

ارزیابی اثر پلاسمای سرد آرگون و ژل پلاکتی بر فاکتورهای بیوشیمیایی در روند ترمیم زخم موش های صحرائی

• پریسا روشن مرام کنذری

گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

• مهدی مرجانی

گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

• علیرضا جهاننیده (نویسنده مسئول)

گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

• میثم تهرانی شریف

گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۷-۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۸-۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۰۸-۱۹ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۰۴-۰۱

Email: dr.jahandideh@gmail.com



چکیده

بهبود زخم یک فرآیند پیچیده است که در آن مجموعه ای از وقایع به صورت هماهنگ انجام می شود که در نهایت منجر به بازسازی بافت می گردد. از روش های نوین درمان در پزشکی و دامپزشکی، استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) و پزشکی پلاسما می باشد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی مقایسه ای اثر پلاسمای سرد آرگون و ژل پلاکتی بر مقادیر هگزوزآمین، کلاژن و پروتئین تام موجود در بافت، در روند ترمیم زخم موش های صحرائی انجام گرفت و بدین جهت از ۴۸ سر موش صحرائی نژاد ویستار استفاده شد. موش ها پس از گذراندن دوره سازگاری، در یک گروه کنترل و چهار گروه تیمار طبقه بندی شدند. تیمارها شامل: تیمار پماد نیتروفورازون، تیمار ژل پلاسمایی غنی از پلاکت، تیمار پلاسما سرد آرگون و تیمار ژل پلاکتی به همراه پلاسما سرد آرگون بودند و در گروه کنترل هیچ گونه تیماری انجام نشد. بعد از تیمار بندی و ایجاد زخم پوستی تمام ضخامت بین دو کتف موش ها، در روزهای سه، هفت، ۱۴ و ۲۱، از محل زخم ها نمونه برداری شد و فاکتورهای کلاژن (هیدروکسی پرولین)، هگزوزآمین و پروتئین تام، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اندازه گیری این سه فاکتور، اختلاف معناداری را بین گروه کنترل با گروه پلاسما و پلاسما+PRP نشان داد ($P < 0.05$). این در حالی است که بین گروه کنترل و گروه پماد نیتروفورازون، اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$). در نتیجه به نظر می رسد استفاده از پلاسما و پلاسما+PRP به طور معناداری نسبت به گروه کنترل، سبب تسریع در روند ترمیم زخم می شوند.

کلمات کلیدی: کلاژن، هگزوزآمین، پروتئین بافتی، ترمیم زخم

● Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 112-121

Evaluation of the Effect of Cold Argon Plasma and Platelet Gel on Biochemical Factors in the Wound Healing Process of Rats

By: Roshanmaramkondori, P., Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Marjani, M., Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Jahandideh, A., (Corresponding Author) Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Tehrani Sharif, M., Department of Clinical Pathology, College of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.

Received: 2022-10-03 Accepted: 2022-11-13

Revised: 2022-11-10 Published: 2023-07-22

Email: dr.jahandideh@gmail.com

Wound healing is a complex process in which a series of events takes place in a coordinated manner, which ultimately leads to tissue regeneration. One of the new treatment methods in medicine and veterinary medicine is the use of platelet-rich plasma (PRP) and plasma medicine. The present study was conducted in order to compare the effect of cold argon plasma and platelet gel on the amounts of hexosamine, collagen and total protein in the tissue, in the wound healing process of rats; accordingly, 48 Wistar rats were used. After the adaptation period, the mice were classified into one control group and four treatment groups. The treatments included: nitrofurazone ointment treatment, platelet-rich plasma gel treatment, cold argon plasma treatment, and platelet gel treatment with cold argon plasma, and no treatment was performed in the control group. After the treatment and creation of skin wound, samples from the wounds were taken from the entire thickness between the shoulders of the rats, on days three, seven, 14 and 21 and collagen factors (hydroxyproline), hexosamine and total protein were measured. The results of measuring these three factors showed a significant difference between the control group and the plasma and plasma + PRP group ($P < 0.05$). Meanwhile, no significant difference was observed between the control group and the nitrofurazone ointment group ($P > 0.05$). As a result, it seems that the use of plasma and plasma + PRP accelerates the wound healing process significantly compared to the control group.

Key words: collagen, hexosamine, tissue protein, wound healing

عوامل مختلفی از قبیل عفونت‌های باکتریایی، حساسیت ناحیه زخم و کافی نبودن رگ‌زایی در ناحیه‌ی آسیب دیده، به خوبی انجام نمی‌گیرد و باعث آسیب بافتی گسترده می‌شود. (۱۴، ۱۵)

ترمیم زخم یک فرآیند چند مرحله‌ای است که شامل هموستاز یا فرآیند لخته شدن، التهاب، سنتز کلاژن و ماکرومولکول‌های دیگر، مراحل تکثیر، بازسازی و بلوغ است که شامل ارتباطات ایمنولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌باشد. (۲۴)

این فرآیند با الگویی از وقایع تنظیم می‌گردد که در آن تعداد زیادی از سلول‌های ساکن و نفوذی شامل کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و مست سل‌ها درگیر هستند. گلیکوزآمینوگلیکان‌ها اجزای مهم ماتریس خارج سلولی موجود در سطوح سلولی هستند و اولین مولفه ماتریس خارج سلولی هستند که در طول فرآیند ترمیم زخم سنتز می‌شوند. (۲۱)

زخم‌ها با فرآیند تعمیر بافت همبند و تشکیل یک اسکار فیبری بهبود

مقدمه

پوست به عنوان بزرگترین ارگان بدن، تاثیر قابل توجهی را بر فعالیت‌های متنوع و عملکردهای موجود زنده دارد که از جمله وظایف آن، حفاظت بدن در برابر پاتوژن‌ها، آسیب‌های ناشی از محیط خارجی و تنظیم درجه حرارت بدن می‌باشد. پوست به دلیل ماهیت الاستیک و نرم آن، بسیار حساس بوده و ممکن است که در مواجهه با درگیری‌های مختلف دچار آسیب گردد که به آنها زخم گفته می‌شود. (۲۵)

آسیب‌های پوستی و به ویژه زخم‌های مزمن، یکی از مهم‌ترین مشکلات پزشکی در سراسر جهان است. بنابراین، درمان پزشکی در فرایند بهبود زخم ضروری است. بهبود زخم یک فرآیند فیزیولوژیک پویا و مهم است که پس از آسیب‌های مختلف، توسط شبکه‌ی پیچیده‌ای از عوامل رشد، سلول‌ها، اجزای ماتریس خارج سلولی و پروتئین‌ها یکپارچگی پوست را حفظ می‌کند و سعی بر این دارد که با ایجاد حداقل اسکار بازسازی پوست را انجام دهد. با این حال، در اغلب موارد، فرایند بهبودی توسط

زمینه‌های مختلف پزشکی و دامپزشکی شده است. با توجه به اهمیت تسریع ترمیم زخم در پزشکی و دامپزشکی، مطالعه‌ی حاضر، به منظور بررسی اثر پلاسما سرد آرگون و پلاسما غنی از پلاکت بر روی مقادیر بافتی هگزوزآمین، کلاژن و پروتئین در روند ترمیم زخم موش‌های صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی موش‌ها

جهت انجام این پژوهش تجربی در شرایط درون تنی، ۴۸ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهران تهیه شده و به مدت یک هفته به جهت آدپتاسیون در محل جدید نگهداری خواهند شد. موش‌ها قبل از انتقال به محل جدید به مدت شش ساعت قبل از حرکت قطع غذا شده و تا شش ساعت بعد از آن نیز ناشتا خواهند بود. شرایط نگهداری جدید شامل درجه حرارت ثابت ۲۳٫۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شده و در کل مدت (۲۱ روز) آزمایش، آب به صورت آزادانه و غذا به صورت سه وعده در روز به میزان پنج درصد وزن کلی بدن در اختیارشان قرار خواهد گرفت (۱).

تیمار بندی

در این پژوهش ۴۸ سر موش صحرایی سالم بدون عارضه پوستی در چهار گروه ۱۲ تایی قرار خواهند گرفت. تیمارها به ترتیب زیر هستند:

الف: تیمار روزانه با پماد نیتروفورازون دو دهم درصد شرکت بهوزان به مدت ۲۱ روز و هر روز.

ب: تیمار ژل پلاسما غنی از پلاکت که روز صفر، سه، هفت و ۱۴ این ژل تعویض می‌شود (هر دو روز در میان تعویض ژل پلاکتی انجام می‌گیرد)

ج: تیمار پلاسما سرد آرگون که در روز صفر، سه، هفت و ۱۴ به مدت ۳۰ ثانیه تحت تابش قرار خواهد گرفت.

د: تیمار ژل پلاکتی که در روز صفر، سه، هفت و ۱۴ ژل‌ها تعویض می‌شوند و هم زمان با آن بعد از برداشت ژل قدیمی و قبل از گذاشتن ژل جدید، به مدت ۳۰ ثانیه تحت تابش قرار خواهد گرفت.

القا بیهوشی و ایجاد زخم

به جهت القای بیهوشی از ترکیب زایلین هیدروکلراید ۲ درصد به صورت پنج میلی‌گرم در کیلوگرم و کتامین هیدروکلراید ده درصد با دوز پنج میلی‌گرم در کیلوگرم و به صورت داخل صفاقی تزریق انجام شد. بعد از القا بیهوشی موش‌ها به صورت ventral recumbancy خوابیده و موهای ناحیه پشت حیوان را با ماشین اصلاح تراشیده و پوست محل تراشیده شده و اطراف آن، با الکل و محلول ده درصد بتادین ضدعفونی شد. این عمل در محیط استریل و ضدعفونی شده انجام گرفته و به کمک پانچ بیوبسی زخمی یک و نیم در یک و نیم طوری ایجاد خواهد شد که تمام لایه‌های اپیدرم و درم به صورت کامل برداشته شود. در این حیوانات پوست به آسانی از فاسیا جدا می‌گردد و زخم مورد نظر ایجاد می‌شود. بعد از ایجاد زخم، محل زخم توسط نرمال سالین شستشو داده و هر گونه چربی اضافی و باقی‌مانده تارهای بافت پیوندی از زخم برداشته شد. عمق

می‌یابند. این فرآیند شامل سنتز و تشکیل بافت همبند متراکم است که عمدتاً از کلاژن تشکیل شده است. عوامل مختلف از جمله چند اسیدآمین، فرآیند ترمیم را تسریع می‌کنند. (۷)

پزشکی پلاسما به صورت رابطی میان علم فیزیک و علوم زیستی، به عنوان یک شیوه نوین درمانی ظهور پیدا کرده و منجر به ایجاد رشته جدید و مستقلی در پزشکی شده است. پلاسما فیزیکی را می‌توان با افزودن انرژی (حرارت یا میدان‌های الکترومغناطیس) به گاز خنثی، تا زمانی که ماده گازی یونیزه شده به طور فزاینده‌ای رسانای الکتریکی شود، تولید کرد. در واقع پلاسما علاوه بر جامد، مایع و گاز، حالت چهارم ماده را تشکیل می‌دهد و تشعشعات الکترومغناطیسی، عمدتاً اشعه ماوراء بنفش و نور مرئی ساطع می‌کنند و از مخلوطی از عوامل مختلف بیولوژیکی بسیار فعال از جمله اکسیژن و نیتروژن واکنش‌پذیر رادیکال و غیر رادیکال، الکترون‌ها و یون‌ها تشکیل شده است. (۶)

در سال‌های اخیر، تلاش زیادی برای توسعه منابع پلاسما با دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد یعنی پلاسما اتمسفری سرد انجام شده است که می‌تواند مستقیماً روی بافت‌های بیولوژیکی اعمال شود. پلاسما اتمسفری سرد تأثیر مثبتی بر روند بهبود زخم‌های مزمن و حاد دارد و حتی در آینده، پلاسما می‌تواند با حذف نیاز به درمان‌های مرسوم طولانی، هزینه‌های درمان را کاهش دهد. بنابراین ترکیبی از عوامل فعال مختلف و طیف گسترده‌ای از اثرات مثبت آنها بر بیماری‌های مختلف، به ویژه بیماری‌های پوستی، پلاسما را برای کاربرد در پزشکی حائز اهمیت کرده است. (۲۰،۹)

پلاسما اتمسفری سرد با گازهای مختلف از جمله آرگون و هلیوم تولید می‌شود. (۱۳) لازم به ذکر است که اثرات مفید پلاسما اتمسفری سرد آرگون (CAAP) بر بهبود زخم و ظرفیت آن برای ضدعفونی باکتریایی اخیراً مستند شده است. (۲۲)

از دیگر روش‌های نوین درمان در علم پزشکی و دامپزشکی، استفاده از پلاسما غنی از پلاکت، Platelet-Rich Plasma (PRP) Injection، می‌باشد. پلاسما غنی از پلاکت (PRP) یک فرآورده خونی اتولوگ است که پس از سانتریفیوژ خون به دست می‌آید. PRP غنی از فاکتورهای رشد است که باعث بهبودی بافت، تغییر رنگ‌زایی و دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، در غیاب نسبی هر گونه عوارض جانبی می‌شود. در سال‌های اخیر تأثیر مثبت پلاسما غنی از پلاکت (PRP) برای بهبود انواع مختلفی از کاربردهای پزشکی بشری از جمله زخم‌های پوستی (زخم بستر و زخم‌های دیابتی)، جراحی‌های پلاستیک و زیبایی، جراحی فک و صورت، ترمیم غضروف و تاندون، جراحی ارتوپدی و بازسازی استخوان (مانند جوش خوردن تاخیری یا عدم جوش خوردن، درمان استئولیز در اطراف مفاصل و چشم پزشکی (زخم قرنیه)، استفاده شده است. علی‌رغم کارآمد بودن این روش درمانی، کاربرد آن در دامپزشکی محدود می‌باشد. (۱۲،۲)

پلاسما درمانی و استفاده از پلاسما غنی از پلاکت (PRP)، هر دو در حوزه طب پزشکی و دامپزشکی، به عنوان شاخه‌های علمی نوین مطرح می‌باشند. قابلیت بسیار بالای پلاسما در امر باکتری‌زدایی، استریل‌سازی بافت و وسایل پزشکی، تخریب باندهای شیمیایی، از بین بردن سلول‌های سرطانی، انعقاد خون، درمان‌تولوژی، دندانپزشکی، آنکولوژی و درمان عفونت پوستی و مزایای بسیار دیگر، منجر به بکارگیری این فناوری در

میلی لیتر ترومبین در درون یک پتری دیش ریخته شد و به آرامی مخلوط گردید تا لخته ایجاد شد و ژل پلاکتی تشکیل گردید. تمام مراحل تهیه ژل پلاکتی در زیر هود و در شرایط استریل انجام شد.

پلازما سرد آرگون

در این پژوهش با کمک مرکز فیزیک پلازما دانشگاه علوم و تحقیقات از پلاسمای آرگون در ولتاژ متناوب پنج کیلووات و فرکانس ۲۵ کیلوهرتز و در فاصله هفت سانتی متری از زخم استفاده شد.

به منظور برداشت نمونه بافتی، در هر یک از زیرگروه‌ها در روزهای سه، هفت، ۱۴ و ۲۱، یک موش به طور تصادفی با استفاده از کلروفورم کشته شد. جهت برداشت نمونه بافتی، ناحیه زخم به همراه دو میلی متر از نواحی پوست سالم مجاور، جدا گردید. سپس نمونه‌ها را وزن کردیم و درون فویل‌های آلومینیومی پیچیدیم. پس از آن، نمونه‌ها را داخل میکروتیوپ گذاشته و تا زمان انجام تست‌های بیوشیمیایی در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم.

بعد از تمام شدن نمونه‌گیری‌ها، نمونه‌ها را به سه قسمت مساوی تقسیم کرده و داخل پلیت گذاشتیم تا هر کدام را برای انجام آزمایش‌های اندازه‌گیری کلاژن (هیدروکسی پرولین)، هگزوزآمین و پروتئین آماده کنیم.

اندازه‌گیری هیدروکسی پرولین بافتی

هیدروکسی پرولین یک ترکیب اساسی کلاژن می‌باشد. (۱۸) محتوای کلاژن بافت گرانوله با تخمین محتوای هیدروکسی پرولین تعیین شد، همانطور که توسط (۲۳) شرح داده شده است. نمونه‌های مورد نظر را در لوله گذاشته، به وسیله نرمال سالین و NaOH (ساخت شرکت مرک) هموژنیزه کردیم و آنها را در داخل اتوکلاو قرار دادیم. این محلول باعث هیدرولیز شدن نمونه‌ها می‌گردد. سپس کلرآمین T (ساخت شرکت سیگما) را اضافه نموده و در دمای اتاق قرار دادیم. در ادامه، معرف اریلیش یا دی متیل آمینو بنزآلدئید (ساخت شرکت مرک) را اضافه کرده و آنرا در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دادیم. محلول به دست آمده را با دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت نموده و با استاندارد هیدروکسی پرولین مقایسه کردیم. (۱۶)

اندازه‌گیری هگزوزآمین بافتی

سطح هگزوزآمین با انباشته شدن کلاژن کاهش می‌یابد. بنابراین از این عامل برای استنباط افزایش غلظت کلاژن در بافت استفاده می‌شود. محتوای هگزوزآمین بافت گرانوله توسط واکنش السون مورگان که توسط Randle & Morgan (۱۹۵۵) (۱۷) ایجاد و توسط Levy (۱۹۵۹) & McAllan (۱۳) اصلاح شده، برآورد شد. نمونه‌ها را داخل لوله قرار دادیم و توسط سمپلر به میزان ۵۰ میکرولیتر نرمال سالین و ۵۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم (ساخت شرکت مرک) به آن اضافه نمودیم. سپس آن را به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو قرار دادیم. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول را جدا کرده و به داخل لوله‌ای دیگر انتقال دادیم و به هر کدام به میزان ۲۰ میکرولیتر تترابورات پتاسیم (ساخت شرکت سیگما) اضافه نمودیم. این محلول را به مدت سه

زخم‌های ایجاد شده به اندازه ضخامت پوست بوده؛ به طوری که اپیدرم، درم و چربی زیر پوستی را شامل می‌شد و ماهیچه قابل مشاهده بود. در تمام مدت ایجاد زخم و حتی مدتی بعد از آن حیوان بیهوش بود. بعد از به هوش آمدن کامل و تا پایان مطالعه، موش‌ها در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند و دو روز اول پس از ایجاد زخم، کف قفس با فوم یا تنظیم پوشیده می‌شد؛ تا زمانی که پوسته اولیه زخم تشکیل گردد. بعد از آن با پوشال جایگزین می‌گردید.

تهیه PRP

اکثر روش‌های قابل انجام جهت تهیه PRP دارای نقاط مشترکی هستند. خون با آنتی‌کوآگولانت (ضد انعقاد) گرفته می‌شود و بلافاصله تحت سانتریفیوژ قرار می‌گیرد. زمان آماده شدن کنسانتره پلاکتی متغیر است اما همیشه در طی یک ساعت کامل می‌گردد. مرحله اول سانتریفیوژ برای تفکیک خون به سه لایه طراحی شده است، گلبول‌های قرمز در لایه تحتانی، پلاسمای بدون سلول (PPP, Platelet Poor Plasma) لایه فوقانی و لایه Buffy coat بین دو لایه تحتانی و فوقانی مشاهده می‌شود که حاوی کنسانتره پلاکتی می‌باشد. مرحله بعدی سانتریفیوژ بین پروتکل‌های متعدد متفاوت است. سعی بر این است که لایه گلبول‌های قرمز و PRP جدا شده و فقط اطراف لایه Buffy coat جمع‌آوری گردد. سرانجام کنسانتره پلاکتی در محل آسیب استفاده می‌شود.

خون‌گیری

مقدار ۱۵ سی‌سی خون از یک مرد بالغ به وسیله لوله‌های وکیوم حاوی سدیم سیترات هشت درصد گرفته شد. این لوله‌ها مخصوص خون‌گیری جهت تهیه فرآورده‌های خونی می‌باشد.

نحوه سانتریفیوژ خون گرفته شده جهت تهیه PRP

به منظور انجام سانتریفیوژ، لوله‌های خون را دو نوبت و هر نوبت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی ۱۵۰۰ دور در دقیقه، در دستگاه سانتریفیوژ قرار می‌دهیم و هر بار دو سوم پلاسمای رویی را دور ریخته و یک سوم باقی مانده که قسمت نزدیک به RBC می‌باشد، جدا می‌کنیم.

تهیه ترومبین از پلاسمای انسان

۱۰ میلی لیتر نمونه خون سیترات از یک فرد اهداکننده خون تهیه شد. به منظور جداسازی پلازما، نمونه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی (پلاسمای شفاف) در لوله جداگانه جمع‌آوری شد. در نهایت، به ازای هر دو میلی لیتر پلازما، یک و نیم میلی لیتر کلسیم گلوکونات ۱۰٪ اضافه شد و منتظر ماندیم تا در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد لخته ایجاد شود و سپس با سانتریفیوژ کردن لخته از محلول رویی که حاوی ترومبین بود، جدا شد.

طرز تهیه ژل پلاکتی

به منظور تهیه ژل پلاکتی، محتویات کیسه پلاکتی به لوله فالكون منتقل شد. تعداد پلاکت‌های موجود در این PRP توسط دستگاه شمارش سلول‌های خونی شمارش شد. دو میلی لیتر PRP تغلیظ شده با نیم

نتایج حاصله اختلاف آماری معناداری بین گروه کنترل با گروه‌های پلاسما و پلاسما + PRP مشاهده شد. ($P < 0.05$) این در حالی است که بین گروه کنترل با گروه پماد نیتروفروزان و گروه PRP اختلاف معناداری مشاهده نشد. ($P > 0.05$)

بررسی مقادیر هگزوز آمین

میزان هگزوز آمین کلیه نمونه‌ها، در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای سه، هفت، ۱۴ و ۲۱ در جدول شماره سه و میانگین و انحراف معیار آنها در بین گروه‌های مختلف در جدول چهار و مقایسه‌ی میانگین آنها در بین گروه‌های مختلف در نمودار دو آورده شده است. بر این اساس میزان هگزوز آمین یک روند کاهشی را در هر گروه درمانی و کنترل با افزایش زمان نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصله، اختلاف آماری معناداری بین گروه کنترل با گروه‌های PRP، پلاسما و +PRP مشاهده می‌شود ($P < 0.05$) و این اختلاف معنادار بین گروه کنترل با گروه + PRP پلاسما، از همه بیشتر می‌باشد. همچنین در میان گروه کنترل با گروه پماد نیتروفروزان اختلاف معناداری مشاهده نشد. ($P > 0.05$)

بررسی مقادیر پروتئین بافتی

میزان پروتئین بافتی کلیه نمونه‌ها، در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای سه، هفت، ۱۴ و ۲۱ در جدول شماره پنج و میانگین و انحراف معیار آنها در بین گروه‌های مختلف در جدول شش و مقایسه‌ی میانگین آنها در بین گروه‌های مختلف در نمودار سه آورده شده است. بر این اساس میزان پروتئین بافتی روند افزایشی را تا روز هفت طی کرده و سپس کاهش یافته است. بر اساس نتایج حاصله اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه‌های پلاسما، PRP، و + PRP پلاسما مشاهده می‌شود. ($P < 0.05$) و این اختلاف بین گروه + PRP پلاسما و کنترل نسبت به سایرین بیشتر می‌باشد. همچنین در بین گروه کنترل با گروه پماد نیتروفروزان اختلاف معناداری مشاهده نشد. ($P > 0.05$)

بحث

حفظ و یکپارچگی پوست در انسان و حیوانات، برای محافظت در برابر از

دقیقه حرارت داده و در دمای محیط سرد نمودیم. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از محلول ارلیش اضافه کردیم و آنرا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار دادیم. در ادامه آنرا با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر و در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت نمودیم. استاندارد این تخمین را با استفاده از N- استیل گلوکز آمین (ساخت شرکت سیگما) بدست آوردیم. (۱۶)

اندازه‌گیری پروتئین بافتی

از روش لوری برای این اندازه‌گیری استفاده شد. بدین منظور، نمونه‌ها را به لوله‌های آزمایش منتقل کردیم و میزان پنج میکرولیتر از بافر همونیزه با DTT (ساخت شرکت مرک) و پروتئاز اینهیبیتور (ساخت شرکت سیگما) به آن اضافه کردیم. محلول را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه قرار دادیم. رسوب تشکیل شده را با معرف فولین (ساخت شرکت مرک) ترکیب کردیم که کمپلکس ایجاد شده رنگی زرد متمایل به آبی داشت. (۱۱) در ادامه، کربنات سدیم (ساخت شرکت مرک)، سولفات مس (ساخت شرکت مرک) و سدیم پتاسیم تارتارات (ساخت شرکت مرک) را اضافه کردیم و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار دادیم. به محلول به دست آمده معرف فولین (ساخت شرکت مرک) افزودیم و آن را به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار دادیم و در نهایت آن را با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر و در طول موج ۵۹۰ نانومتر قرائت نمودیم. استاندارد تخمین پروتئین را با سرم گاوی بدست آوردیم. (۱۶)

نتایج

بررسی مقادیر هیدروکسی پرولین (کلاژن)

میزان هیدروکسی پرولین بافت همبند کلیه نمونه‌ها در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای سه، هفت، ۱۴ و ۲۱ در جدول شماره یک و میانگین و انحراف معیار آنها در بین گروه‌های مختلف در جدول دو و مقایسه‌ی میانگین آنها در بین گروه‌های مختلف، در نمودار یک آورده شده است. بر این اساس میزان هیدروکسی پرولین بافتی (کلاژن) یک روند افزایشی را در هر گروه درمانی و کنترل با افزایش زمان نشان می‌دهد و نیز بر اساس

جدول ۱- مقادیر هیدروکسی پرولین بافت همبند در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای مورد مطالعه.

گروه	روز	سوم	هفتم	چهاردهم	بیست و یکم
کنترل		13.8±0.173	14.4±0.240	16.1±0.208	16.4±0.264
پماد نیتروفروزان		14.2±0.545	15.7±0.352	16.8±0.176	17.8±0.693
PRP		15.1±0.284	16.5±0.230	18.3±0.264	18.7±0.290
پلاسما		15.9±0.450	17.4±0.698	22.7±0.450	24.2±0.458
پلاسما + PRP		15.6±0.348	19.1±0.185	19.9±1.785	24.8±0.321

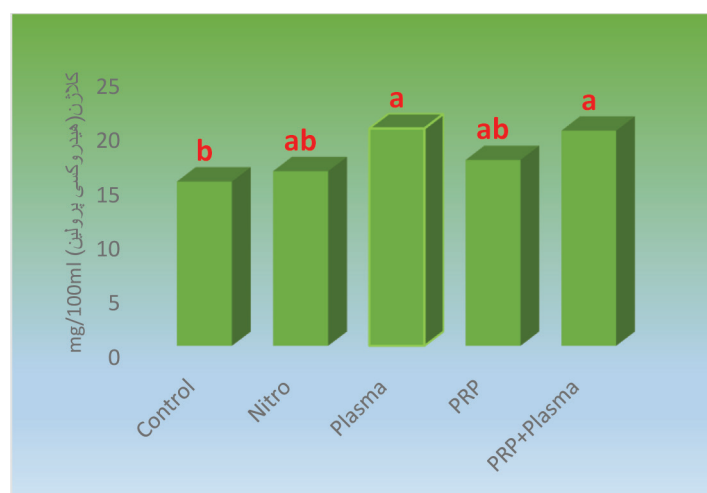
مشخص شد که استفاده از پلاسمای سرد آرگون و پلاسمای غنی از پلاکت، باعث افزایش سرعت بهبود زخم می‌شوند و اگر این دو عامل به صورت توأم با یکدیگر استفاده گردند اثر سینرژیکی داشته و نتیجه‌ی بهتری حاصل خواهد شد و نسبت به گروه کنترل و گروهی که پماد نیتروفروزان را دریافت کرده بود، اختلاف معنادار خواهد بود.

در مطالعه‌ای که توسط امینی و همکاران در سال ۲۰۲۰ به منظور مقایسه اثرات داروی اکسید روی، مادون قرمز، اشعه ماورا بنفش و پلاسمای سرد بر زخم‌های عفونی با ضخامت کامل در موش‌های صحرایی دیابتی انجام گرفت، مشخص شد که درمان با پلاسما باعث افزایش نئوسکولاریزاسیون و تولید کلاژن در لایه‌ی درم شد و درمان مادون قرمز و فرابنفش، تشکیل اپیتلیال، نئوسکولار، فیروپلاست و تشکیل کلاژن را بهبود بخشید اما اثر این درمان کمتر از درمان با پلاسما بود. نتایج حاصل از این پژوهش با پژوهش حاضر همسو می‌باشد چرا که در مطالعه‌ی ما نیز استفاده از پلاسما و ترکیب پلاسما + PRP باعث افزایش بیشتر و معناداری در مقادیر کلاژن شد. (۳)

دست دادن آب، خونریزی و مقابله با ورود میکروارگانیسم‌ها، امری حیاتی است. به این منظور، بهبود و ترمیم زخم در انسان و حیوانات تکامل یافته از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. فرآیند ترمیم زخم از جمله روندهای پیچیده و حساس فیزیولوژیکی بوده که در طی آن مجموعه‌ای از سلول‌ها و ترشحات آنان به ویژه فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها وارد عمل می‌شوند تا بتوانند بافت آسیب دیده را ترمیم کنند (۱۰). امروزه از داروها و پمادهای متعددی برای ترمیم زخم‌ها استفاده می‌شود. تلاش بر این است که در کنار روش‌های معمول ترمیم زخم، از روش‌هایی استفاده گردد که روند بهبود و ترمیم زخم را تسریع بخشد و عفونت‌های باکتریایی متعاقب زخم را به حداقل برساند. پلاسما درمانی و استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)، به عنوان شاخه‌های علمی نوین در پزشکی و دامپزشکی مطرح می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر، که به منظور مقایسه روش نوین استفاده از پلاسمای سرد آرگون و پلاسمای غنی از پلاکت بر روی مقادیر بافتی هگزوزآمین، کلاژن و پروتئین در روند ترمیم زخم موش‌های صحرایی، نسبت به سایر روش‌های درمانی انجام گرفت،

جدول ۲- مقادیر میانگین و انحراف معیار هیدروکسی پرولین در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای مورد مطالعه.

میانگین	گروه
15.175±2.478	کنترل
16.125±2.633	پماد نیتروفروزان
20.05±2.100	PRP
17.15±2.946	پلاسما
19.85±3.241	پلاسما + PRP



نمودار ۱- مقایسه میانگین کلاژن در روزهای مختلف در بین گروه‌های آزمایش.

تجزیه و تحلیل‌های بیوفیزیکی، افزایش میزان انقباض زخم را نشان داده است و دوره اپیتلیزاسیون در گروه تحت درمان با ژل کمتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین ارزیابی بافت‌شناسی اثبات کرد که درمان با ژل پولولان باعث بهبود اپیتلیزاسیون زخم، بازسازی پوستی، تشکیل عروق خونی و سنتز کلاژن شد. بنابراین نتایج مطالعه‌ی آنها به شدت ثابت کرد که ژل پولولان می‌تواند یک عامل ترمیم بالقوه برای زخم باشد. (۱۹) که این مطالعه نیز با مطالعه‌ی حاضر همسو بود.

در سال ۲۰۱۳، آرندت و همکاران با بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفریک بر روی سلول‌های فیروبلست پوست نشان دادند که یک درمان کوتاه مدت دو دقیقه‌ای با پلاسمای سرد باعث افزایش تولید سایتوکین‌ها و فاکتورهای رشد می‌شود. همچنین این درمان اثری بر فرایند آپوپتوزیس نداشت. نتایج مطالعات آنها نشان داد که درمان با پلاسما با القای مهاجرت فیروبلست بدون تغییر در پرولیفریشن سلولی، صورت می‌گیرد. همچنین تحقیقات آنها نشان داد که سنتز کلاژن تایپ یک و همچنین Alpha-smooth muscle actin که در فرایند ترمیم اثر بسیار مهمی دارند، سرعت می‌گیرد (۵).

همچنین در پژوهش مشابه دیگر آنتیوآ و همکاران گزارش کردند در معرض بودن تنوسیت‌ها با PRP موجب افزایش تکثیر سلولی همچنین افزایش تولید عوامل رشد درونزاد (VEGF, HGF) که در ترمیم سلول‌های عضلانی نقش دارند می‌گردد، نتایج این تحقیق نیز با پژوهش حاضر

در حاشیه زخم، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و پروتئوگلیکان‌ها توسط فیروبلست‌ها ساخته می‌شوند. این ترکیبات تشکیل یک ماده زمینه‌ای (ماتریکس) ژل مانند را می‌دهند که کلاژن روی آن قرار می‌گیرد. زمانی که میزان کلاژن افزایش می‌یابد، سطح هگزوزآمین کاهش می‌یابد. محاسبه هگزوزآمین، نشان‌دهنده مقدار مواد زمینه‌ای در زخم می‌باشد. (۸) براین اساس میزان این ماده در مطالعه حاضر نیز همین روند را نشان داد. بطوری‌که با گذشت زمان و با افزایش میزان هیدروکسی پرولین، میزان هگزوزآمین موجود در بافت کاهش یافت. همچنین در این مطالعه میزان پروتئین بافتی نیز اختلاف معناداری را بین گروه درمان شده با PRP و پلاسما نسبت به گروه کنترل نشان داد. بطوری‌که میزان آن در گروه درمانی بالاتر از گروه کنترل می‌باشد که این نشان از تاثیر مثبت این دو روش درمانی دارد. چیترا و همکاران در مطالعه خود بیان داشتند زمانی‌که میزان پروتئین تام در زخم‌های درمان شده در مقایسه با زخم‌های درمان نشده بالاتر باشد، بیانگر این است که درمان صورت گرفته در تزیاید سلولی نقش مثبتی دارد. (۸)

در مطالعه‌ی دیگری تانگاول و همکارانش در سال ۲۰۲۰، اثر بخشی ژل پولولان بر ترمیم زخم با انجام تحقیقات بیوشیمیایی، بیوفیزیکی و بافت‌شناسی مورد بررسی قرار دادند. تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی نشان داد که ژل پولولان، به طور معنی‌داری محتوای کلاژن، هگزوزآمین، پروتئین و DNA را تغییر می‌دهد و در بهبود ترمیم زخم نقش دارد.

جدول ۳- مقادیر هگزوزآمین در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای مورد مطالعه.

گروه	روز	سوم	هفتم	چهاردهم	بیست و یکم
کنترل		74.5±1.393	62.8±1.569	58.3±1.258	51.3±2.122
پماد نیتروفورزان		67.3±2.586	59.4±1.159	55.7±3.188	50.2±0.404
PRP		59.4±1.100	49.8±2.081	41.2±0.251	39.9±0.472
پلاسما		56.3±1.85	47.3±2.386	41.9±0.850	38.1±1.792
پلاسما+PRP		56.6±2.458	45.3±1.189	41.1±0.624	36.3±0.264

جدول ۴- مقادیر میانگین و انحراف معیار هگزوزآمین در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای مورد مطالعه.

گروه	میانگین
کنترل	61.735±7.279
پماد نیتروفورزان	58.187±5.552
PRP	49.743±7.269
پلاسما	45.9±6.745
پلاسما+PRP	44.825±7.319

زخم‌های پوستی مورد استفاده قرار گیرند. (۱)

نتیجه‌گیری

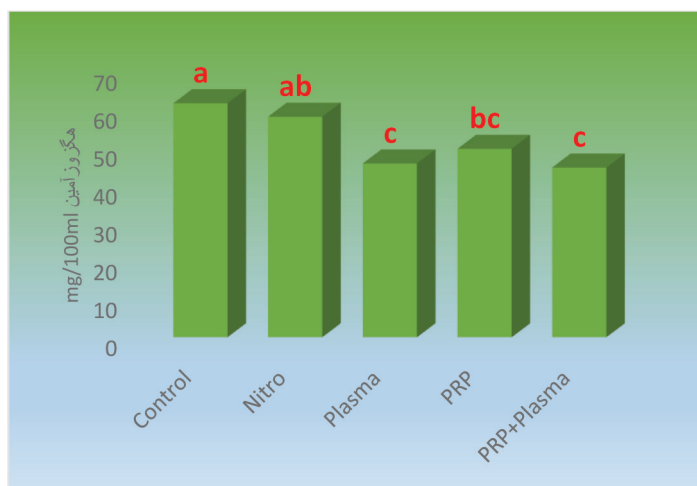
نهایتاً نتایج حاصل از این پژوهش مشخص کرد که در میان روش‌های مورد استفاده هر چهار روش استفاده از پماد، PRP، پلاسما و ترکیب PRP+ پلاسما منجر به بهبود زخم گردیدند این در حالی است که به نظر می‌رسد استفاده از پلاسما و PRP+ پلاسما به طور معناداری نسبت به گروه کنترل، سبب تسریع در بهبود زخم گردیدند. ($P < 0.05$)

منابع مورد استفاده

1-Ale-Ebrahim, M., Janani, E., & Mortazavi, P. (2018). The effect of cold argon plasma in atmospheric pressure on increasing blood coagulation speed and full-thickness cutaneous wound healing in rats. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Jour-*

همخوانی دارد. در واقع در هر دو مطالعه اثر مثبت پلاسما غنی از پلاکت در تسریع روند ترمیم اثبات شده. البته در پژوهش ما اثر پلاسما آرگون و پلاسما غنی از پلاکت به تنهایی نیز مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است هر دو عامل باعث تسریع روند التیام می‌شوند و استفاده توأم از آنها باعث ایجاد یک سینرژیسم در بهبود جراحی می‌گردد (۴).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط آل ابراهیم و همکارانش در سال ۲۰۱۸، به منظور مطالعه‌ی تاثیر پلاسما سرد آرگون در فشار اتمسفری بر افزایش سرعت انعقاد خون و التیام زخم تمام ضخامت پوست در موش‌های صحرایی انجام گرفت، نتیجه مشابهی با پژوهش حاضر داشت چرا که در این مطالعه بر اساس یافته‌های آسیب‌شناسی بافتی، موش‌های گروه درمان با پلاسما به طور معناداری روند بهتری را در التیام زخم تمام ضخامت پوستی نشان دادند و آنان اظهار کردند که پلاسما سرد آرگون می‌تواند جهت افزایش سرعت انعقاد خون و بهبود روند ترمیم در



نمودار ۲- مقایسه میانگین همگوزآمین در روزهای مختلف در بین گروه‌های آزمایش.

جدول ۵- مقادیر پروتئین بافتی در گروه‌های درمانی و کنترل در روزهای مورد مطالعه.

روز	سوم	هفتم	چهارم	بیست و یکم	گروه
کنترل	4170±123.06	5120±190.78	2180±117.05	2080±108.42	کنترل
پماد نیتروفروزان	4350±167.09	5242±157.09	3150±176.90	2553±253.76	پماد نیتروفروزان
PRP	4980±336.05	6230±650.64	4130±95.01	3100±45.03	PRP
پلاسما	6250±110.60	6940±282.88	5138±106.58	3521±100.64	پلاسما
پلاسما PRP+	6340±232.08	6932±135.69	5360±136.66	3660±77.105	پلاسما PRP+

nal, 12(48),323-336.

2-Alves, R., & Grimalt, R. (2018). A review of platelet-rich plasma: History, biology, mechanism of action, and classification. *Skin Appendage Disorders*, 4(1), 18–24.

3-Amini, M., Jahandideh, A., Dehghanpishch, P., Momeni, M., & Asghari, A. (2020). Comparative study of histological change after local treatments with zinc oxide, infrared rays, ultraviolet rays, and cold plasma in rat model of diabetic foot. *Indian Journal of Surgery*, 82(6), 1094-1099.

4-Anitua, E., Andía, I., Sanchez, M., Azofra, J., del Mar Zaldueño, M., de la Fuente, M., Nurden, P., & Nurden, A. T. (2005). Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(2), 281–286.

5- Arndt, S., Unger, P., Wacker, E., Shimizu, T., Heinlin, J., Li, Y. F., ... & Karrer, S. (2013). Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery

and improves wound healing in vitro and in vivo. *PloS one*, 8(11), e79325.

6- Bernhardt, T., Semmler, M. L., Schäfer, M., Bekeschus, S., Emmert, S., & Boeckmann, L. (2019). Plasma medicine: Applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

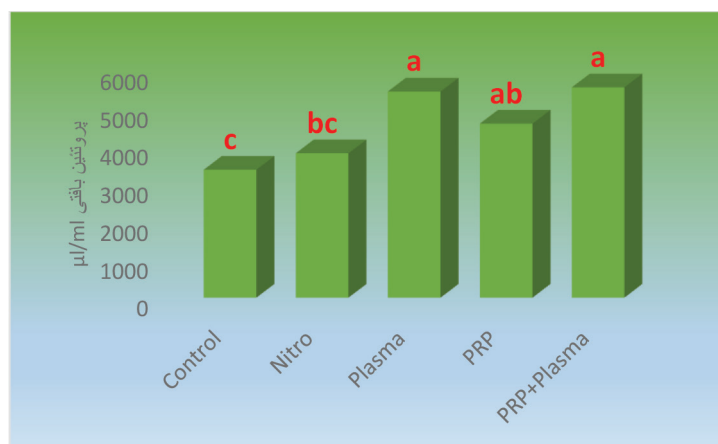
7- CHITHRA, P., SUGUNA, L., & CHANDRAKASAN, G. (1995). Influence of arginine on wound healing in rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 18(2), 111-117.

8-Chithra, P., Sajithlal, G. B., & Chandrakasan, G. (1998). Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 59(3), 179-186.

9- Ermakov, A. M., Ermakova, O. N., Afanasyeva, V. A., & Popov, A. L. (2021). Dose-Dependent Effects of Cold Atmospheric Argon Plasma on the Mesenchymal Stem and Osteosarcoma Cells In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6797.

جدول ۶- مقادیر میانگین و انحراف معیار پروتئین بافتی در گروه های درمانی و کنترل در روزهای مورد مطالعه.

میانگین	گروه
3387.5±553.17	کنترل
3823.7±624.41	پماد نیتروفوروزان
4610±564.6	PRP
5462±802.78	پلاسما
5573±910.06	PRP+ پلاسما



نمودار ۳- مقایسه میانگین پروتئین بافتی در روزهای مختلف در بین گروه های آزمایش.

- 10- George Broughton, I. I., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). Wound healing: An overview. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7S), 1e-S.
- 11- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry*, 48(2), 422-427.
- 12- Kaushik, A., & Kumaran, M. S. (2020). Platelet-rich plasma: The journey so far! *Indian Dermatology Online Journal*, 11(5), 685.
- Kim, J. H., Park, C., & Park, H. M. (2009). Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Veterinary dermatology*, 20(2), 123-126.
- 13- Levvy, G. A., & McAllan, A. (1959). The N-acetylation and estimation of hexosamines. *Biochemical Journal*, 73(1), 127.
- 14- Luo, Z., Che, J., Sun, L., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., & Zhao, Y. (2022). Microfluidic electrospray photo-crosslinkable κ -Carrageenan microparticles for wound healing. *Engineered Regeneration*.
- 15-Nour, S., Imani, R., Chaudhry, G. R., & Sharifi, A. M. (2021). Skin wound healing assisted by angiogenic targeted tissue engineering: A comprehensive review of bioengineered approaches. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(4), 453-478.
- 16- Pather N, Viljoen A, Kramer B. (2001). A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 364-370
- 17- Rondle, C. J. M., & Morgan, W. T. J. (1955). The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochemical Journal*, 61(4), 586.
- 18-Shukla, A., Rasik, A. M., Jain, G. K., Shankar, R., Kulshrestha, D. K., & Dhawan, B. N. (1999). In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of ethnopharmacology*, 65(1), 1-11.
- 19- Thangavel, P., Vilvanathan, S. P., Kuttalam, I., & Lonchin, S. (2020). Topical administration of pullulan gel accelerates skin tissue regeneration by enhancing collagen synthesis and wound contraction in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 395-403.
- 20- van Welzen, A., Hoch, M., Wahl, P., Weber, F., Rode, S., Tietze, J. K., Boeckmann, L., Emmert, S., & Thiem, A. (2021). The response and tolerability of a novel cold atmospheric plasma wound dressing for the healing of split skin graft donor sites: A controlled pilot study. *Skin Pharmacology and Physiology*, 34(6), 328-336.
- 21- Vijayalakshmi, K., & Rajakumar, G. S. (2021). Experimental Evaluation of an Antimicrobial Protein from *Bacillus Amylolyticus* MBL27 for Wound Healing Potential in Rats.
- 22- Winter, S., Meyer-Lindenberg, A., Wolf, G., Reese, S., & Nolff, M. C. (2020). In vitro evaluation of the decontamination effect of cold atmospheric argon plasma on selected bacteria frequently encountered in small animal bite injuries. *Journal of Microbiological Methods*, 169, 105728.
- 23-Woessner, J. F. Jun. (1961): The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440.
- 24- Younis, N. S., Mohamed, M. E., & El Semary, N. A. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by the Cyanobacteria *Synechocystis* sp.: Characterization, Antimicrobial and Diabetic Wound-Healing Actions. *Marine Drugs*, 20(1), 56.
- 25-Yu, R., Zhang, H., & Guo, B. (2022). Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering. *Nano-Micro Letters*, 14(1), 1-46.

