

تأثیر ویتامین E بر هیستوپاتولوژی ترمیم زخم حاصل از سوختگی تجربی در رت

لیلا زارعی^۱، شاه‌صنم غیبی^{۲*}، مجتبی کریمی پور^۳

چکیده

زمینه و هدف: ویتامین E، یک ویتامین محلول در چربی با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است که از بروز صدمات بافتی رادیکال‌های آزاد از طریق خنثی کردن آنها جلوگیری می‌کند. این مطالعه با هدف تعیین اثر ویتامین E بر ترمیم زخم سوختگی در موش بزرگ آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه از ۱۶ رأس موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ با وزن ۲۷۰-۲۵۰ گرم، در دو گروه ۸ تایی استفاده شد. بعد از ایجاد بیهوشی و تراشیدن موهای پشت حیوانات، مساحت معینی از پوست پشت آنها به مدت ۸ ثانیه در معرض آب ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا سوختگی مرطوب ایجاد شود. گروه مداخله، ویتامین E محلول در آب را روزانه (دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت گاوآژ تا ۱۵ روز دریافت کردند. مقایسه بین تغییرات شاخص‌های پوستی دو گروه با و بدون مداخله در روز شانزدهم بعد از سوختگی انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون Unpaired Test تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در گروه سوختگی درمان‌شده با ویتامین E، میزان اپی‌تلیزاسیون و میزان تشکیل عروق خونی در پوست سوخته، از گروه سوختگی بدون درمان بیشتر مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/01$). همچنین تعداد فولیکول‌های مو در گروه سوختگی و ویتامین E نسبت به گروه دیگر، بیشتر بود ($p < 0/05$). در صورتی که اختلاف درصد میزان بهبودی زخم در روزهای مختلف در بین گروه‌ها، از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد ویتامین E بر روی شاخص‌های ترمیم زخم سوختگی مؤثر بوده و مصرف آن در زمان سوختگی می‌تواند روند ترمیم زخم سوختگی را تا حد زیادی تسریع کند.

کلیدواژه‌ها: سوختگی؛ موش؛ ترمیم زخم؛ ویتامین E.

^۱دکتری بافت‌شناسی، مرکز تحقیقات سالید تومور، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، آذربایجان غربی، ایران.

^۲دانشیار گوارش کودکان، مرکز تحقیقات چاقی مادر و کودک، بیمارستان شهید مطهری، آذربایجان غربی، ایران.

^۳دانشیار علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، آذربایجان غربی، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

شاه‌صنم غیبی، مرکز تحقیقات چاقی مادر و کودک، بیمارستان شهید مطهری، آذربایجان غربی، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

drgheibi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۸

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Zarei L, Gheibi Sh, Karimipour M. The effect of Vitamin E on histopathology of experimental burn wound healing in rats.

Qom Univ Med Sci J 2015;9(4):49-54. [Full Text in Persian]

مقدمه

سوختگی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد (Reactive Oxygen Species, ROS) سبب واکنش‌های التهابی سیستمیک شده و در نهایت، منجر به اکسیداسیون در بافت مورد نظر می‌شود. این فرآیند طی مکانیسم تغییر فسفولیپیدهای غشای سلولی به وسیله رادیکال‌های آزاد رخ می‌دهد. غشاهای سلولی دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب اشباع شده هستند که لیپید پراکسیداسیون سبب تخریب و در نهایت، منجر به ضایعه بافتی می‌شود (۱). مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها بعد از سوختگی سبب بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن شده و سبب کاهش ضایعات بافتی می‌شود (۲،۳).

ویتامین E یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم پلازما بوده (۴) که استفاده از آن در درمان بیماران با سوختگی شدید، سبب بهبود تعادل آنتی‌اکسیدان/اکسیدان در پلازما شده و مانع از افزایش لیپید پراکسیداسیون می‌شود (۵). از آنجایی که گزارشی در خصوص مکانیسم اثرات ویتامین E بر روند ترمیمی و اپی‌تلیزاسیون زخم‌های سوختگی در دست نیست، این مطالعه با هدف تعیین تأثیر ویتامین E بر پروسه تشکیل مجدد اپی‌تلیوم (Reepithelialisation) در زخم‌های سوختگی درجه ۲ در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه از ۱۶ رأس موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ (با وزن ۲۷۰-۲۵۰ گرم) در دو گروه ۸ تایی (گروه سوختگی بدون درمان و گروه سوختگی با درمان) استفاده شد. این موش‌ها یک هفته قبل از شروع آزمایش مراحل آدآپتاسیون را گذرانده و در حیوانخانه دانشکده پزشکی در شرایط مناسب از نظر نور، حرارت، به صورت جدا از هم نگهداری شدند. تعداد موش‌ها با توجه به امکانات آزمایشگاه انتخاب و در هر گروه به صورت تصادفی قرار گرفتند. در ابتدای دوره، حیوانات وزن و با تزریق داخل عضلانی کتامین (به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) همراه با دیازپام (به میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس سوختگی درجه ۲ به میزان ۱۰٪ سطح بدن، به وسیله فرو کردن پشت حیوان در ظرف آب ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ثانیه

ایجاد شد. برای ایجاد سوختگی مرطوب از قالبی (طبق پیشنهاد Walker) (۶) که داخل آن عایق و تنها سطح کوچکی از آن متناسب اندازه سوختگی سطح موردنظر بود (با قرارگیری در معرض آب ۹۵ درجه) استفاده شد. حیوانات تحت درمان، روزانه ویتامین E محلول در آب را (دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تا ۱۵ روز به صورت گاواژ دریافت کردند. در روز شانزدهم پس از ایجاد سوختگی، حیوانات با اتر کشته شده و نمونه‌های پوستی برای کارهای هیستوپاتولوژی در فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. برای تعیین عروق خونی، از بلوک‌های تهیه شده، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون به نحوی تهیه گردید که علاوه بر بستر زخم، قسمت‌های سالم مجاور زخم نیز قابل مشاهده بود. پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین - ائوزین، ۱۰ منطقه به طور تصادفی و قراردادی از سرتاسر برش انتخاب و تعداد عروق خونی به وسیله میکروسکوپ (با قطعه چشمی و بزرگنمایی ۴۰) شمارش گردید. (قطعه چشمی به صورت یک صفحه شطرنجی بود). تعداد عروق خونی که در هر منطقه، داخل کادر شطرنجی قرار می‌گرفت شمارش و در نهایت، با جمع کردن آنها در ۱۰ منطقه، تعداد عروق خونی برای هر نمونه به دست آمد. اپی‌تلیزاسیون با میزان پیشروی اپیدرم از لبه سالم زخم به سمت مرکز زخم ارزیابی و تعداد فولیکول‌های مو در بستر زخم سوختگی در دو گروه مورد مطالعه بعد از شمارش با هم مقایسه شدند (۷).

از روز اول سوختگی تا روز پانزدهم در روزهای پنجم، دهم و شانزدهم بعد از ایجاد سوختگی، مساحت زخم در ساعات معین اندازه‌گیری و سپس با استفاده از فرمول زیر (۸)، میزان درصد زخم و درصد بهبودی زخم تعیین گردید.

$$\text{درصد زخم} = \frac{\text{سطح زخم در روز } x}{\text{سطح زخم روز اول}} \times 100$$

$$\text{درصد زخم} - 100 = \text{درصد بهبودی}$$

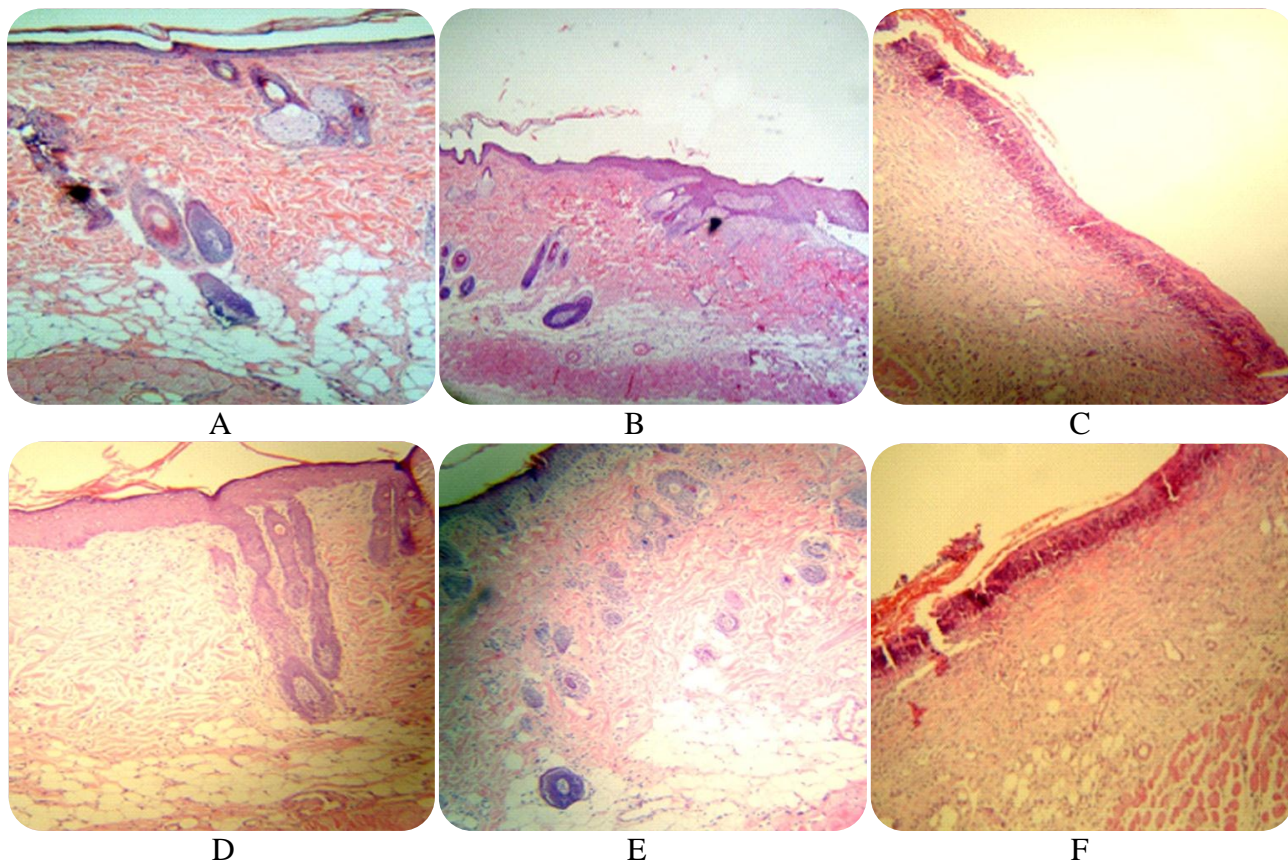
داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۴ و آزمون Unpaired Test تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار میزان پیشروی اپیدرم از لبه سالم زخم در

تعداد فولیکول‌های مو در دو گروه بالا به ترتیب $6/5 \pm 2/07$ و $10 \pm 1/69$ عدد بود ($p < 0/05$). درصد بهبودی زخم در گروه بدون درمان و درمان شده با ویتامین E نیز به ترتیب روز پنجم $16/88 \pm 1/8$ و $15/5 \pm 2/97$ ، روز دهم $9/38 \pm 2/2$ و $7/38 \pm 1/99$ و روز شانزدهم $22/88 \pm 2/41$ و $24/5 \pm 2/13$ به دست آمد. اختلاف دو گروه در هیچ روزی معنی‌دار نبود (شکل A-F).

روز شانزدهم پس از سوختگی، در گروه‌های سوختگی بدون درمان و درمان شده با ویتامین E به ترتیب $1675 \pm 237/54$ و $2600 \pm 232/99$ میکرون بود ($p < 0/01$). میانگین و انحراف معیار تعداد عروق خونی تشکیل شده در بستر زخم در گروه‌های سوختگی بدون درمان و درمان شده با ویتامین E به ترتیب $8/75 \pm 1/9$ و $13 \pm 1/92$ عدد برآورد شد ($p < 0/01$).



شکل A: پوست سالم که در آن هر سه لایه اپیدرم، درم و هیپودرم، همچنین فولیکول‌های مو مشخص می‌باشند.
شکل B: پوست در گروه سوختگی که میزان پیشروی اپیدرم را نشان می‌دهد.
شکل C: پوست گروه سوختگی می‌باشد، مرکز زخم فاقد پوشش اپیدرمی است.
شکل D، E، F: گروه درمان بوده که به ترتیب در آنها فولیکول‌های مو و تعدادی عروق خونی دیده می‌شود.

بحث

بیوشیمیایی و فارماکولوژیک، قادر به تغییر گردش خون بافتی در منطقه استاز (Stasis) باشد؛ از عمیق شدن زخم سوختگی ممانعت کرده و روند ترمیم نیز با موفقیت پیش می‌رود (۱۰). بنابراین، ضرورت انجام تحقیقات مختلف در این زمینه به خوبی احساس شده و بایستی به‌عنوان الویت‌های تحقیقاتی مدنظر قرار گیرد. واکنشگر اکسیژن، همچنین کاهش فعالیت دفاع آنتی‌اکسیدان، یکی از جنبه‌های مهم تحقیقاتی در زمینه سوختگی و ترمیم زخم است، به‌طوری‌که مطالعات زیادی در خصوص آن صورت گرفته و یا در حال انجام است.

سوختگی‌ها و آسیب‌های مربوط به آن به‌عنوان یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر و ناتوانی، همواره در جوامع مختلف موجب آسیب‌های اجتماعی - اقتصادی و روانی می‌شوند (۹)، لذا تحقیقات بسیاری در این زمینه انجام گرفته و یا در حال انجام است. در این تحقیقات از مدل‌های تجربی مناسب مانند موش سوری، موش بزرگ صحرائی و خرگوش برای تسریع در روند بهبودی زخم‌های سوختگی استفاده شده است. مشخص است در صورتی‌که عاملی مانند دارو بتواند از طریق مکانیسم‌های

می‌باشد. در صورتی که عاملی بتواند در زمان مناسب تشکیل عروق خونی جدید را تحریک و تشدید کند، می‌توان گفت روند ترمیم با موفقیت پیش رفته و از عمیق شدن زخم نیز جلوگیری می‌شود. آخرین گام در آنژیوژنیزس، بلوغ سلول‌های آندوتلیال و سازمان یافتن این سلول‌ها برای تشکیل لوله‌های مویرگی است (۱۴). نتایج مطالعه حاضر در خصوص تعداد عروق خونی نشان داد میانگین تعداد عروق خونی در گروهی که ویتامین E را دریافت کرده‌اند بیشتر از گروه سوختگی بدون درمان بوده است که حاکی از تحریک عروق‌زایی به وسیله ویتامین E می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعات دیگر همخوانی داشت (۱۲). شاخص مهم دیگر، شمارش تعداد فولیکول‌های مو در بستر زخم است. در این مطالعه تعداد فولیکول‌های مو در گروهی که ویتامین E را دریافت کرده بودند بیشتر از گروه دیگر بود که نشان می‌دهد احتمالاً ویتامین E توانسته است با فراهم آوردن شرایط بهتر از طریق خون‌رسانی مناسب، فولیکول‌های مو را بهتر حفظ کرده و آنها را که آسیب دیده‌اند نیز طی روند ترمیم بازسازی کند. آخرین شاخص مورد نظر در این مطالعه، بررسی میزان درصد بهبودی زخم بود که ارتباط مستقیمی با میزان بسته شدن زخم در طی روند ترمیم داشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد در این خصوص بین گروه‌ها، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و احتمالاً این نتیجه بدین دلیل است که ۱۵ روز، فرصت مناسب و کافی برای بررسی درصد بهبود زخم نبوده و باید زمان بیشتری (حداقل ۳۰ روز) (۱۰) بعد از ایجاد زخم سوختگی مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد ویتامین E با مقابله با رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ناشی از سوختگی تا حد زیادی توانسته است پروسه ترمیم زخم سوختگی را تسریع کند که شناخت مکانیسم‌های درگیر آن نیز نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد.

مطالعات متعدد نشان داده است سوختگی از طریق تولید رادیکال آزاد (Reactive Oxygen Species, ROS) سبب واکنش‌های التهابی و ایجاد رادیکال‌های آزاد شده که منجر به ضایعات بافتی می‌شود (۱).

در این مطالعه سعی گردید از دیدگاه هیستوپاتولوژی، اثرات ترمیمی ویتامین E (به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت) در زخم‌های سوختگی مورد بررسی قرار گیرد، شاخص‌های اصلی این بررسی شامل میزان پیشروی اپیدرم از لبه سالم زخم (اپی‌تلیزاسیون)، میزان رگزایی، تعداد فولیکول‌های مو و تعیین درصد بهبودی زخم بود. اپی‌تلیزاسیون با مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیال از لبه سالم زخم شروع و به سمت مرکز پیش رفته تا سرانجام تمام زخم را می‌پوشاند. اپیدرم ساخته شده از تعداد سلول‌ها و لایه‌های بیشتری نسبت به حالت طبیعی برخوردار است و به محض اینکه محل ضایعه به وسیله سلول‌های اپیدرمی مهاجر و تازه پوشیده شود، تمایز آنها آغاز و در صورت موفقیت‌آمیز بودن ترمیم، سلول‌ها شکل و آرایش طبیعی خود را به دست آورده و از تعداد لایه‌های آن نیز کاسته می‌شود (۱۱، ۱۲). یافته‌های مربوط به شاخص اپی‌تلیزاسیون در مطالعه حاضر نشان داد میزان پیشروی اپیدرم در گروهی که ویتامین E را دریافت کرده‌اند بیشتر می‌باشد، این یافته مؤید این حقیقت است که ویتامین E می‌تواند سبب تحریک تشکیل اپیدرم تازه شود که با نتایج مطالعه Galeano و همکاران (سال ۲۰۰۱) مطابقت داشت. محققین مذکور، اثرات ویتامین E را بر شاخص‌های ترمیم زخم در موش‌های دیابتی بررسی کردند (۱۳). ضمناً یادآوری می‌شود در مطالعه حاضر، در هیچ کدام از گروه‌های مورد بررسی، سطح زخم به‌طور کامل بسته نشده بود که احتمالاً به دلیل بزرگ بودن سطح زخم سوختگی و ناکافی بودن آن، فرصت ۱۵ روزه برای بسته شدن کامل زخم کافی بوده است. شاخص مهم دیگری که در این مطالعه مدنظر قرار گرفت میزان رگزایی یا آنژیوژنیزس و توسعه عروق خونی در بستر زخم بود که یکی از اساسی‌ترین عوامل مؤثر در موضوع ترمیم زخم

References:

1. Hoşnüter M, Gürel A, Babuçcu O, Armutcu F, Kargi E, İşikdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 2004;30(2):121-5.
2. Şener G, Şehirli AÖ, Şatıroğlu H, Keyer-Uysal M, Yeğen BÇ. Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci* 2002;70(25):2977-85.
3. LaLonde C, Nayak U, Hennigan J, Demling RH. Excessive liver oxidant stress causes mortality in response to burn injury combined with endotoxin and is prevented with antioxidants. *J Burn Care Rehabil* 1997;18(3):187-92.
4. Bekyarova G, Yankova T, Galunska B. Increased antioxidant capacity, suppression of free radical damage and erythrocyte aggregability after combined application of alpha-tocopherol and FC-43 perfluorocarbon emulsion in early postburn period in rats. *Artifici Cell Blood Substitut Biotechnol* 1996;24(6):629-41.
5. Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, Allegra M, Renda D, Maggio A, et al. Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in β -thalassemia intermedia patients. *Free Radic Res* 2001;34(5):529-40.
6. Walker HL, Mason Jr. A standard animal burn. *J Trauma* 1968;8(6):1049-51.
7. Karimi Pour M, Zarei L, Eilkhani Zadeh B, Shir Pour AR, Rajaei F. The effects of Nitric oxide on wound healing in burned Rats. *Anatomic Sci J* 2006;3(4):253-259. [Full Text in Persian]
8. Shi HP, Most D, Efron DT, Witte MB, Barbul A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 2003;11(3):198-203.
9. Mohammadi-Barzelighi H, Alaghebandan R, Motevallian A, Alinejad F, Soleimanzadeh-Moghadam S, Sattari M, et al. Epidemiology of severe burn injuries in a Tertiary Burn Centre in Tehran, Iran. *Annal Burn Fire Disaster* 2011;24(2):59.
10. Kaufman T, Lusthaus SN, Sagher U, Wexler MR. Deep partial skin thickness burns: A reproducible animal model to study burn wound healing. *Burns* 1999;16(1):13-16.
11. Robbins SL. Robbins basic pathology. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Editors. New York: Elsevier Health Sciences; 2012.
12. Galeano M, Torre V, Deodato B, Campo GM, Colonna M, Sturiale A, et al. Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Surgery* 2001;129(4):467-77.
13. Altavilla D, Galeano M, Bitto A, Minutoli L, Squadrito G, Seminara P, et al. Lipid peroxidation inhibition by raxofelast improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Shock* 2005;24(1):85-91.
14. Subrahmanyam M. Honey dressing versus boiled potato peel in the treatment of burns: A prospective randomized study. *Burns* 1996;22(6):491-3.

The Effect of Vitamin E on Histopathology of Experimental Burn Wound Healing in Rats

Leila Zarei¹; Shahsanam Gheibi^{2*}; Mojtaba Karimipour³

¹PhD of Histology, Solid Tumor Research Center, Urmia University of Medical Sciences, West Azerbaijan, Iran.

²Associate Professor of Pediatric Gastroenterology, Maternal & Childhood Obesity Research Center, Shahid Motahari Hospital, Urmia University of Medical Sciences, West Azerbaijan, Iran.

³Associate Professor of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, West Azerbaijan, Iran.

*Corresponding Author:
Shahsanam Gheibi,
Maternal & Childhood Obesity Research Center, Shahid Motahari Hospital, Urmia University of Medical Sciences, West Azerbaijan, Iran.

Email:
drgheibi@yahoo.com

Received: 29 Jun, 2014

Accepted: 2 Nov, 2014

Abstract

Background and Objectives: Vitamin E is a fat-soluble vitamin with antioxidant properties, which prevents tissue damages induced by free radicals by their neutralization. The aim of this study was to determine the effect of vitamin E on burn wound healing in rats.

Methods: In this study, 16 mature male rats weighing 260 ± 10 g were used in two groups of 8 each. After induction of anesthesia and shaving their head hair, certain area of their back was exposed to 95°C water for 8 seconds to induce wet burn. The intervention group received water-soluble vitamin E (300mg/kg) through gavage for 15 consecutive days. The comparison of the changes of skin parameters between intervention and nonintervention groups was performed on the 16th day after burn. Data were analyzed by unpaired t-test. The significance level was considered to be $p < 0.05$.

Results: Epithelialization and angiogenesis in burned skin were higher in the vitamin E-treated burn group compared to non-treatment, which was statistically significant ($p < 0.01$). Also, the number of hair follicles was higher in the burn and vitamin E group compared to another group ($p < 0.05$); however, there was no significant difference between the studied groups in the percentage of wound healing in different days.

Conclusion: The results of this study showed that vitamin E can be effective on wound healing indices, and consumption of vitamin E during burn time could accelerate the burn wound healing process.

Keywords: Burns; Rat; Wound Healing; Vitamin E.