

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ترمیمی پلاسمای سرد بر پوست سوخته در موش بالغ سوری

شادی دره لو^۱، سیمین محمدی گرجی^{۲*}، نسیم حیاتی رودباری^۳

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران

^۳ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

* Email: siminmohamadigorgi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸

چکیده

زخم ناشی از سوختگی معمولاً به کندی بهبود می یابد و این زخم ها مستعد عفونت باکتریایی و تشکیل اسکار هستند. امروزه در کنار روش های قدیمی استریل و پانسمان زخم از لیزر CO₂ یا پلاسمای نیتروژن برای تسریع فرآیند انعقاد خون و ترمیم زخم استفاده می شود که هر دو روش به دلیل حرارت بالای ایجاد شده در درمان زخم های سوختگی کاملاً موفق نیستند و امید می رود استفاده از پلاسمای سرد بتواند در تسریع روند طبیعی ترمیم زخم نسبت به سایر درمان ها مثرتر باشد. لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پلاسمای سرد بر روی زخم سوختگی حرارتی بر روی پوست موش بالغ سوری در شرایط *in vivo* می باشد. ۲۴ سر موش نر بالغ سوری به صورت تصادفی در گروه های کنترل، کنترل سوختگی، شم و گروه تجربی قرار گرفتند. پس از بیهوشی و در شرایط استریل از طریق تماس جسم داغ در پشت گردن موش ها یک زخم مدور به قطر ۸ میلی متر ایجاد شد و روز ایجاد سوختگی به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. سپس موش ها در گروه های تجربی ۱ تا ۳ به ترتیب به مدت ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه بوسیله ی تابش پلاسمای سرد گاز هلیوم به مدت یک هفته به صورت روزانه تحت تیمار قرار گرفتند. پس از پایان دوره ی تیمار از بستر زخم نمونه برداری شد. نمونه ها در بوئن تثبیت شدند و پس از قالب گیری با پارافین، برش هایی به ضخامت ۵ میکرون از آن ها تهیه شد و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. بهبود زخم از طریق بررسی پارامترهایی از قبیل ضخامت لایه شاخی پوست، اپیدرم، درم، هیپودرم، تعداد فولیکول های مو و قطر و تعداد عروق خونی در پوست ارزیابی گردید. مطالعه ماکروسکوپی محل زخم نشان داد که تیمار موش ها با پلاسمای سرد موجب کاهش قطر منطقه سوخته شده است. همچنین بررسی ضخامت لایه های پوستی (لایه های شاخی، اپیدرم، درم و هیپودرم) در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل سوختگی بصورت معنی دار ($P < 0.001$) افزایش یافته است و نیز تعداد ($P < 0.001$) و قطر عروق پوستی ($P < 0.001$) نیز در مقایسه با گروه کنترل سوختگی بصورت معنی دار افزایش یافته است. مساحت زخم نیز در مقایسه با گروه کنترل سوختگی در روز هفتم بصورت معنی دار ($P < 0.001$) کاهش یافته است. نتایج نشان داد که تابش پلاسمای سرد گاز هلیوم در تمامی شاخص های ارزیابی ترمیم زخم موثر بوده و با القای آن در زمان سوختگی می توان به تسریع در بهبود ترمیم زخم کمک کرد.

کلیدواژه ها: پلاسمای سرد، سوختگی پوست، ترمیم زخم.

۱. مقدمه

سوختگی یکی از شایع‌ترین صدمات پوستی در سراسر جهان است و سالانه میلیون‌ها مورد در سراسر جهان اتفاق می‌افتد و ۱۸۰۰۰۰۰ مورد مرگ هر ساله در اثر سوختگی گزارش شده است [۱۷]. سوختگی به دلیل آسیب دیدگی پوست در اثر گرما، اشعه، برق یا مواد شیمیایی ایجاد می‌شود. سوختگی‌های سطحی یا سوختگی درجه یک معمولاً به صورت خود به خود درمان می‌شوند زیرا پوست پتانسیل ترمیم خود را دارد اما سوختگی‌های درجه ۲ تا درجه ۴ پیچیده هستند و ضایعات پوستی عمیق ایجاد می‌کنند. سوختگی‌های عمیق یا گسترده عوارض جدی مانند سپسیس ناشی از عفونت باکتریایی، شوک ناشی از هیپوولمی^۱ و اسکار پوستی به دلیل بهبود نادرست زخم را ایجاد می‌کنند [۱]. آسیب پوستی باعث مرگ سلول‌های پوستی می‌شود و منجر به از دست رفتن زیاد مایعات بدن می‌شود که بدن‌بال آن کمبود آب، عدم تعادل الکترولیت و نارسایی کلیوی و گردش خون رخ می‌دهد [۱۸]. یکی دیگر از تهدیدهای جدی برای زندگی بیماران سوختگی عفونت است. پوست سوخته به دلیل از بین رفتن محافظت توسط لایه‌های سالم پوست، از نظر باکتری‌ها و سایر عوامل بیماری‌زای بسیار مستعد است [۱۲]. هر یک از این عوارض می‌تواند کشنده باشد. بنابراین، درمان سریع آسیب‌های سوختگی با استفاده از یک روش مناسب برای جلوگیری از عوارض و نجات جان بیماران بسیار مهم است.

پزشکی پلاسمای سرد درمانی است که مبتنی بر استفاده از پلاسمای با فشار اتمسفری (پلاسمای سرد) است که توسط موسسات و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی سراسر جهان مورد بررسی و توسعه قرار گرفته است [۱]. پلاسمای سرد تولید شده در فشار اتمسفر از ذرات باردار، گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن و رادیکال‌های آزاد تشکیل شده است [۱]. از پلاسمای سرد در غیرفعال‌سازی باکتری‌ها [۱۰] و درمان سرطان در محیط آزمایشگاهی استفاده شده است [۱۳]، به همین ترتیب، در بافت‌های زنده نیز می‌توان از پلاسمای سرد استفاده کرد [۴] زیرا

دمای پلاسمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد بوده و آسیب بافتی ایجاد نمی‌شود [۱].

درمان زخم‌ها با پلاسمای توجه بسیاری از دانشمندان را جلب کرده است زیرا نوعی روش غیرتهاجمی، بدون درد و بی‌ضرر برای ضدعفونی کردن ضایعات بافتی (ناشی از زخم سوختگی‌ها و زخم‌های مزمن) در مقیاس بزرگ می‌باشد [۱۱]. علاوه بر این، پلاسمای سرد می‌تواند روند بهبود زخم را نیز کوتاه کند [۱۶]. پلاسمای سرد می‌تواند تولید مولکول‌های واکنشگر مانند نیتريت اکسید (NO)، گروه هیدروکسیل (OH) و اکسیژن اتمی (O) را در سلول‌های زنده القاء کند و این مولکول‌ها موجب تسريع در ترميم بافت می‌شوند بدون اینکه عوارضی برای بافت سالم داشته باشند (Kolb et al., ۲۰۰۸). بنابراین در این مطالعه به اثر درمانی پلاسمای سرد بر پوست سوخته در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI پرداخته شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. حیوان استفاده شده در این تحقیق

۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI با سن ۱۰ تا ۱۲ هفته و وزن ۲۷ تا ۲۸ گرم از انستیتو پاستور ایران، تهران خریداری شدند. در طول شبانه روز دمای اتاق در حدود 22 ± 2 تنظیم شد و سیستم روشنایی محیط بصورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد.

۲-۲. گروه بندی حیوانات و ایجاد زخم سوختگی در موش

موش‌ها در ۸ گروه دسته‌بندی شدند. گروه کنترل بدون سوختگی و تیمار تا پایان آزمایش نگهداری شدند. گروه کنترل سوختگی ابتدا دچار سوختگی شدند و تیماری را دریافت نکردند و پس از ۷ روز از گذشت سوختگی نمونه‌گیری شدند. گروه‌های شم ۱، ۲ و ۳ بدون سوختگی به ترتیب به مدت ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه تحت تاثیر تابش پلاسمای سرد قرار گرفتند و سپس نمونه‌گیری از آنها انجام شد. گروه‌های تجربی ۱ تا ۳ نیز پس از سوختگی به ترتیب به مدت ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه تحت تاثیر تابش پلاسمای سرد بصورت روزانه به مدت ۷ روز قرار گرفتند [۱۴]. برای

¹ hypovolemia

گردید و از غلظت‌های نزولی الکل به منظور آبدهی به بافت استفاده شد. سپس رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. در انتها لام‌ها توسط چسب آنتلان لامل‌گذاری شده و برای بررسی بافت شناسی میکروسکوپی آماده شدند. در این مرحله ضخامت لایه‌های شاخی، اپیدرم، درم، هیپودرم، تعداد و قطر فولیکول‌های مو، تعداد و قطر رگ‌های خونی در حداقل ۱۰ میدان دید در هر لام مورد بررسی قرار گرفت و ضخامت لایه‌ها و قطر رگ‌ها با استفاده از گراتیکول مدرج و تعداد رگ‌های درمی و فولیکول‌های مو توسط گراتیکول مشبک با بزرگنمایی ۱۰۰ (X1۰۰) شمارش شدند.

۲-۴. اندازه‌گیری مساحت زخم

در روز ایجاد سوختگی (روز صفر) مساحت زخم با استفاده از کولیس با دقت میکرومتر اندازه‌گیری شد و پس از پایان دوره تیمار با پلاسما نیز مساحت زخم در گروه‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نتایج در روز صفر و روز هفتم باهم مقایسه شد.

۲-۵. تحلیل آماری نتایج

ابتدا توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ بررسی شد سپس نتایج با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (One-Way Anova) و Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و $P > 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد و نیز نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار GraphPad Prism ۶ ترسیم شدند.

۳. نتایج

۳-۱. مطالعات ماکروسکوپی

نتایج نشان داد که تیمار سوختگی با پلاسما سرد به مدت ۶۰ ثانیه باعث شده است که سوختگی روند بهبود را نشان دهد و درمقایسه با گروه کنترل سوختگی که تیماری در آن انجام نشده است اندازه‌ی ضایعه در روز پنجم کوچک‌تر شده است و بهبود مشاهده می‌شود. شکل ۱ تفاوت اندازه‌ی

ایجاد سوختگی، موش‌ها با تزریق درون صفاقی مخلوط کتامین (۲ mg/kg) و زایلازین (۳ mg/kg) بی‌هوش شدند و از ناحیه شکم روی سطح میز قرار گرفتند و پس از تراشیدن موهای پشت، به کمک هویه اصلاح شده (جسم داغ)، سوختگی‌های نسبتاً عمیق و یکسان در برگیرنده دو لایه پوست بین دو کتف و زیر گردن با قطر ۸ mm ایجاد شد. تابش پلاسما سرد و ایجاد سوختگی در موش‌ها با رعایت قانون حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. روز ایجاد سوختگی در موش‌ها روز صفر در نظر گرفته شد و از دستگاه پلاسما جت با منبع گاز هلیوم برای تولید پلاسما سرد استفاده شد.

جت پلاسما (ساخت شرکت پارلا پلاسما) شامل یک لوله کوآرتز (ID: 2 mm و OD: 4 mm) به عنوان عایق نازل بود. سیم مس به عنوان الکترود در اطراف لوله شیشه‌ای با عرض ۱۰ میلی متر به عنوان نازل پیچیده شده بود. فاصله بین نوک نازل و الکترود ۱۰ میلی متر بود. انرژی الکترود توسط یک منبع تغذیه ولتاژ بالا تامین شد. ولتاژ اعمال شده، فرکانس تکرار^۱ و نسبت کار^۲ به ترتیب ۸ کیلوولت، ۲۰ کیلو هرتز و ۱۵٪ بود. گاز مورد استفاده برای دستگاه پلاسما هلیوم (He) خالص (۹۹/۹۹٪) با سرعت جریان گاز ۲ لیتر در دقیقه بود. فاصله از نازل تا سطح زخم ۲۰ میلی متر تنظیم شد.

۲-۳. مطالعات بافت شناسی

بافت‌ها درون محلول فیکساتور بوئن به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. به منظور آنگیری، بافت‌ها چندین مرحله و هر مرحله به مدت ۱ ساعت در غلظت‌های صعودی الکل انکوبه شدند. سپس شفاف سازی بافت توسط زایلن در دو مرحله و هر مرحله به مدت ۱ ساعت انجام شد. سپس منظور پارافین دهی در دو مرحله به مدت ۲ و ۴ ساعت انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم، برش‌های به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. برای رنگ آمیزی در دو مرحله به مدت ۵ دقیقه با استفاده از زایلن پارافین زدایی صورت گرفت. سپس زایلن با استفاده از الکل مطلق خارج

^۱ repetition frequency

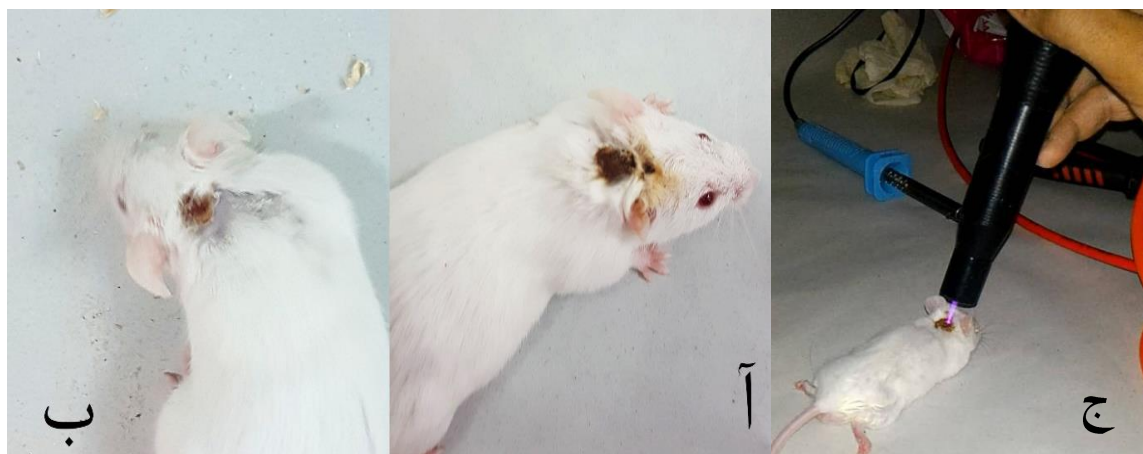
^۲ duty rati

کامل از بین رفته و مشاهده نمی‌شود. در گروه های شم ۱ تا ۳ (گروه‌های بدون سوختگی) مشاهده شد تابش پلاسما در مدت زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه هیچ‌گونه آسیب فیزیکی به بافت وارد نکرده است. در نمونه‌هایی که بعد از آسیب سوختگی، توسط پلاسما تیمار شدند با وجود اینکه لایه‌های پنج گانه اپیدرم مشخص نبود اما چسبندگی بین سلولی بیشتر شده است و در بعضی از موارد در لایه هیپودرم نمونه‌های مذکور، رگ‌های خونی با فراوانی بیشتری نسبت به نمونه سالم مشاهده شد.

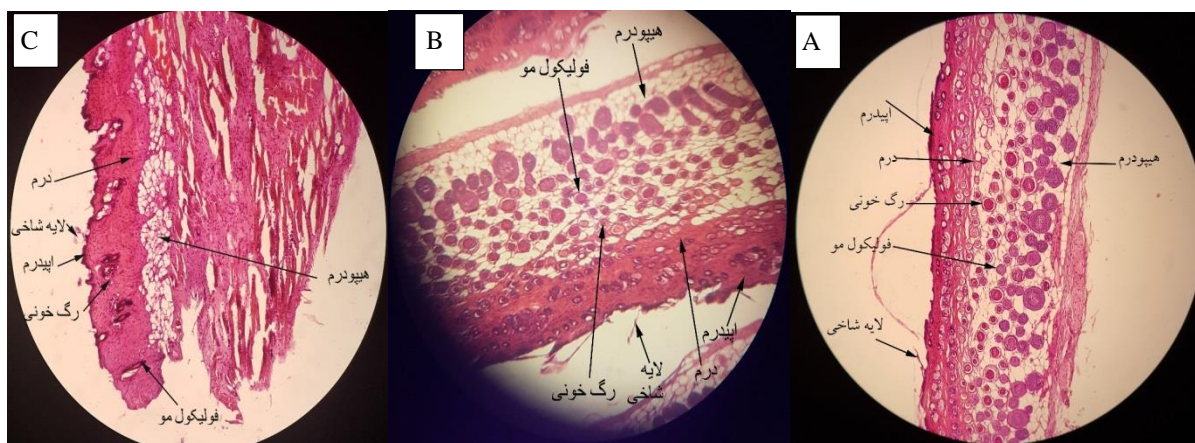
ضایعه‌ی سوختگی را در گروه تجربی ۲ (ب) و گروه کنترل سوختگی (آ) نشان می‌دهد.

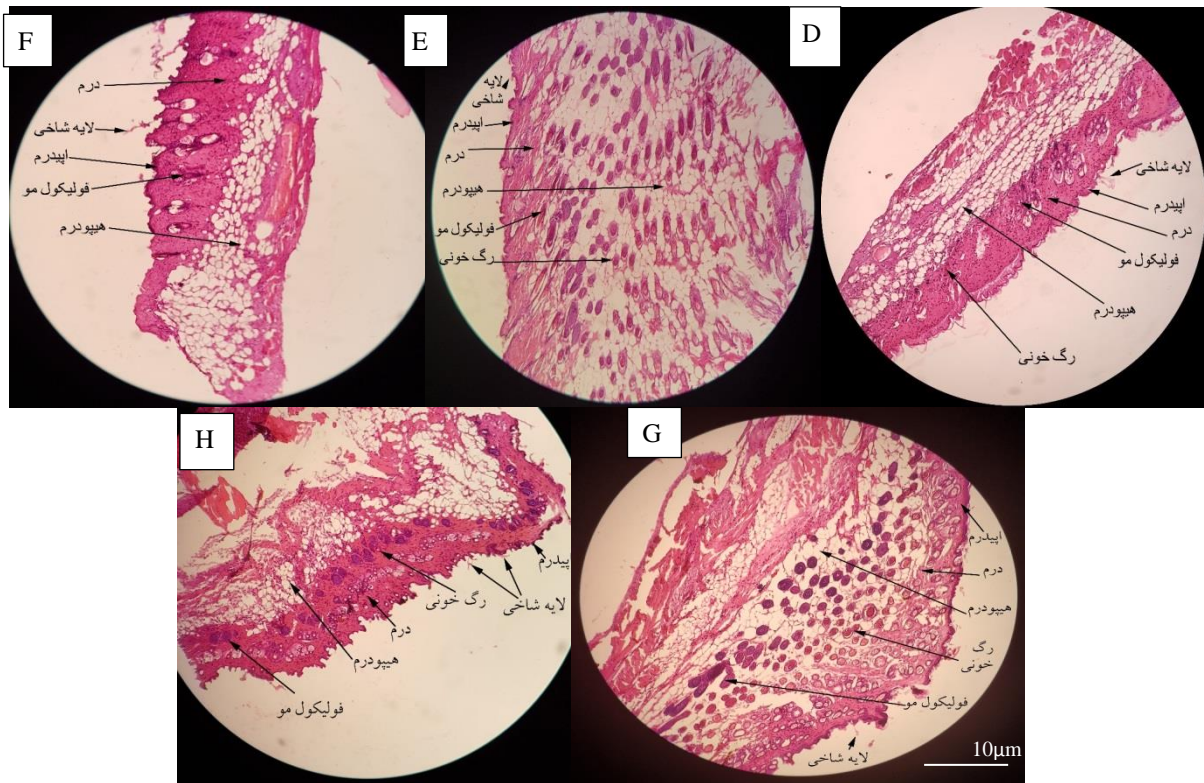
۲-۳. مطالعات بافت شناسی

در بافت کنترل سالم تمام لایه‌های اصلی پوست متشکل از اپیدرم و درم و هیپودرم به طور واضح مشخص است و لایه‌های پنج گانه اپیدرم نیز قابل مشاهده است همچنین فولیکول‌های مو و رگ‌های خونی و غدد چربی قابل شناسایی و شمارش هستند. در بافت کنترل سوختگی، لایه اپیدرم به شدت نازک‌تر شده و حتی در بعضی از نمونه‌ها اپیدرم به طور



شکل ۱. آ: گروه کنترل سوختگی بدون تیمار با پلاسما، ب: گروه تجربی ۲ تیمار با پلاسما سرد به مدت ۶۰ ثانیه. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود اندازه‌ی ضایعه‌ی سوختگی در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه کنترل سوختگی کوچک‌تر شده است. (ج) گروه تجربی ۱ در روز صفر که در حال تیمار با پلاسمای سرد می‌باشد.



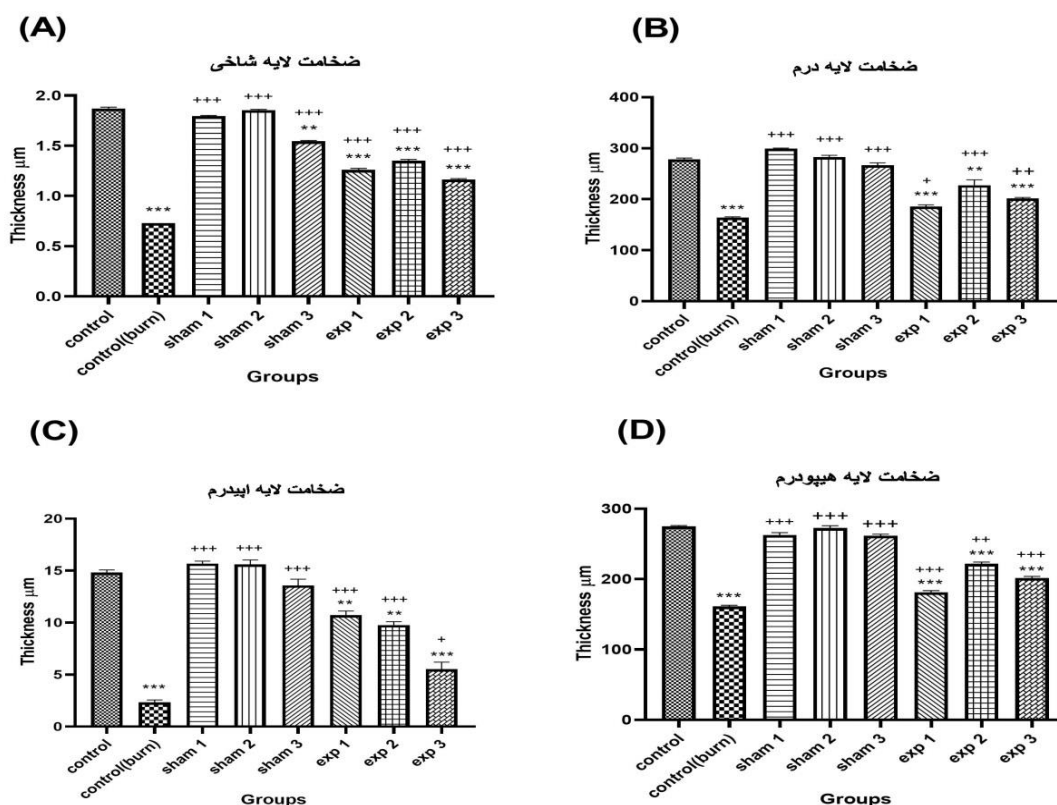


شکل ۲. مطالعات میکروسکوپی بافت پوست در گروه های کنترل سالم (A)، کنترل سوختگی (B)، گروه های شم (C تا E) و تجربی (F تا H). همانطور که در شکل مشاهده می شود در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بافت پوست به شدت دچار آسیب شده است. در گروه های شم که با پلاسمای سرد تیمار شده اند تغییرات بافتی در بافت پوست دیده نمی شود اما در گروه های تجربی که پس از سوختگی با پلاسمای سرد تیمار شده اند مشاهده می شود که در گروه های تجربی ۲ (G) و ۳ (H) شمای بافت پوست به حالت طبیعی بازگشته است (بزرگنمایی X۱۰۰).

ثانیه تیمار شدند، ضخامت لایه ی شاخی بصورت معنی دار ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل سوختگی افزایش یافته است (شکل ۳-A). همچنین ضخامت لایه ی درم، در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه کنترل سوختگی بصورت معنی دار ($p < 0.001$) افزایش یافته است (شکل ۳-B) اگرچه در گروه های تجربی ۱ و ۳ نیز افزایش ضخامت دیده می شود ($p < 0.05$ برای گروه تجربی ۱ و $p < 0.01$ برای گروه تجربی ۳). ضخامت لایه های اپی درم و هیپودرم نیز در گروه های تجربی ۱ تا ۳ نسبت به گروه کنترل سوختگی افزایش معنی دار ($p < 0.001$) را نشان می دهد (شکل ۳-C و D).

۳-۳. اثر سوختگی و پلاسمای سرد بر ضخامت لایه های پوستی

ضخامت لایه های پوستی در کلیه گروه ها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ضخامت لایه های پوستی در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی دار ($p < 0.001$) کاهش یافته است. همچنین در گروه های شم در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت معنی داری در ضخامت لایه های پوستی مشاهده نشد که نشان می دهد پلاسمای سرد موجب آسیب به بافت پوست نمی شود. همچنین نتایج نشان داد که در گروه های تجربی ۱ تا ۳ که با پلاسمای سرد به ترتیب به مدت ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰



شکل ۳. مقایسه ضخامت لایه های پوستی (لایه ی شاخی (A)، لایه ی درم (B)، لایه اپیدرم (C) و لایه ی هیپودرم (D)) در کلیه گروه‌ها. ضخامت لایه های پوستی در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی دار ($p < 0.001$) کاهش یافته است. در گروه های شام در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت معنی داری در ضخامت لایه های پوستی مشاهده نشد. از طرف دیگر نتایج نشان داد که در گروه های با آسیب سوختگی تیمار شده با پلاسمای سرد در مدت زمان های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه در مقایسه با گروه کنترل سوختگی ضخامت لایه های پوستی بصورت معنی دار افزایش یافته است ($p < 0.001$ ***، $p < 0.01$ ** و $p < 0.05$ * برای مقایسه ی گروه کنترل سالم با سایر گروه‌ها، $p < 0.001$ +++، $p < 0.01$ ++ و $p < 0.05$ + برای مقایسه ی گروه کنترل سوختگی با سایر گروه‌ها)

مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی دار ($P > 0.001$) کاهش یافته است و تیمار با پلاسمای سرد در گروه های تجربی موجب افزایش معنی دار در تعداد رگ های خونی و قطر رگ ها در مقایسه با گروه کنترل سوختگی شده است.

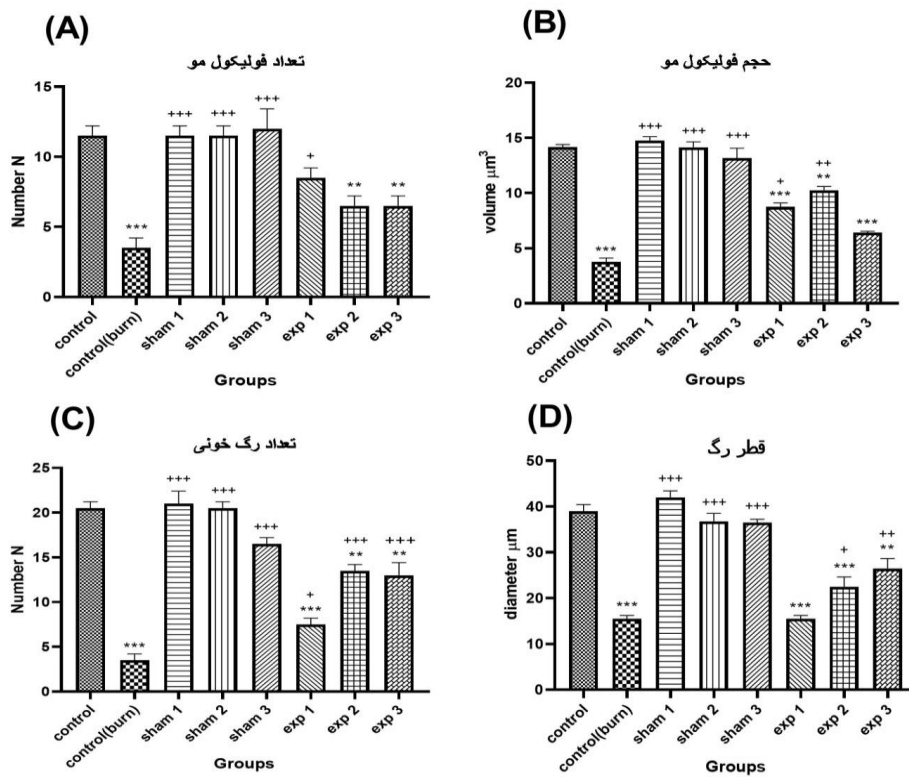
۳-۵. اثر سوختگی و پلاسمای سرد بر مساحت زخم

شکل ۵ نشان داد که مساحت زخم در روز هفتم در مقایسه با روز صفر به مراتب در تمام گروه‌ها کاهش یافته است ($p > 0.001$) اما در گروه های تجربی که با پلاسمای سرد تیمار شده اند در مقایسه با گروه کنترل سوختگی در روز هفتم بصورت معنی دار ($p > 0.001$) کاهش یافته است. همچنین نتایج نشان داد که در گروه تجربی ۲ که با پلاسمای

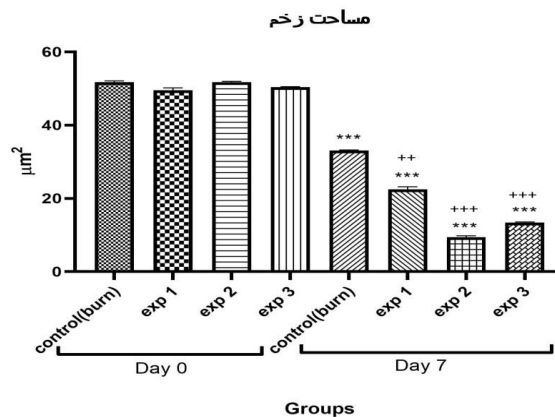
۳-۴. اثر سوختگی و پلاسمای سرد بر سایر پارامترهای بافت پوست

نتایج شکل ۴ (نمودارهای A و B) نشان داد که تعداد فولیکول مو و حجم آن در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی دار ($P > 0.001$) کاهش یافته است. در گروه های شام نتایج نشان داد که پلاسمای سرد تغییر معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل سالم در تعداد فولیکول مو و حجم آن ایجاد نکرده است. از طرف دیگر نتایج نشان داد که در گروه های تجربی، تیمار با پلاسمای سرد باعث افزایش معنی دار در تعداد فولیکول مو و حجم آن در مقایسه با گروه کنترل سوختگی شده است. همچنین نتایج شکل ۴ (نمودارهای C و D) نشان داد که تعداد رگ خونی و قطر آن در گروه کنترل سوختگی در

سرد به مدت ۶۰ ثانیه تیمار شدند مساحت زخم از سایر گروه ها کمتر است.



شکل ۴. مقایسه‌ی تعداد فولیکول‌های مو (A) و حجم آنها (B)، تعداد رگ خونی و قطر آنها در در کلیه گروه‌ها. تعداد فولیکول مو و حجم آن در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی دار ($P < 0.001$) کاهش یافت. همچنین در گروه‌های تجربی، تیمار با پلاسمای سرد باعث افزایش معنی دار در تعداد فولیکول مو و حجم آن در مقایسه با گروه کنترل سوختگی شد. تعداد رگ خونی و قطر آن در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی دار ($P < 0.001$) کاهش یافته است و تیمار با پلاسمای سرد در گروه‌های تجربی موجب افزایش معنی دار در تعداد رگ های خونی و قطر رگ‌ها در مقایسه با گروه کنترل سوختگی شده است ($p < 0.001$ ***، $p < 0.01$ ** و $p < 0.05$ * برای مقایسه‌ی گروه کنترل سالم با سایر گروه‌ها، $p < 0.001$ +++، $p < 0.01$ ++ و $p < 0.05$ + برای مقایسه‌ی گروه کنترل سوختگی با سایر گروه‌ها).



شکل ۵. مقایسه‌ی مساحت زخم در گروه کنترل سوختگی و گروه‌های تجربی در روزهای صفر و هفت. مساحت زخم در روز هفتم در مقایسه با روز صفر به مراتب در تمام گروه‌ها کاهش یافته است ($p < 0.001$) اما در گروه‌های تجربی که با پلاسمای سرد تیمار شده‌اند در مقایسه با گروه کنترل سوختگی در روز هفتم بصورت معنی دار ($p < 0.001$) کاهش یافته است ($p < 0.001$ *** برای مقایسه‌ی گروه کنترل سالم با سایر گروه‌ها، $p < 0.01$ ++ و $p < 0.05$ + برای مقایسه‌ی گروه کنترل سوختگی با سایر گروه‌ها).

۴. بحث

ترمیم زخم سوختگی نوعی فرآیند پویا، پیچیده و تعاملی است و اگرچه ترمیم در سوختگی‌های سطحی به خودی خود صورت می‌گیرد اما روند آن کند بوده و ممکن است عوارض متعددی از جمله ایجاد عفونت و شکل‌گیری اسکار را در پی داشته باشد [۶]. چگونگی نقش پلاسمای سرد و عوامل یونی آن در روند بهبودی زخم سوختگی کاملاً مشخص نشده است اما تاکنون تحقیقات متعددی مبنی بر تاثیر مثبت این نوع درمان بر روند ترمیم زخم انجام شده است. در این مطالعه از دیدگاه هیستوپاتولوژیک، اثر ترمیمی پلاسمای سرد گاز هلیوم در سوختگی در موش آزمایشگاهی نژاد NMRI مورد بررسی قرار گرفته است.

فرآیند ترمیم زخم با فاز التهاب (از بین بردن باکتری‌ها) شروع می‌شود و با فاز تکثیر (آنژیوژنز، ساخته شدن کلاژن، تشکیل بافت اپی تلیال و کاهش اندازه زخم) ادامه می‌یابد و با از بین رفتن زخم به پایان می‌رسد [۱۶].

به عنوان حالت چهارم ماده، پلاسمای زمانی که با هوای آزاد تماس پیدا می‌کند توانایی تولید مولکول‌های واکنشی کنترل شده مانند اکسید نیتریک (NO) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) را دارد (20) و هنگامی که با محلول‌های آبی برخورد می‌کند توانایی تولید رادیکال‌های OH و هیدروژن پراکسید (H₂O₂) را دارد. Ngo Thi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که پلاسمای سرد با تولید سیگنال‌های ROS/RNS موجب تسهیل رگ‌زایی و تولید بافت اپیتلیال در پوست می‌شود [۸]. در این تحقیق نیز مشاهده شد که تیمار موش‌ها با سوختگی با پلاسمای سرد موجب افزایش تعداد عروق و نیز قطر آنها می‌شود.

نتایج نشان داد که در گروه‌های تجربی ۱ تا ۳ که با پلاسمای سرد به ترتیب به مدت ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه تیمار شدند، ضخامت لایه‌ی شاخی بصورت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سوختگی افزایش یافته است. همچنین ضخامت لایه‌ی درم، در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه کنترل سوختگی بصورت معنی‌دار ($p < 0.001$) افزایش یافته است اگرچه در گروه‌های تجربی ۱ و ۳ نیز افزایش ضخامت به میزان کمتر دیده می‌شود. ضخامت لایه‌های

اپی‌درم و هیپودرم نیز در گروه‌های تجربی ۱ تا ۳ نسبت به گروه کنترل سوختگی افزایش معنی‌دار را نشان می‌دهد. از طرف دیگر نتایج نشان داد که در گروه‌های تجربی، تیمار با پلاسمای سرد باعث افزایش معنی‌دار در تعداد فولیکول مو و حجم آن در مقایسه با گروه کنترل سوختگی شده است. همچنین نتایج نشان داد که تعداد رگ خونی و قطر آن در گروه کنترل سوختگی در مقایسه با گروه کنترل سالم بصورت معنی‌دار ($P < 0.001$) کاهش یافته است و تیمار با پلاسمای سرد در گروه‌های تجربی موجب افزایش معنی‌دار در تعداد رگ‌های خونی و قطر رگ‌ها در مقایسه با گروه کنترل سوختگی شده است.

در این تحقیق مشاهده شد که در روز هفتم پس از تیمار با پلاسمای سرد در مقایسه با گروه کنترل سوختگی مساحت زخم بصورت معنی‌دار کاهش یافت که نشان از اثر مثبت پلاسمای سرد در بهبود زخم می‌باشد همچنین مشاهده شد که تعداد رگ‌های خونی و قطر آنها در گروه‌های تجربی پس از تیمار با پلاسمای سرد بصورت معنی‌دار افزایش یافته است که نشان می‌دهد تیمار با پلاسمای سرد موجب القاء رگ‌زایی می‌شود. علاوه بر این نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار با پلاسمای سرد در مقایسه با گروه کنترل سوختگی باعث افزایش ضخامت لایه‌های پوستی شده است که به روند بهبود و ترمیم زخم کمک می‌کنند.

از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که پلاسمای سرد بدون آسیب به بافت‌های اطراف زخم، موجب کمک به بهبود و تسریع ترمیم زخم می‌شود Brun و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که پلاسمای سرد بر روی بافت اطراف اثر منفی ندارد و موجب آسیب به این سلول‌ها نمی‌شود [۲]. در پژوهشی که برای ترمیم زخم از پلاسمای سرد فشار اتمسفری استفاده شد، مشاهده گردید که دوزهای مناسب از پلاسمای سرد می‌تواند باکتری‌های دور زخم را غیر فعال کند و فعال‌سازی فیبروبلاست در بافت زخم و در نهایت بهبود زخم را منجر می‌شود. در حالی که اگر دوز پلاسمای بیشتر باشد باعث سرکوب بهبودی زخم به علت مرگ سلول توسط آپوپتوز و یا نکروز می‌شود (Xu et al., 2015). در تحقیقات دیگر که دانشجویان دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات

- Moreno-Tapia, J. A. (2017). Treatment in the healing of burns with a cold plasma source. *International journal of burns and trauma*, 7(7), 142.
- [2] Brun, P., Vono, M., Venier, P., Tarricone, E., Deligianni, V., Martines, Cardin, R. (2012). Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma. *PLoS one*, 7(3), e33245.
- [3] Fathollah, S., Mirpour, S., Mansouri, P., Dehpour, A. R., Ghoranneviss, M., Rahimi, N., Chalangari, K. M. (2016). Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats. *Scientific reports*, 6, 19144.
- [4] Hung, Y.-W., Lee, L.-T., Peng, Y.-C., Chang, C.-T., Wong, Y.-K., & Tung, K.-C. (2016). Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: An animal study. *Journal of the Chinese Medical Association*, 79(6), 320-328.
- [5] Ishijima, T., Hotta, H., Sugai, H., & Sato, M. (2007). Multibubble plasma production and solvent decomposition in water by slot-excited microwave discharge. *Applied Physics Letters*, 91(12), 121501.
- [6] Kallioniemi, P. (2010). Effect of plasminogen on wound healing in mice.
- [7] Kolb, J. F., Mohamed, A.-A. H., Price, R. O., Swanson, R. J., Bowman, A., Chiavarini, R., . . . Schoenbach, K. (2008). Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Applied Physics Letters*, 92(24), 241501.
- [8] Ngo Thi, M. H., Shao, P. L., Liao, J. D., Lin, C. C. K., & Yip, H. K. (2014). Enhancement of angiogenesis and epithelialization processes in mice with burn wounds through ROS/RNS signals generated by non-thermal N₂/Ar micro-plasma. *Plasma Processes and Polymers*, 11(11), 1076-1088.

برروی تاثیر پلاسمای سرد گاز هلیوم بر روی ترمیم زخم پای دیابتی انجام دادند مشاهده شد که سه روز پس از درمان با پلاسمای سرد، نشانه‌های بهبودی دیده می‌شود و درمان با این روش سبب تکثیر سلولی و رشد دوباره‌ی اپیدرم و ایجاد لایه‌ی اپیدرمی و همچنین تشکیل بافت دانه‌دار و نیز لایه کراتین می‌گردد. Sara Fathollah, 1393 و همکاران تاثیر پلاسمای سرد اتمسفری را برروی عفونت‌های زخمی بر روی موش صحرایی بررسی کردند، نتایج به دست آمده نشان دادند که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند استفیلوکوکوس و سودوموناس آئروژینوزا از بین رفتند و به علاوه تسریع در بهبودی این زخم‌ها نیز مشاهده شد [۹]. در این مطالعه مشاهده شد که تابش پلاسمای سرد موجب تسریع در ترمیم زخم شود اما این مطالعه صرفاً مطالعه‌ی *In vivo* بوده و مطالعه‌ی مولکولی به منظور بررسی فاکتورهای التهابی و سیتوکین‌ها انجام نشده است و توصیه می‌شود در تحقیق دیگری علاوه بر مطالعات *In vivo*، مطالعات مولکولی نیز انجام شود.

۵. نتیجه‌گیری

بطورکلی نتایج نشان می‌دهد که تیمار سوختگی با پلاسمای سرد به دلیل کاهش تعداد باکتری‌ها در محل زخم و نیز به دلیل تحریک سلول‌ها به تقسیم و نیز تحریک رگ‌زایی موجب تسریع در بهبود زخم پس از سوختگی می‌شود و بنابراین با توجه به این پلاسمای سرد به بافت اطراف سوختگی آسیب نمی‌رساند به عنوان روشی مناسب برای تسریع بهبود سوختگی و زخم ناشی از آن و نیز تمیز نگه داشتن محل زخم توصیه می‌شود.

۶. سپاسگزاری

این تحقیق در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد و توسط این دانشگاه حمایت گردید.

منابع

- [1] Betancourt-Ángeles, M., Peña-Eguiluz, R., López-Callejas, R., Domínguez-Cadena, N. A., Mercado-Cabrera, A., Muñoz-Infante,

- [9] Pei, X., Lu, X., Liu, J., Liu, D., Yang, Y., Ostrikov, K., Pan, Y. (2012). Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(16), 165205.
- [10] Pignata, C., D'angelo, D., Fea, E., & Gilli, G. (2017). A review on microbiological decontamination of fresh produce with nonthermal plasma. *Journal of applied microbiology*, 122(6), 1438-1455.
- [11] Pompl, R., Jamitzky, F., Shimizu, T., Steffes, B., Bunk, W., Schmidt, H.-U., Stark, R. W. (2009). The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. *New Journal of Physics*, 11(11), 115023.
- [12] Rafla, K., & Tredget, E. E. (2011). Infection control in the burn unit. *Burns*, 37(1), 5-15.
- [13] Ratovitski, E. A., Cheng, X., Yan, D., Sherman, J. H., Canady, J., Trink, B., & Keidar, M. (2014). Anti-cancer therapies of 21st century: novel approach to treat human cancers using cold atmospheric plasma. *Plasma Processes and Polymers*, 11(12), 1128-1137.
- [14] Sara Fathollah, S. M. (1393). Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats
- [15] Azad university science and research branch.
- [16] Tipa, R. S., & Kroesen, G. M. (2011). Plasma-stimulated wound healing. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 39(11), 2978-2979.
- [17] WHO. (2018). Burns. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns#>.
- [18] Williams, F. N., Herndon, D. N., Hawkins, H. K., Lee, J. O., Cox, R. A., Kulp, G. A., . . . Jeschke, M. G. (2009). The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. *Critical care*, 13(6), R183.
- [19] Xu, G. M., Shi, X. M., Cai, J. F., Chen, S. L., Li, P., Yao, C. W., Zhang, G. J. (2015). Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice. *Wound Repair and Regeneration*, 23(6), 878-884.
- [20] Yonemori, S., Nakagawa, Y., Ono, R., & Oda, T. (2012). Measurement of OH density and air-helium mixture ratio in an atmospheric-pressure helium plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(22), 225202.
- [21]

Therapeutic effect of cold plasma on burnt skin in adult mice

Dorehlo Sh.¹, Mohamadi Gorji S.^{2*}, Hayati Rodbari N.³

¹ Biology Department, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran

² Biology Department, Islamic Azad University of Sari, Sari, Iran

³ Biology Department, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran

* Email: siminmohamadigorgi@yahoo.com

Received: October 2019

Accepted: December 2020

Abstract

Burn wounds significantly heal the patient and these wounds are prone to infection with electrical energy and scar formation. The use of CO₂ laser or nitrogen plasma along with the old methods of sterilization and whisper dressing to accelerate the process of blood clotting and wound healing. It may repair the natural process and be more effective than other treatments. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of cold plasma on heat burn wound on the skin of adult Syrian mice in vivo. 24 adult male mice were randomly divided into control, fuel control, sham and experimental groups. After anesthesia and under sterile conditions, a circular wound with a diameter of 8 mm was created on the back of the mice's neck through hot body contact and caused burns as a zero day. Mice in experimental groups 1 to 3 were then treated daily for 30, 60 and 120 seconds, respectively, by cold or plasma irradiation of helium gas for one week. At the end of the treatment period, the sample bed was tested. The samples were tagged in Bowen and after molding with paraffin, 5 micron thick sections were prepared and stained with hematoxylin and stained. Wound healing is achieved by examining parameters such as the thickness of the stratum corneum, epidermis, dermis, hypodermis, the number of hair follicles and the diameter and number of blood vessels in the skin. Macroscopic examination of the wound site showed that the team of mice with cold plasma reduced the diameter of the burned area. Also, the thickness of skin layers (horny layers, epidermis, dermis and hypodermis) in experimental groups increased significantly ($P < 0.001$) compared to the control group of fuel, as well as the number ($P < 0.001$) and diameter of vessels. Dermal ($P < 0.01$) was also increased compared to the control group of the fuel group. Wound area also decreased significantly ($p < 0.001$) compared to the control group of fuel on the seventh day. The results showed that cold plasma irradiation of helium gas is effective in all performance indicators and by inducing it during burns can help accelerate wound healing. Keywords: Cold Plasma, Burned Skin, Wound Healing.

Keywords: Cold Plasma, Burned Skin, Wound Healing.