شماره ۱- نمودار مساحت زخم (Cm^2) به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴. برای مقایسه‌ی مساحت زخم بین گروه‌های مورد مطالعه در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ از *Tests of Within-Subjects Effects*، *Mauchly's Test of Sphericity*، *Multivariate Tests* و *Tests of Between-Subjects Effects* استفاده شد، که نتایج آنها حاکی از این بودند، که مساحت زخم به طور معناداری ($P < 0/001$) در موش‌های صحرائی تحت درمان با عسل یا نعنا یا ترکیب این دو از گروه‌های کنترل و کنترل مثبت در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ کمتر بوده است. به طوری که سطح زخم در گروه درمانی ترکیبی در روز چهاردهم به صفر رسیده و درصد بهبودی صد در صد می‌باشد ($P < 0/001$).





نمودار شماره ۲ - مقایسه درصد بهبودی زخم به تفکیک گروه‌ها در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴. برای مقایسه درصد بهبودی زخم بین گروه‌های مورد مطالعه در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ از *Tests of Between-Subjects Effects* و *Contrasts* استفاده شد، که نتایج حاکی از این بودند که درصد بهبودی زخم به طور معناداری ($P < 0.001$) در موش‌های صحرائی تحت درمان با ترکیب درمانی عسل و نعنا از گروه‌های دیگر در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ بیشتر بوده است و موجب بهبودی بیشتری نسبت به سایر درمان‌ها شده بود. مقادیر به صورت میانگین و فاصله اطمینان ۹۵ درصد بیان شده‌اند.

جدول شماره ۱ - نتایج میکروسکوپی مقایسه پارامترهای هیستولوژیک بستر زخم (تعداد فیروبلاست‌ها، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها) در تمام گروه‌های مورد مطالعه (۵ گروه) در روزهای چهارم و هفتم و چهاردهم

گروه‌ها	نوتروفیل (Mean ± SE)		ماکروفاژ (Mean ± SE)			فیروبلاست (Mean ± SE)	
	روز چهارم	روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهارم	روز چهاردهم	روز هفتم
کنترل	۲۰/۸۰±۲/۳	۱۸/۶۰±۱/۱	۸/۲۰±۱/۶	۶/۲۰±۰/۸	۳/۴۰±۰/۵	۵/۱۰±۰/۷	۹۶/۴۰±۱/۵
عسل	۱۶/۸۰±۱/۳	۱۴/۴۰±۱/۱	۳/۸۰±۰/۸	۸/۶۰±۰/۵	۲/۲۰±۰/۸	۷/۶۰±۱/۱	۱۲۶/۲۰±۲/۷
نعنا	۱۴/۸۰±۰/۸	۱۱/۴۰±۱/۳	۲/۸۰±۰/۸	۷/۲۰±۰/۸	۱/۰±۰/۷	۶/۸۰±۰/۸	۱۲۰/۴۰±۱/۱
عسل و نعنا	۱۰/۸۰±۱/۰	۸/۰۰±۱/۵	*۱/۴۰±۰/۵	۱۰/۴۰±۱/۱	*۰/۶۰±۰/۵	۸/۰۰±۱/۰	*۱۴۵/۴۰±۳/۵
کنترل مثبت	۱۵/۸۰±۰/۸	۱۵/۰۰±۱/۲	۴/۴۰±۱/۱	۸/۲۰±۰/۸	۰/۶۰±۰/۵	۶/۸۰±۰/۸	۱۱۴/۴۰±۵/۷
کل	۱۵/۸۰±۳/۵	۱۳/۴۸±۳/۸	۴/۱۲±۲/۵	۸/۱۲۰±۱/۶	۱/۵۶±۱/۲	۶/۸۴±۱/۳	۱۲۰/۵۶±۱۶/۵

* در روز چهاردهم تعداد فیروبلاست‌ها در گروه درمانی ترکیب عسل و نعنا به حداکثر خود رسیده است.
* در روز چهاردهم تعداد ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها در گروه درمانی ترکیب عسل و نعنا به حداقل خود رسیده است.

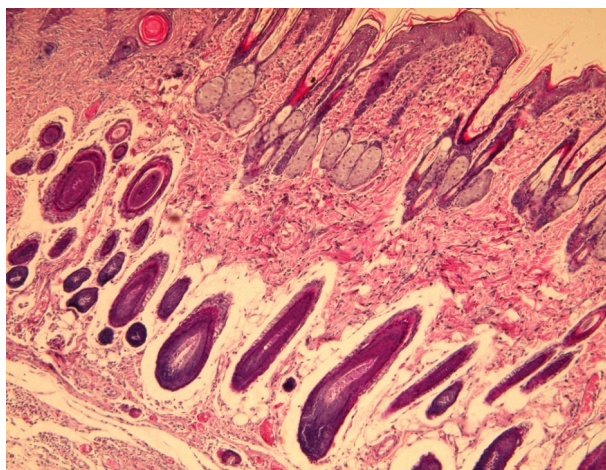
Between-Groups $P < 0.000001$

Within-Groups (time) $P < 0.000001$

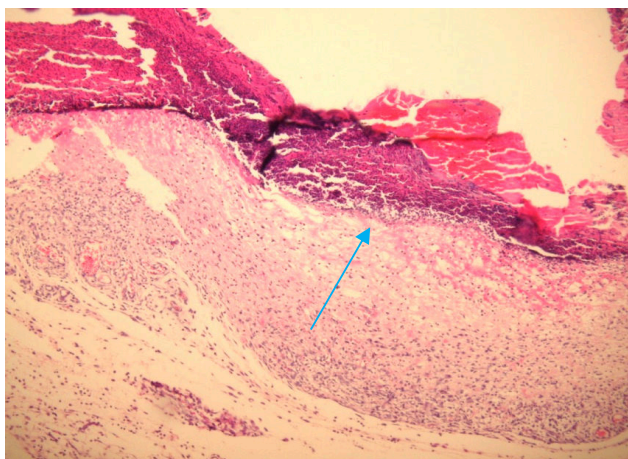
Time*Groups ANOVA $P < 0.000001$

* در روز چهاردهم موش‌های صحرائی تحت درمان با عسل و نعنا تعداد بیشتری فیروبلاست نسبت به گروه‌های دیگر ($P < 0.001$) در بستر زخم خود داشتند که باعث ترشح ماده زمینه‌ای و رشته‌های کلاژن بیشتر شده و سبب تسریع ترمیم زخم شده است. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. برای بررسی تفاوت‌های بین گروهی آنالیز یک‌طرفه واریانس (one-way ANOVA) انجام شد.

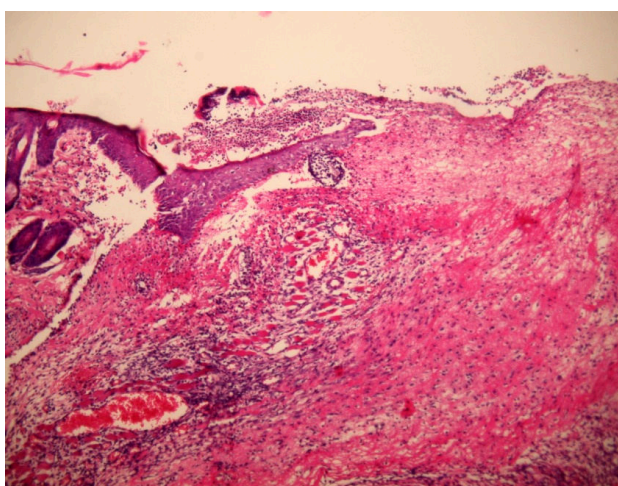




تصویر شماره ۱ - نمای میکروسکوپی طبقات پوست سالم رت، بدون آسیب و درمان (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی ۲۰×)

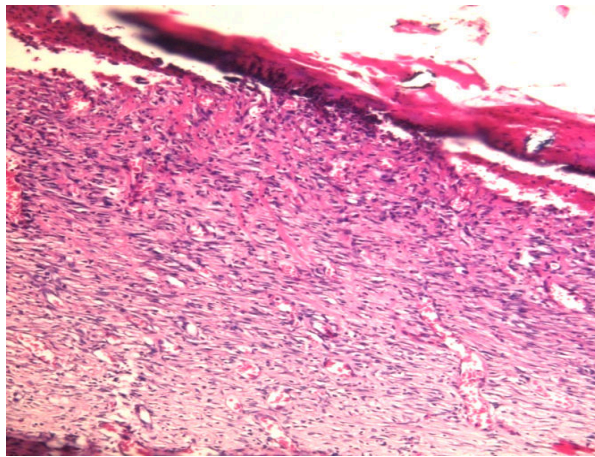


تصویر شماره ۲ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت در روز چهارم که فاز التهاب است، در گروه کنترل، التهاب و سلول‌های التهابی فراوان در بستر زخم در مقایسه با گروه درمانی ترکیبی. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی ۲۰×)

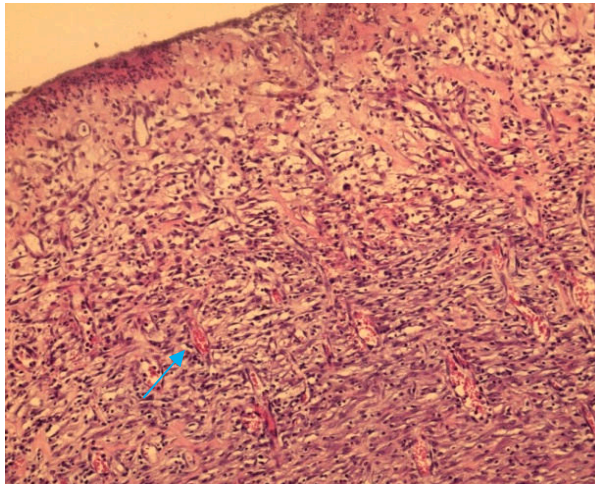


تصویر شماره ۳ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت در روز چهارم، در گروه درمانی ترکیبی، سلول‌های التهابی در بستر زخم در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی ۲۰×)

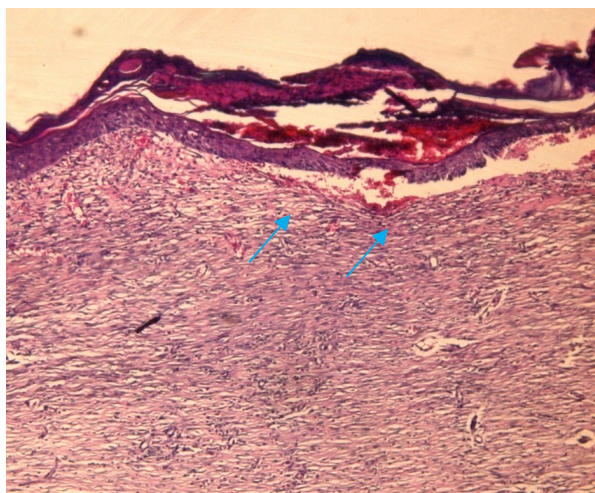




تصویر شماره ۴ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت در روز هفتم که فاز تکثیر است، در گروه کنترل، سلول‌های التهابی فراوان در سطح پوست دیده می‌شود و جوانه عروقی در حال شکل‌گیری است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین، بزرگنمایی ۲۰×)

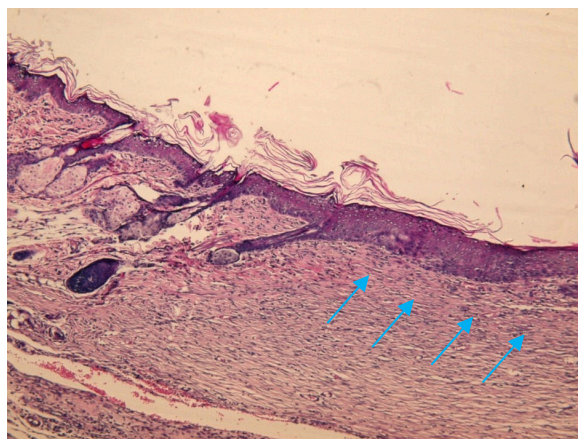


تصویر شماره ۵ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت در روز هفتم، گروه تجربی ترکیبی، در مقایسه با گروه کنترل التهاب از بین رفته است، جوانه‌های عروقی و فیبروبلاست‌های فراوان در بستر زخم قابل مشاهده است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین، بزرگنمایی ۲۰×)

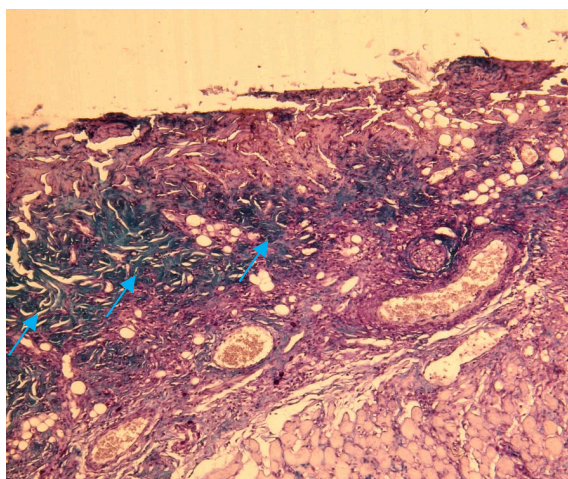


تصویر شماره ۶ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت و پوست سالم اطراف در روز چهاردهم که فاز بلوغ است در گروه کنترل، زخم به طور کامل بسته نشده است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین، بزرگنمایی ۲۰×)

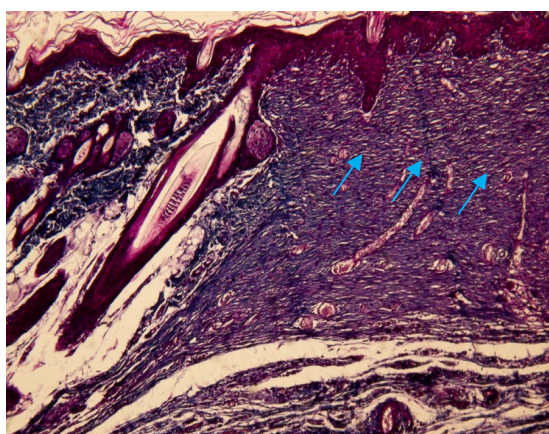




تصویر شماره ۷ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت گروه درمانی ترکیبی در روز چهاردهم، تعداد فیبروبلاست‌ها نسبت به گروه کنترل بیشتر، اپی‌تلیزاسیون صورت گرفته و سطح زخم کامل بسته شده است. (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی $\times 10$)



تصویر شماره ۸ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت و پوست سالم در روز چهاردهم در گروه کنترل، زخم به طور کامل بسته نشده است و میزان رشته‌های کلاژن تولید شده نسبت به گروه درمانی کمتر است. (رنگ‌آمیزی تری کروم - ماسون، بزرگنمایی $\times 10$)



تصویر شماره ۹ - نمای میکروسکوپی بستر زخم باز پوستی رت و پوست سالم در روز چهاردهم، گروه درمانی ترکیبی، اپی‌تلیزاسیون صورت گرفته و زخم به طور کامل بسته شده است و میزان رشته‌های کلاژن تولید شده فراوان است. (رنگ‌آمیزی تری کروم - ماسون، بزرگنمایی $\times 10$)



بحث

التیام زخم‌ها فرآیند پیچیده و منظمی است که به دنبال ضایعه پوست ایجاد می‌شود. ترمیم زخم به سه فاز التهاب، تکثیر و تجدید ساختار (بازسازی) تقسیم می‌شود. بنابراین بهبود مراحل می‌تواند منجر به تسریع ترمیم زخم و کاهش عوارض ناشی از آن بشود. نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف موضعی اسانس *Mentha pulegium* و عسل در ترمیم‌پذیری بستر زخم باز پوستی رت دارای اثر سینرژیک می‌باشد.

بهبود زخم فرآیندی است که پس از آسیب پوست شروع می‌شود. در ابتدا توسط پلاکت‌ها به میزان زیادی ترکیباتی ترشح می‌شوند. که نوتروفیل، ماکروفاژها و سلول‌های دیگری را در بستر زخم افزایش می‌دهند و سبب آغاز ترمیم زخم می‌شوند. در هنگام بروز آسیب پوستی، مولکول‌های $TGF-\beta 1$ با منشأ پلاکتی در محل زخم ظاهر و موجب پیشبرد روند ترمیم زخم می‌شوند [۱۰]. در فاز التهاب طی ۲۴ ساعت اول پس از آسیب فاز التهاب آغاز می‌شود، ابتدا نوتروفیل‌ها به حداکثر رسیده و پس از چند روز کاهش می‌یابند. تعدیل التهاب و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها ترمیم زخم را تسریع می‌کند. در مرحله بعد ماکروفاژها به حداکثر می‌رسند و اکثریت سلول‌های زخم را تشکیل می‌دهند. سنتز لاکتات و میانجی‌های آزاد شده از ماکروفاژها سبب تکثیر فیبروبلاست‌ها و تشکیل عروق جدید می‌شود (تصاویر شماره ۲ و ۳).

نتیجه تحقیق محققان نشان داد که اسانس نعنا تأثیر بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد [۳۵، ۳۶]. همچنین Mathur و همکاران نشان دادند که عصاره متانولی نعنا فلفلی فعالیت ضدقارچی بسیار خوبی در برابر سویه‌های قارچی کاندیدا آلبیکنس، ساکارومیسز سرویزیه و پنسیلیوم نوتاتوم دارد [۳۷].

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که استفاده موضعی از اسانس برگ گیاه نعنا، به علت خواص ضد میکروبی موجب کاهش طول دوره التهاب و شروع سریع‌تر مرحله دوم روند التیام زخم می‌شود. نتایج نشان دادند با کاهش معنی‌دار سلول‌های فاز التهابی، یعنی نوتروفیل‌ها و همچنین افزایش اصلی‌ترین سلول ایمنی فاز ترمیم یعنی ماکروفاژها فاز التهاب کوتاه‌تر شده است. در ادامه روند ترمیم در گروه درمانی

ترکیبی، افزایش معنی‌دار انژیوژنز و در نتیجه افزایش سرعت بهبودی در مرحله اول فرآیند ترمیم زخم در مقایسه با گروه کنترل شده است. ($P < 0/05$). اسانس نعنا از طریق کاهش التهاب و همچنین پیشگیری از ایجاد عفونت و رشد میکروارگانیسم‌ها روند ترمیم زخم را بهبود بخشیده است (جدول شماره ۱).

ارزیابی هیستوپاتولوژی در روزهای هفتم پس از ایجاد زخم نشان‌دهنده شروع مرحله دوم زخم، یعنی مرحله تریاید سلولی با افزایش مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست و همچنین شروع اپی‌تلیزاسیون می‌باشد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که استفاده موضعی از اسانس گیاه نعنا و عسل، موجب افزایش معنی‌دار مهاجرت فیبروبلاست‌ها به محل زخم و نوزایش بافت پوششی و در نتیجه افزایش سرعت بهبودی در مرحله دوم فرآیند ترمیم در مقایسه با گروه کنترل شده است (تصاویر شماره ۴ و ۵) (نمودار شماره ۲).

تعداد فیبروبلاست‌ها در اثر مصرف اسانس گیاه نعنا و عسل بر روی زخم سبب شده تعداد آنها نسبت به گروه کنترل افزایش یابد و این افزایش باعث ایجاد بافت جوانه‌ای با سرعت بیشتری شده است. (جدول شماره ۱) و (تصویر شماره ۵) از فیبروبلاست‌های تازه تکثیر شده، کلاژن و پروتئوگلیکان بافت همبند ترشح می‌شود، که لبه‌های زخم را به هم نزدیک می‌کند و علاوه بر این میزان التهاب در ناحیه زخم کاهش یافته است ترکیبات موجود در اسانس گیاه نعنا موجب ترانسفورماسیون سریع فیبروبلاست‌ها می‌شوند [۳۸]. مصرف اسانس گیاه نعنا فلفلی و عسل موجب افزایش سنتز کلاژن می‌شود (تصویر شماره ۹ رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون) و در پی آن ترمیم با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد. در صورتی که در گروه کنترل میزان ساخته شدن رشته‌های کلاژن کمتر است (تصویر شماره ۸ رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون).

نتایج تحقیقات زیادی نشان می‌دهند که عسل خاصیت ضدباکتریایی دارد و محیطی فراهم می‌کند که مانع رشد باکتری می‌شود گلوکز موجود در عسل برای سیکل کربس پراکسید هیدروژن تولید می‌کند و این ماده عامل اصلی فعالیت ضد



استفاده از ترکیب آنها در بهبود سرعت ترمیم زخم می‌باشد. تفاوت قابل توجه بین گروه ترکیبی با دیگر گروه‌ها حاکی از اثر سینرژیک آن می‌باشد (نمودار شماره ۲).

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر و سایر محققین، می‌توان چنین بیان کرد که کاربرد اسانس گیاه نعنا به همراه خواص عسل موجب افزایش فاکتورهای رشدی در بستر زخم شده و با تحریک آزاد سازی عوامل رشد و با تأمین محیطی مناسب در محل بستر زخم موجب فراهم‌سازی مقدمات ترمیم زخم شده است. اسانس نعنا به دلیل دارا بودن تیمول، منتول، ترکیبات فنول و فلاونوئید، و همچنین اکسیدکننده‌هایی مانند ترپن‌ها دارای خاصیت ضدباکتریایی بوده و همچنین به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات شیمیایی یاد شده، توانسته علاوه بر کنترل عفونت پوستی موجب افزایش آنژیوژنز، تکثیر فیبروبلاستی و اپی‌تلیزاسیون شده و باعث افزایش سرعت ترمیم زخم نیز شود (تصویر شماره ۷). در صورتی که در گروه کنترل میزان اپی‌تلیزاسیون کمتر بوده و زخم ترمیم نشده است (تصویر شماره ۶).

پس نتیجه می‌شود بر اساس معیارهای هیستولوژیک، استفاده از ترکیب عسل و نعنا باعث اثر سینرژیک برای بهبود زخم شده و سبب تسریع ترمیم زخم شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد IR.TUMS.MEDICINE.REC.1397.322 پایان‌نامه با عنوان «بررسی هیستوپاتولوژیکی اثر سینرژیک مصرف موضعی اسانس *Mentha* و عسل در ترمیم‌پذیری بستر زخم باز پوستی» می‌باشد. از حمایت معاونت پژوهشی و دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، سپاسگزاری می‌شود.

میکروبی ماکروفاژها است. عسل حاوی مقادیر مختلفی از مواد مغذی، انواع ویتامین‌ها، اسید آلی و اسید چرب می‌باشد که اثر تغذیه‌ای روی بافت در حال بازسازی دارد و سبب تکثیر فیبروبلاست‌ها می‌شود، تشکیل بافت گرانوله، اپی‌تلیزاسیون و رگ‌زایی را تسریع می‌کند و سبب جریان آزادانه لنف و افزایش جریان خون در زخم می‌شود. pH اسیدی عسل به فعالیت ضد میکروبی کمک می‌کند، علاوه بر این ویسکوزیته بالای عسل یک سد فیزیکی ایجاد می‌کند که مانع کلونیزاسیون باکتری‌ها می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نتایج Sugunal L و همکاران را تأیید کرد (جدول شماره ۱). عسل دارای خواص ضدباکتریایی و حاوی آنزیم‌هایی مانند کاتالاز است که به خواص درمانی کمک می‌کند. عسل همچنین، به سرعت دبری های زخم‌ها را از بین برده و بوی بد زخم را از بین می‌برد و فعالیت ضدالتهابی آن، ادم و اگزودا را کاهش می‌دهد و باعث ممانعت یا کاهش اسکارهای هیپرتروفیک می‌شود. عسل اثر قابل توجهی بر روند re-vascularization زخم دارد و سرعت ترمیم زخم را بیشتر می‌کند [۲۳، ۲۷].

بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه، در هر سه روز چهارم و هفتم و چهاردهم، تفاوت معناداری بین میانگین تعداد سلول های فیبروبلاست، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها در هر ۵ گروه وجود داشت ($P < 0/001$). از فیبروبلاست‌های تازه تکثیر شده، کلاژن و پروتئوگلیکان بافت همبند ترشح می‌شود که لبه های زخم را به هم نزدیک می‌کند و افزون بر این میزان التهاب در ناحیه زخم کاهش یافته است (تصویر شماره ۵). ترکیبات موجود در ترکیب درمانی موجب ترانسفورماسیون سریع فیبروبلاست‌ها می‌شوند. پس به طور کلی زخم‌های تحت درمان با عسل، نعنا یا ترکیب این دو در هر سه روز چهارم و هفتم و چهاردهم مطالعه، تعداد بیشتری فیبروبلاست، ماکروفاژ و تعداد کمتری نوتروفیل نسبت به گروه کنترل و کنترل مثبت ($P < 0/001$) در بستر زخم خود داشتند (جدول شماره ۱) که این نتیجه حاکی از اثر بخش بودن عسل و نعنا به تنهایی یا با



1. Clement D, Marshall Michael SHu, Tripp Leavitt Leandra A, Barnes H and Peter Lorenz Michael T. Longaker. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2018 Feb 1; 7 (2): 29 – 45. Published online 2018 Feb 1. doi:10.1089/wound.2016.0696
2. George Han and Roger Ceiley. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv. Ther.* 2017; 34 (3): 599 – 610. Published online 2017 Jan 21. doi: 10.1007/s12325 -017-0478-y
3. Mariam Mir, Murtaza Najabat Ali, Afifa Barakullah, Ayesha Gulzar, Munam Arshad, Shizza Fatima and Maliha A. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Prog. Biomater.* 2018 Mar; 7: 1 – 21. Published online 2018 Feb 14. doi: 10.1007/s40204-018-0083-4.
4. Shah A and Saeid Amini-Nik S. The Role of Phytochemicals in the Inflammatory Phase of Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 May; 18 (5): 1068. Published online 2017 May 16. doi: 10.3390/ijms18051068
5. Linsey E. Lindley, Olivera Stojadinovic, Irena Pastar, Marjana Tomic-Canic Biology and Biomarkers for Wound Healing *Plast Reconstr Surg.* Author manuscript; available in PMC 2017 Sep 1. Published in final edited form as: *Plast. Reconstr. Surg.* 2016 Sep; 138 (3): 18S28S. doi: 10.1097/PRS.0000000000002682
6. Chaudhary G, Goyal S and Poonia P. *Lawsonia inermis* Linnaeus: A phytopharmacological review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Res.* 2010; 2 (2): 91 - 8.
7. Erich Bünemann, Norman-Philipp Hoff, Bettina Alexandra Buhren, Ulrike Wiesner, Stephan Meller, Edwin Bölke, Anja Müller-Homey, Robert Kubitzka, Thomas Ruzicka, Albert Zlotnik, Bernhard Homey, Peter Arne Gerber. Chemokine ligand–receptor interactions critically regulate cutaneous wound healing. *Eur. J. Med. Res.* 2018; 23: 4. Published online 2018 Jan 16. doi: 10.1186/s40001 – 017 – 0299 - 0
8. Y. An, W. J. Liu, P. Xue, Y. Ma, L. Q. Zhang, B. Zhu, M. Qi, L. Y. Li, Y. J. Zhang, Q. T. Wang and Y. Jin. Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion. *Cell Death Dis.* 2018 Feb; 9 (2): 58. Published online 2018 Jan 19. doi: 10.1038/s41419-017-0082-8
9. Takzare N, Hosseini Mj, Hasanzadeh G, Mortazavi H, Takzare A and Habibi P. Influence of aloe vera gel on dermal wound healing process in rat. *Toxicol. Mech. Methods.* 2009; 19 (1): 73 – 7. doi: 10.1080/15376510802442444.
10. Paulina Krzyszczyk, Rene Schloss, Andre Palmer and François Berthiaume. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol.* 2018; 9: 419. Published online. 2018; May 1. doi: 10.3389/fphys.2018.00419
11. Evelina Vågesjö, Emelie Öhnstedt, Anneleen Mortier, Hava Lofton, Fredrik Huss, Paul Proost, Stefan Roos and Mia Phillipson. Accelerated wound healing in mice by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2018; Feb 20; 115 (8): 1895 – 900. Published online 2018 Feb 5. doi: 10.1073/pnas.1716580115
12. Anisyah Ridiandries, Christina Bursill and Joanne Tan. Broad-Spectrum Inhibition of the CC-Chemokine Class Improves Wound Healing and Wound Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; Jan; 18 (1): 155. Published online 2017 Jan 13. doi: 10.3390/ijms18010155
13. Numata Y, Terui T, Okuyama R, Hirasawa N, Sugiura Y, Miyoshi I and et al. The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing



process through the action of basic fibroblast growth factor. *JID*. 2006; 126 (6): 1403 - 9.

14. Bradley PR, ed. British Herbal Compendium, Vol. 1. British Herbal Medicine Association, Bournemouth, Dorset, ed. 1992, pp: 174 - 6.

15. Chalchat jC, Garry Rp and Michet A. Variation of the chemical composition of Essential oil of *Mentha piperita* L. during the Growing time. *J. Essnt. Oil Res*. 1997; 9: 463 - 5.

16. Hills JM and Aaronson PI. The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. An analysis using patch clamp electrophysiology and isolated tissue pharmacology in rabbit and guinea pig. *Gastroenterol*. 1991; 101: 55 - 65.

17. Irem U, Benedikt S, Andrea B, Wolfgang H. Goldmann G, Aldo R. Physical and Antibacterial Properties of Peppermint Essential Oil Loaded Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) Electrospun Fiber Mats for Wound Healing, *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 346-49.

18. Gobel H, Schmidt G and Soyka D. Effect of peppermint and eucalyptus oil preparations on neurophysiological and experimental algesimetric headache parameters. *Cephalalgia* 1994; 14: 228 - 34.

19. Holtmann G, Haag S, Adam B, Funk P, Wieland V and Heydenreich CJ. Effects of a fixed combination of peppermint oil and caraway oil on symptoms and quality of life in patients suffering from functional dyspepsia. *Phytomedicine* 2003; 10 (suppl 4): 56 - 7.

20. Asao T, Kuwano H, Ide M, Hirayama I, Nakamura JI, Fujita KI and et al. Spasmolytic effect of peppermint oil in barium during double-contrast barium enema compared with Buscopan. *Clin. Radiol*. 2003; 58: 301 - 5.

21. Galeotti N and et al. Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters* 2002; 322 (3): 145 - 8.

22. Umasankar K, Balwin N and Manley BD. Wound healing activity of Topical *Mentha piperita* and *Cymbopogon citratus* essential oil on

streptozotocin induced rats. *AJPCR*. 2013; v 6 (3): 180 - 3.

23. Takzaree N, Hadjiakhondi A, Hassanzadeh G, Rouini MR and Manayi A. Synergistic Effect of Honey and Propolis on Cutaneous Wound Healing in Rats. *Acta Medica Iranica*. 2016; 54 (4): 233 - 9.

24. Yusof N, Ainul Hafiza AH, Zohdi MR, Bakar A. Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing. *Radiation Phys. and Chemis*. 2007, 76: 1767 - 70.

25. Subrah M, Sahapure AG, Nagane NS, Bhagwat VR and Ganu JV. Effect of Topical Application of Honey on Burn wound. *Annual of Burns and Fire Disasters*. 2001; 16: 18 - 25.

26. Iftikhar F, Arshad M, Rasheed F, Amraiz D, Anwar P and Gulfranz M. Effects of acacia honey on wound healing in various rat models. *Phytotherapy Res*. 2010; Apr 1; 24 (4): 583 - 6.

27. Takzaree N, Hassanzadeh G, Rouini MR, Manayi A, Hadjiakhondi A and Zolbin MM. Evaluation of the Effects of Local Application of Thyme Honey in Open Cutaneous Wound Healing. *Iranian J. Public Health* 2017; Apr; 46 (4): 545.

28. Sazegar G, Reza AH and Behravan E. The effects of supplemental zinc and honey on wound healing in rats. *Iranian J. Basic Medical Sci*. 2011; Jul; 14 (4): 391.

29. Benjamin A. Minden-Birkenmaier and Gary L. Bowlin, Honey-Based Templates in Wound Healing and Tissue Engineering, *Bioengineering (Basel)*. 2018 Jun; 5(2): 46.

30. Takeshi N, Mizuho S, Hachiro I and Nabutaka S. Antioxidative activities of some commercially honeys royal jelly, and propolis. *Food Chem*. 2001; 75: 237 - 40.

31. Leung AY and Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetic New York: John Wiley and sons. 2009, 3th ed: 399 - 405.

32. Bergman A, Yanal J Weiss, Bell D and David MP. Acceleration of wound healing by topical



- apptlication of honey, an animal model. *Am. J. Surg.* 1983; 145: 374 – 6.
33. Green CJ, Knight J, Precious S and Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Lab Anim.* 1981; 15 (2): 163 - 70.
34. Takzaree N, Hadjiakhondi A, Hassanzadeh GH, Rouini MH, Manayi A and Majidi Zolbin M. Transforming growth factor- α (TGF- α) activation in cutaneous wounds after topical application of aloe vera gel. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 10: 1 – 6 (0000) dx.doi.org/10.1139/cjpp - 2015 – 0460.
35. Iscan G, Kirimer N, Kurkcoglu M, Husnu Canbaser K and Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agricultural Food Chemistry* 2002; 50: 3943 - 6.
36. Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M, Papanikolaou E and Nikolaou C. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oil concentration. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1202 - 05.
37. Mathur A, Purohit R, Mathur D, Prasad G and Dua V. Pharmacological methanol extract of *Mentha piperita* L. roots on the basis of antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties. *Der. Pharmacia. Sinica.* 2011; 2 (1): 470 - 7.
38. Modarresi M, Farahpour MR and Baradaran B. Topical application of *Mentha piperita* essential oil accelerates wound healing in infected mice model. *Inflammopharmacol.* 2018; Jul 6. doi: 10.1007/s10787-018-0510-0. [Epub ahead of print]
39. Sugunal L, Chandrakasan G and Thomas K. Influence of honey on collagen metabolism during wound healing in rats. *J. Cline. Biochem. Nutr.* 1992; 13: 7 – 12.
40. Sujana P, Sridhar TM, Josthna P and Naidu CV. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint) — An important multipurpose medicinal plant. *AJPS.* 2013; Jan 30; 4 (01): 77 – 82.

