

بررسی اثرات ال- آرژنین بر درصد بهبود زخم سوختگی درجه

دو در موش بزرگ آزمایشگاهی

دکتر مجتبی کریمی پور^۱، لیلا زارعی^۲، دکتر احسان صبوری^۳

۱- استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (مؤلف مسئول)
mojtaba_Karimipour@Yahoo.com

۲- کارشناس ارشد گروه بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۳- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکساید (NO) یک رادیکال آزاد با نیمه عمر کوتاه است که در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک دخالت دارد و از اکسیداسیون ال- آرژنین ایجاد می شود. گزارشات ضد و نقیضی در رابطه با اثرات NO در پروسه ترمیم زخم سوختگی وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ال- آرژنین (پیش ساز NO) و L-NAME (مهارکننده NO) بر درصد بهبودی زخمهای سوختگی در موش بزرگ آزمایشگاهی است.

روش بررسی: در این تحقیق از ۶۰ راس موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ با وزن ۲۷۰-۲۵۰ گرم استفاده شده است. بعد از ایجاد بیهوشی و تراشیدن موهای پشت آنها، مساحت معینی از پوست پشت حیوانات به مدت ۸ ثانیه در معرض آب ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سوختگی مرطوب ایجاد شد. پس از ایجاد سوختگی، حیوانات بطور تصادفی در دو دسته ۳۰ تایی قرار گرفتند. هر دسته دارای سه گروه بود: گروه کنترل (گروه سوختگی بدون درمان)، گروه تجربی یک (گروهی که به میزان ۱۰۰ mg/kg ال- آرژنین را بصورت داخل صفاقی دریافت می کردند) و گروه تجربی دو (گروهی که به میزان ۱۰ mg/kg L-NAME را دریافت می کردند) به موشهای دسته اول در روزهای اول، سوم و پنجم تزریق صورت گرفت و در روز هفتم بعد از سوختگی نمونه پوستی تهیه شد. به موشهای دسته دوم از روز اول و یک روز در میان تا روز ۱۳ تزریق و در روز ۱۵ نمونه گیری انجام شد. پس از فیکس کردن نمونه ها و تهیه لام هایی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین میزان اپیتلیزاسیون بررسی شد. شاخص مورد بررسی دیگر اندازه گیری میزان بهبودی زخم در روزهای اول، پنجم، دهم و پانزدهم بعد از سوختگی بود.

یافته ها: میزان پیشروی اپیدرم از لبه سالم زخم در گروههای تجربی یک نسبت به گروههای کنترل و L-NAME بیشتر بود. میزان درصد بهبودی زخم در گروههای ال- آرژنین نسبت به سایر گروهها بیشتر بود اما از نظر آماری معنادار نبود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که در هیچکدام از گروههای مورد مطالعه سطح زخم بطور کامل بسته نشده بود و NO تا حدی توانسته بود ترمیم را تسریع نماید.

کلید واژه ها: ال- آرژنین، L-NAME، سوختگی، ترمیم، بهبودی
وصول مقاله: ۸۴/۱۱/۱۵ اصلاح نهایی: ۸۵/۴/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۵/۸/۹

مقدمه

سوختگی به میزان حرارت و طول مدت

تماس آن با بدن بستگی دارد و خطرات آن بسته به عمق، سطح

یکی از علل مهم مرگ و میر و از کار افتادگی را سوختگی های ناشی از حرارت و عوارض آن تشکیل می دهد. شدت

سنتیتاز (NOS) حاصل می‌گردد (۵). NO دارای طیف وسیعی از اعمال پیچیده به ویژه در جراحات سوختگی پوست است. از نظر شیمیایی کوچک و فاقد بار است و در سال ۱۹۹۲ بعنوان مولکول سال انتخاب شد (۶). نقش درمانی NO در التیام زخمها و التهابها و بویژه پاسخهای التهابی پس از سوختگی از جمله زمینه‌های مهم تحقیقاتی به شمار می‌رود.

اغلب مقالات موجود به افزایش میزان NO متعاقب سوختگی‌های حاد تاکید دارند. تحقیقات متعدد نشان داده که NO در سوختگی توسط ماکروفاژها ساخته می‌شود (۷). و دارای اثرات سودمندی در ترمیم زخم می‌باشد اما در مقابل گزارشات متعدد دیگر نیز مبنی بر اثرات مضر NO، در سوختگی وجود دارد که با مطالعات دسته قبلی همسوئی ندارند.

Schaller و همکاران در سال ۱۹۹۹ تأثیر مهار تولید NO را بوسیله L-NAME در زخمهای برشی در موشهای سوری مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه‌گیری کردند که NO دارای اثرات سودمندی در ترمیم زخم است (۸). Akcay و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ تأثیر مهار NO در ۱۵ روز پس از سوختگی در موشهای سوری مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که مهار NO در سوختگی سبب تأخیر در ترمیم زخم (مهار تکثیر اپیدرم و اختلال در تشکیل بافت گرانولاسیون و عروق خونی) می‌شود (۹). محققین دیگر بر خاصیت باکتری کشی NO در محیط کشت و بصورت استفاده موضعی

محل ضایعه و سن فرد آسیب دیده متفاوت می‌باشد (۱،۲). اگرچه در ظاهر مهمترین صدمه سوختگی بصورت اثرات جلدي آن تظاهر می‌کند ولي تغييرات فیزیولوژی بدن بصورت عمومی و موضعی از نظر زنده ماندن بیمار نقش عمده و اساسی را ایفا می‌نماید. امروزه با پیشرفت سریع تکنولوژی همه روزه شاهد بروز این مصدومیت بصورت فردی یا دسته جمعی می‌باشیم، لذا بنظر می‌رسد که این مسئله می‌بایست در برنامه‌ریزیهای فرد و کلان دولتی مورد توجه خاص قرار بگیرد. با توجه به بیان فوق و اهمیت شیوع سوختگی و شدت جراحات ناشی از آن کوششهای فراوانی در جهت تسریع بهبود زخم در بیماران سوخته انجام گرفته است.

ترمیم زخم فرآیند پیچیده‌ای است که بواسطه آن تمام زخمها اعم از زخمهای جراحی و زخمهای ناشی از سوختگی طی روندی یکسان التیام می‌یابند (۳). از آنجائیکه نقص موقت و یا دائمی در کارایی بدن از عوارض مهم سوختگی به شمار می‌رود بنابراین یکی از مهمترین درمانهایی که در مورد بیماران سوخته می‌تواند انجام گیرد سرعت بخشیدن به فرآیند ترمیم زخم سوختگی است که خود به خود می‌تواند باعث کاهش احتمال ابتلاء به عوارض سوختگی از جمله عفونت بشود (۴).

نیتریک اکساید^۱ (NO) نوعی میانجی بیولوژیک دو اتمی است که از اکسیداسیون ال - آرژنین توسط آنزیم نیتریک اکساید

1. Nitric oxide

در محل زخم صحنه گذاشتند و تاکید کردند که NO می‌تواند در زخمهای سوختگی که دچار عفونت شده‌اند مفید باشد (۱۰). در مقابل، گزارشات دیگری مبنی بر اثرات سوء NO در زخم سوختگی وجود دارد. از مطالعات انجام شده در این خصوص می‌توان به مطالعه Zilan و همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره کرد. این محققین عنوان کردند که مصرف مکمل‌های خوراکی مهارکننده تولید NO نقش مهمی در کاستن از جراحات ایسکمی بعد از سوختگی را دارد (۱۱). در مطالعه دیگر، محققین از BBS-2 استفاده کردند و عنوان کردند که BBS-2 با مهار NOS نتایج سودمندی را در پی دارد (۱۲). و بالاخره از دیگر مطالعات انجام شده در این خصوص مطالعه Oliveria و همکاران در سال ۲۰۰۴ است و نشان دادند که پس از سوختگی NO سبب افزایش یروکسی نیتريت شده که یک ماده سمی است (۱۳). با توجه به گزارشات ضد و نقیض فوق، ما در این تحقیق سعی داریم تا اثرات پیش ساز NO (ال- آرژنین) و مهارکننده آن (L-NAME) را بر میزان بهبودی زخم سوختگی در موشهای بزرگ آزمایشگاهی که در آنها سوختگی درجه دو ایجاد شده بود مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

در این مطالعه از ۶۰ راس موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ به وزن ۲۷۰-۲۵۰ گرم استفاده گردید. ابتدا حیوانات را وزن کرده و با تزریق داخل عضلانی کتامین به میزان ۵۰mg/kg همراه با دیازپام بیهوش شدند

و موهای ناحیه پشت آنها تراشیده شد. سوختگی درجه دو توسط فرو کردن پشت حیوان در ظرف آب ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ثانیه ایجاد شد. سوختگی با قالبی ایجاد شد که داخل آن عایق بود. و فقط سطح کوچکی از آن در معرض آب ۹۵ درجه قرار می‌گرفت. سوراخ قالب مورد نظر در این تحقیق به میزان ۵×۳ سانتی‌متر بود. پس از ایجاد سوختگی برای جلوگیری از شوک به میزان ۵ml نرمال سالین به طریق داخل صفاقی تزریق شد. پس از آنکه حیوانات به هوش آمدند به قفسهای جداگانه منتقل شدند و بطور تصادفی در دو دسته قرار گرفتند. هر دسته شامل سه گروه بود، گروه کنترل (گروه سوختگی بدون درمان)، گروه تجربی یک (گروهی که ۱۰۰mg/kg ال- آرژنین را بصورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند) و گروهی تجربی دو (گروهی که ۱۰mg/kg L-NAME دریافت می‌کردند). تزریقات گروههای دسته اول در روزهای اول، سوم و پنجم و نمونه‌گیری از آنها در روز هفتم پس از سوختگی انجام شد. تزریقات گروههای دسته دوم از روز اول بصورت یک روز در میان تا روز سیزدهم انجام گرفت و نمونه‌گیری از آنها در روز پانزدهم انجام شد. نمونه طوری برداشته شد که حاوی ناحیه مرکز و بافت سالم اطراف باشد. پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده و مراحل پروسس بافتی انجام شد و در نهایت از بلوکهای پارافینی مقاطع ۶ میکرونی تهیه و با هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شد.

نرم افزاری SPSS و آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

یافته‌ها

میزان پیشروی اپیدرم از لبه سالم زخم (اپیدرم تازه ساخته شده) و همینطور ضخامت آن در گروه‌های تجربی یک، نسبت به گروه‌های کنترل و تجربی دو، بیشتر بود. اما در هیچکدام از گروه‌های مورد مطالعه سطح زخم بطور کامل بسته نشده بود. از نظر درصد بهبودی زخم، میانگین آن در گروه تجربی یک (گروهی که ال آرژنین دریافت کرده بودند) نسبت به گروه‌های کنترل و تجربی دو (گروهی که L-NAME دریافت کرده بودند) بیشتر بود اما اختلاف آنها از نظر آماری معنادار نبود (جدول و نمودار ۱). تساوی ۱ تا ۳ پوشش اپیدرمی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهند.

یکی دیگر از روش‌های ارزیابی اثرات NO در ترمیم زخم در مطالعه حاضر بررسی مساحت سطح زخم بود به این صورت که از روز اول سوختگی تا روز پانزدهم در روزهای اول، پنجم، دهم و پانزدهم پس از سوختگی مساحت زخم در ساعات معین اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از فرمول‌های زیر میزان درصد زخم و درصد بهبودی زخم ارزیابی شد (۱۴).

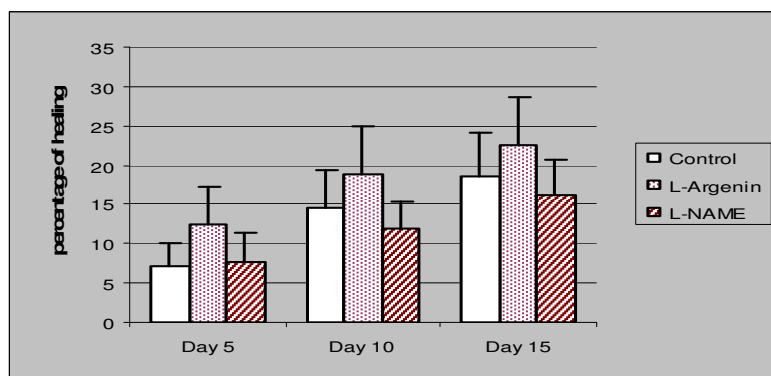
$$X = \frac{\text{مساحت زخم در روز اول}}{\text{مساحت زخم در روز دهم}} \times 100$$

درصد زخم - ۱۰۰ = بهبودی

X روزی است که مساحت زخم اندازه‌گیری می‌شود. پس از استخراج داده‌های خام، برای بررسی‌های آماری از برنامه

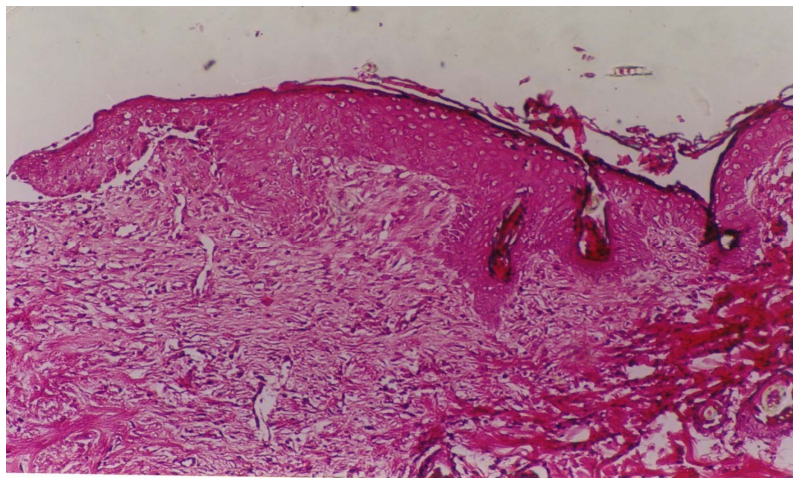
جدول ۱: میانگین و انحراف معیار درصد بهبودی زخم در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم پس از ایجاد سوختگی در گروه‌های سه‌گانه

گروه‌ها	روز	پنجم	دهم	پانزدهم
کنترل		± ۲/۸۳	± ۴/۶۸	± ۵/۵۹
		۷/۱۶	۱۴/۶۹	۱۸/۶۵
تجربی یک		± ۴/۹۲	± ۶/۰۵	± ۶/۲۷
		۱۲/۳۹	۱۸/۹۱	۲۲/۴۶
تجربی دو		± ۳/۶۵	± ۳/۴۱	± ۴/۴۹
		۷/۶۷	۱۱/۸۹	۱۶/۱۸

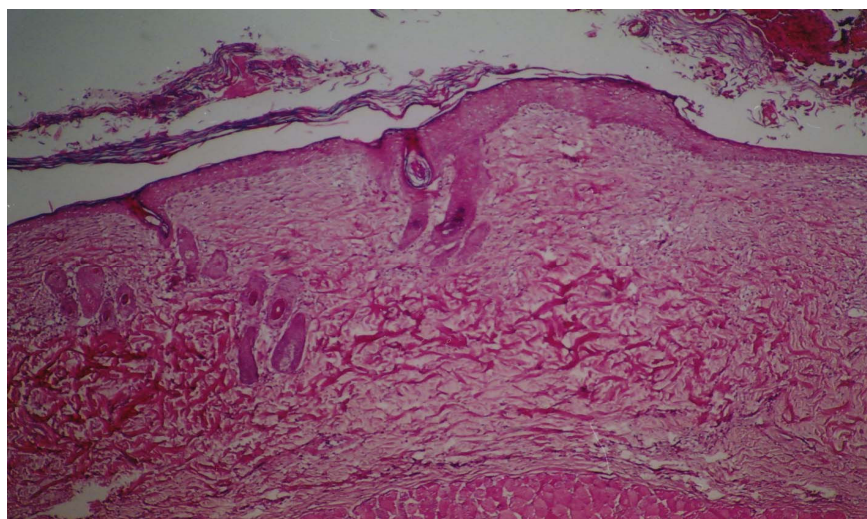


نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار درصد بهبودی زخم در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم پس از سوختگی.

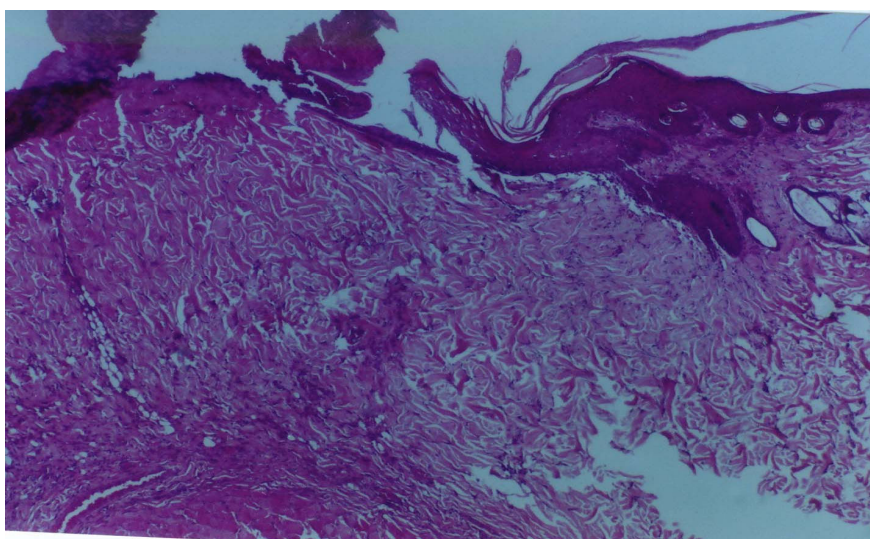
درصد بهبودی در گروه‌های ال- آرژنین بیشتر است اما از نظر آماری معنادار نیست.



تصویر ۱: پوشش اپیدرمی در گروه کنترل در روز پانزدهم که فقط قسمتی از آن تشکیل شده است. بزرگنمایی اصلی ۱۰۰، رنگ‌آمیزی H&E



تصویر ۲: پوشش اپیدرمی در گروه ال- آرژنین در روز پانزدهم که میزان اپیتلیزاسیون نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر شده است. بزرگنمایی اصلی ۴۰، رنگ‌آمیزی H&E



تصویر ۳: پوشش اپیدرمی در گروه L-NAME در روز پانزدهم که میزان اپیتلیزاسیون بسیار اندک است.

بزرگنمایی اصلی ۱۰۰، رنگ‌آمیزی H&E

بحث

به بررسی درصد بهبودی نیز یافته فوق را تأیید می‌کند یعنی اینکه درصد بهبودی در گروه ال- آرژنین نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود اما از نظر آماری معنادار نبود. لازم به ذکر است تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با بررسی سطح زخم و میزان بهبودی زخم در خصوص NO در زخم‌های سوختگی انجام نشده است. ما در تحقیقات قبلی خود نشان دادیم که NO بر روی شاخص‌های ترمیم (تشکیل عروق خونی و بافت گرانولاسیون) اثرات مثبت و سودمندی دارد (۱۵). نتایج مربوط به تشکیل اپیدرم تازه در مطالعه حاضر با مطالعه Akcay و همکاران در سال ۲۰۰۰ همسوئی دارد. این محققین تأثیر آمینو گوانیدین (یکی از مهارکننده‌های NO) را بر ترمیم زخم سوختگی موش‌های سوری بررسی کردند و عنوان کردند که مهار NO سبب تأخیر در روند اپیتلیزاسیون می‌شود (۹).

نقش NO در ترمیم زخم سوختگی بطور کامل مشخص نشده است و تاکنون از اثرات سودمند و مضر آن گزارشات متعددی منتشر شده است. ما در این مطالعه سعی داریم تا از دیدگاه هیستوپاتولوژی (بررسی اپیتلیزاسیون) و اندازه‌گیری سطح زخم در طی

دوران پس از سوختگی، اثرات NO را بر پروسه ترمیم در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی که دارای سوختگی درجه دو بودند مورد بررسی قرار دهیم.

مهمترین یافته مطالعه حاضر عدم بسته شدن زخم در تمامی گروه‌های مورد مطالعه بود. یعنی اپیتلیزاسیون (پوشش اپیدرمی) بطور کامل تشکیل نشده بود. اما میزان پیشروی اپیدرم تازه ساخته شده از لبه سالم زخم در گروهی که ال- آرژنین را دریافت کرده بودند نسبتاً بیشتر از گروه کنترل و گروه L-NAME بود. نتایج مربوط

ایفا کرده و منبع اصلی واسطه‌هایی هستند که سبب تغییرات ناشی از التهاب در موضع سوختگی می‌شوند. البته در مقابل گزارشاتی وجود دارد مبنی بر اینکه افزایش میزان NO حاصل از NOS واسطه ایجاد ادم و نیز فراخوانی لکوسیتها به زخمهای سوختگی است و سبب مهار تنفس میتوکندریایی و افزایش تولید پروستاگلاندینها و همچنین موجب ایجاد هیپوکسی موضعی در زخمهای سوختگی می‌شود (۱۹،۲۰).

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که NO تا حدی سبب تسریع در بهبود زخم می‌شود و مهار تولید آن ترمیم را با اختلال مواجه می‌سازد. اما در رابطه با عوارض سوختگی و NO بر سایر ارگانها نمی‌توان قضاوت کرد که تجویز پیش ساز NO و مهار تولید NO چه نقشی بر سایر ارگانها دارد. Gan و همکاران در سال ۲۰۰۵ عنوان کردند که بیان NOS از نورونهای گانگلیون میانتریک روده‌ها در موشهای بزرگ آزمایشگاهی دچار سوختگی منجر به اختلال حرکتی روده‌ها می‌شود (۲۱)، و یا پروکسی نیتريت تولید شده در بیماران سوخته که یک ماده سمی است می‌تواند سبب ضایعاتی در ریه بشود. یادآوری می‌شود که پروکسی نیتريت از واکنش سریع بین سوپر اکسید و نیتريك اکساید ایجاد می‌شود (۲۲). بنابر این بررسی عوارض NO در سایر ارگانهای افراد سوخته نیازمند تحقیقات بیشتر است.

عدم بسته شدن کامل زخم در مطالعه حاضر خود می‌تواند به این دلیل باشد که سطح زخم ایجاد شده در مطالعه حاضر زیاد بوده و ۱۵ روز فرصت مناسب و کافی برای اپیتلیزاسیون کامل نمی‌باشد و توصیه می‌شود برای بررسی بسته شدن کامل زخم سوختگی با این سطح حداقل ۳۰ روز بعد از ایجاد سوختگی باشد.

با توجه به ساز و کارهایی که در ترمیم زخم سوختگی نقش دارند شاید بتوان گفت که NO احتمالاً از طریق خونسازی بهتر و مهار نوتروفیلها در محل بستر زخم سوختگی توانسته است پروسه ترمیم را تا حدی پیش ببرد. محققین معتقدند که نقش NO در این زمینه به دلیل القاء تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است. علاوه بر آن نشان داده شده که NO در *in vitro* سبب تحریک عروق زائی می‌شود و مهار آنزیم NOS تشکیل عروق جدید را مهار می‌کند (۱۶). محققین دیگر با استفاده موضعی از فاکتور رشد عروقی در محل زخم سوختگی نتایج سودمندی را کسب کرده‌اند (۱۷).

از دیگر دلایل احتمال نقش NO در ترمیم زخم می‌توان به نقش آنها در مهار چسبندگی گرانولوسیت‌های مورفونوکلئار به اندوتلیال اشاره کرد علاوه بر این، عده‌ای معتقدند که NO سبب مهار مهاجرت نوتروفیلها بداخل بافت‌های آسیب دیده می‌شود (۱۸). یادآوری می‌شود که سلولهای مذکور نقش اساسی را در پاتوفیزیولوژی سوختگی

References

1. Cakir B, Yegen C. Systemic responses to barn injury. *Turk J Med Sci* 2004; 34: 215-226.
2. Heimbach D. Burn patients, then a now. *Burns* 1999; 25(1): 1-5.
3. Kanzler MH. Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol* 1989; 12: 1156-1161.
۴. شهابی شهرام، محمدحسن زهیر، هاشمی سید محمود، شاهرخی سمیه، کریمی‌پور مجتبی، کاظم نژاد انوشیروان و همکاران. هیپرترمی موضعی ترمیم زخم سوختگی درجه دوم را تسریع می‌کند. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سال ۱۳۸۴، شماره ۲، صفحات: ۱۱۰-۱۱۸.
5. Rawlingson A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns* 2003; 29(7): 631-640.
6. Kosliand DE. Molecule of the year. *Science* 1993; 202: 1953-1960.
7. Paulsen SM, Wurster SH, Nanncy LB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human burn wounds. *Wound Repair Regen* 1998; 6: 142-148.
8. Schaller MR, Tantry U, Van Wesep KA. Nitric oxide metabolism in wounds. *J Surg Res* 1997; 71(1):25-31.
9. Akcay MN, Ozcan O. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced burn wounds. *J Trauma* 2000; 49: 327-330.
10. Ghaffari A, Neil DH, Road J, Ghahary A. A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial. *Nitric oxide* 2005; 12(3): 129-140.
11. Zilan A, Cetinkale O. The role of supplementation or inhibition of nitric oxide production in burn injury to reduce ischemic damage. *Ulus Travma Derg* 2003; 9: 769-75.
12. Enkhbaatar P, Murakamik. The inducible nitric oxide synthase inhibitor BBS-2 prevents acute lung injury in sheep after burn and smoke inhalation injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1021-6.
13. Oliveira GV, Shimodo K. Skin nitric oxide and its metabolites are increased in non burned skin after thermal injuries. *Shock* 2004; 22(3): 278-82.
۱۴. شریعتی مهدی، خاکساری محمد، جورسرای غلامعلی، جعفری نوه حمیدرضا. بررسی اثر قطع عصب بر پاسخ زخم سوختگی به پماد فاندرومول در موش صحرایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سال ۱۳۷۹، جلد ۲، شماره ۱، صفحات: ۵-۱۵.
۱۵. کریمی‌پور و همکاران. بررسی اثرات ترمیمی نیتریک اکساید در پروسه ترمیم زخم سوختگی در موش بزرگ آزمایشگاهی. مجله انجمن علوم تشریح ایران. سال سوم، زمستان ۱۳۸۴، شماره ۴، صفحات: ۲۵۹-۲۵۳.
16. Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes and during cutaneous wound repair. *The FASEB Journal* 1999; 13: 2002-2014.
17. Galiano D, Tepper M, Polo R, Bhalt A, Steinmetz G, Gurtner C. Topical Vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J of Patholo* 2004; 164: 1935-1947.
18. Shi HP, Eyron DT. Supplemental L- Arginine enhanced wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 2003; 11(3): 198-203.
19. Lindblom L, Cassuto J, Yvegard L. Importance of nitric oxide in regulation of burn oedema, proteinureia and urine output. *Burns* 2000; 26: 13-17.
20. Weitzberg E, Lundberg JO. Nonenzymatic NO production in humans. *Nitric oxide* 1998; 2(1): 1-7.
21. Gan HT, Chen JD. Roles of nitric oxide and prostaglandins in pathogenesis of delayed colonic transit after burn injury in rats. *Am J physiol* 2005; 288(5): 1316-1324.
22. Chen LW, Wang US, Chen HL, Chen JS. Perexinitrite is an important mediator in thermal injury induced lung damage. *Crit Care Med* 2003; 31(8): 2170-2177.