

مطالعه تاثیر پلاسمای سرد آرگون در فشار اتمسفری بر افزایش سرعت انعقاد خون و التیام زخم تمام ضخامت پوست در موش‌های صحرایی

مهسا آل‌ابراهیم^{۱*}، الهام جنانی^۲، پژمان مرتضوی^۳

۱- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیک پلاسما، آموزشکده فنی و حرفه‌ای سما، واحد تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mahsa.alebrahim@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۶/۲۹ پذیرش نهایی: ۹۷/۱۰/۳۰)

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از پلاسمای سرد در فشار اتمسفری به عنوان یک استراتژی درمانی جدید و امیدبخش جهت توقف خونریزی و بهبود زخم‌های پوستی در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی اثر بافتی پاتولوژیکی پلاسمای آرگون سرد در فشار اتمسفری در بهبود زخم تمام ضخامت پوست و افزایش سرعت انعقاد خون در موش‌های صحرایی بود. بدین منظور ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ به دو گروه کنترل و درمان تقسیم شدند. تحت شرایط بیهوشی، زخم پوستی به قطر ۱۵ میلی‌متر در پشت موش‌ها ایجاد گردید و مدت زمان انعقاد خون اندازه‌گیری شد. در گروه درمان بلافاصله پس از ایجاد زخم، پوست موش‌ها یک بار و به مدت ۳۰ ثانیه تحت تابش پلاسما قرار گرفتند و همزمان مدت زمان انعقاد خون اندازه‌گیری گردید. سپس موش‌های گروه کنترل و تیمار به ترتیب در روزهای صفر، ۷ و ۲۱ پس از ایجاد زخم با اتر آسان‌کشی شدند. سپس زخم و پوست سالم اطراف آن جدا شد و پس از انجام رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی بافت‌شناسی قرار گرفت. تابش پلاسما سرعت انعقاد خون در زخم پوستی در شرایط درون‌تنی را افزایش داد. بر اساس یافته‌های آسیب‌شناسی بافتی، موش‌های گروه درمان با پلاسما، به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) روند بهتری را در التیام زخم تمام ضخامت پوستی نشان دادند. بنابراین پلاسمای سرد آرگون می‌تواند جهت افزایش سرعت انعقاد خون و بهبود روند ترمیم در زخم‌های پوستی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: انعقاد خون، بهبود زخم پوستی، پلاسمای آرگون سرد، موش صحرایی.

The effect of cold argon plasma in atmospheric pressure on increasing blood coagulation speed and full-thickness cutaneous wound healing in rats

Ale-Ebrahim, M.^{1*}, Janani E.², Mortazavi, P.³

1- Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- MSc Graduate in Plasma Physics, Sama Technical and Vocational Training College, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author's email: mahsa.Alebrahim@yahoo.com

(Received: 2017/9/20 Accepted: 2019/1/20)

Abstract

In recent years, cold plasma in atmospheric pressure is used as a promising new therapeutic strategy in medicine for cessation of bleeding and skin wound healing. The aim of the present study was to evaluate the histopathological effect of cold argon plasma in atmospheric pressure on full-thickness cutaneous wound healing and increasing the speed of blood coagulation in rats. Forty-eight mature male rats were divided into two control and treatment groups. Under anesthesia, a 15 mm diameter skin wound was created on the back of the rats and blood coagulation time was measured. In treatment group immediately after the injury, the skin of rats was radiated by plasma once for 30 seconds and simultaneously blood coagulation time was measured. Then, control and treatment group rats were euthanized by ether at 0, 7 and 21 days after the injury respectively. The wound and surrounding healthy skin were removed and after hematoxylin-eosine staining, histopathological examination with light microscope was performed. Plasma radiation increased the speed of blood coagulation in skin wounds under *in vivo* conditions. Based on histopathological results, the process of full thickness cutaneous wound healing was significantly ($p<0.05$) better in plasma treated rats. Therefore, cold argon plasma can be used to increase the speed of blood coagulation and improve cutaneous wound healing.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Blood coagulation, Cutaneous wound healing, Cold argon plasma, Rat.

Á
Á
Á
Á

The effect of cold argon plasma in atmospheric pressure on increasing blood coagulation speed and full-thickness cutaneous wound healing in rats

Ale-Ebrahim, M.^{1*}, Janani E.², Mortazavi, P.³

1- Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- MSc Graduate in Plasma Physics, Sama Technical and Vocational Training College, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author's email: mahsa.Alebrahim@yahoo.com

(Received: 2017/9/20 Accepted: 2019/1/20)

Abstract

In recent years, cold plasma in atmospheric pressure is used as a promising new therapeutic strategy in medicine for cessation of bleeding and skin wound healing. The aim of the present study was to evaluate the histopathological effect of cold argon plasma in atmospheric pressure on full-thickness cutaneous wound healing and increasing the speed of blood coagulation in rats. Forty-eight mature male rats were divided into two control and treatment groups. Under anesthesia, a 15 mm diameter skin wound was created on the back of the rats and blood coagulation time was measured. In treatment group immediately after the injury, the skin of rats was radiated by plasma once for 30 seconds and simultaneously blood coagulation time was measured. Then, control and treatment group rats were euthanized by ether at 0, 7 and 21 days after the injury respectively. The wound and surrounding healthy skin were removed and after hematoxylin-eosine staining, histopathological examination with light microscope was performed. Plasma radiation increased the speed of blood coagulation in skin wounds under *in vivo* conditions. Based on histopathological results, the process of full thickness cutaneous wound healing was significantly ($p<0.05$) better in plasma treated rats. Therefore, cold argon plasma can be used to increase the speed of blood coagulation and improve cutaneous wound healing.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Blood coagulation, Cutaneous wound healing, Cold argon plasma, Rat.

مقدمه

در سال‌های گذشته از پلاسمای حرارتی در بسیاری از اعمال جراحی جهت ایجاد انعقاد خون و یا سوزاندن زخم‌ها استفاده می‌شده است، اما به دلیل ایجاد آسیب‌های شدید بافتی، پلاسمای حرارتی به مرور زمان جای خود را به پلاسمای سرد (غیرحرارتی) داد (Emmert *et al.*, 2013). با توجه به پیشرفت‌هایی که در زمینه دستگاه‌های تولیدکننده پلاسمای سرد در فشار اتمسفری صورت گرفته است، امروزه تیمار زخم‌ها با پلاسمای امکان‌پذیر شده و منجر به ایجاد رشته جدید و مستقلی در پزشکی به نام "پزشکی پلاسمای" شده است که یک رویکرد امیدبخش در بهبود زخم می‌باشد (Gravesb, 2014).

پلاسمای سرد که گاهی به عنوان شکل چهارم ماده نیز در نظر گرفته می‌شود، گازی یونیزه است که حاوی ترکیبات مختلف از جمله گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (reactive oxygen species; ROS)، نیتروژن واکنش‌پذیر (reactive nitrogen species; RNS)، میدان‌های الکتریکی، ذرات باردار و همچنین نور ماورای بنفش (ultraviolet; UV) می‌باشد (Kenda, 2011). به نظر می‌رسد که اثرات پلاسمای سرد در بهبود زخم، عمدتاً به دلیل فرایندهای اکسایشی-احیاء گونه‌های واکنش‌پذیر مذکور می‌باشد (Heinlin *et al.*, 2010). این ترکیبات به صورت کاملاً موضعی و در محل تابش پلاسمای تولید می‌شوند و به محتوای گونه‌های واکنش‌گر درون‌زاد که توسط سلول‌ها در محل زخم تولید می‌شود، اضافه می‌گردند و سپس با ماکرومولکول‌های زیستی واکنش داده و بر فرایندهای پیام‌رسانی سلولی، بیان ژن‌ها و پاسخ سیستم ایمنی تأثیر

می‌گذارند (Gravesb, 2014). مهم‌ترین گونه واکنش‌گر که توسط پلاسمای تولید می‌شود، نیتریک اکساید (nitric oxide; NO) می‌باشد. از جمله مکانیسم‌های مهم NO در فرایند بهبود زخم شامل اثرات ضدباکتریایی، تحریک فرایند بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها، فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی، متعادل‌سازی گردش خون کوچک از طریق اتساع عروق، تکثیر فیبروبلاست‌ها و اپیتلیال‌سازی می‌باشد (Fridman *et al.*, 2008). نتایج تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که حتی با یک بار تیمار زخم توسط پلاسمای، ضداالتهابی، ضدخارش، ضد میکروبی، تحریک بافتی، تحریک گردش خون موضعی و سایر اثرات درمانی مشاهده می‌شود که عمدتاً ناشی از عملکرد گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنش‌گر می‌باشد (Pompl *et al.*, 2006).

پلاسمای سرد معمولاً با استفاده از گاز آرگون یا هلیوم تولید می‌شود. از آنجا که گاز استفاده شده برای تولید پلاسمای سرد به آرامی یونیزه می‌شود، بنابراین یون‌ها به سرعت و در کسری از ثانیه در شرایط دمایی اتاق، سرد می‌شوند. اکثر دستگاه‌های تولیدکننده پلاسمای سرد، پلاسمای جت‌های نازک با قطر کمتر از ۱ میلی‌متر تولید می‌کنند که به صورت یک نور کم‌رنگ قابل مشاهده است (Emmert *et al.*, 2013).

ترمیم زخم از مراحل مختلفی تشکیل شده است که به‌طور خلاصه شامل مرحله توقف خونریزی (هموستازی)، مرحله التهاب، مرحله تکثیر شامل تکثیر فیبروبلاست‌ها، تشکیل عروق خونی جدید و اپیتلیزاسیون (تشکیل بافت پوششی) و در نهایت مرحله بلوغ و بازسازی شامل تجمع کلاژن و پروتئین‌های

ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. اولین مرحله جهت ترمیم زخم، توقف خونریزی است. زیرا ادامه یافتن خونریزی از بسته شدن زخم جلوگیری کرده و سبب تجمع باکتری‌ها در محل زخم می‌شود (Ghaderi and Afshar., 2013).

تحقیقاتی که تاکنون روی مدل‌های جانوری و انسانی و در محیط‌های درون‌تنی و بیرون‌تنی (*in vivo* and *in vitro*) انجام شده است، نشان می‌دهد که تابش پلاسما سرد می‌تواند سرعت انعقاد خون را افزایش دهد. تابش پلاسما حتی در افراد مبتلا به بیماری هموفیلی که دارای اختلال در انعقاد خون هستند، نیز می‌تواند تغییرات معنی‌داری را در فعال‌سازی پروتئین‌ها و فاکتورهای انعقاد خون ایجاد کرده و سبب افزایش سرعت انعقاد خون شود. پلاسما سرد این اثر را بدون هیچ‌گونه پختن زخم (wound cooking)، و فقط از طریق فعال کردن مکانیسم‌های طبیعی انعقاد خون ایجاد می‌کند (Heinlin, et al., 2010; Janani, 2013). یکی از مهم‌ترین مزیت‌های استفاده از پلاسما سرد در فشار اتمسفری این است که واکنش‌های آلرژیک یا سمی ایجاد نمی‌کند، همچنین بدون تماس، بدون درد، خود استریل‌کننده و غیرتهاجمی است و امکان تیمار سطوح غیرهمگن و حساس به حرارت را در بافت‌های زنده فراهم می‌کند. پلاسما همچنین امکان درمان نواحی التهابی دردناک و عفونت‌های پوستی را به صورت غیرتماسی فراهم می‌کند (Pompl et al., 2006). همچنین از آنجایی که پلاسما بسیار سریع و مؤثر به کوچک‌ترین منافذ و فضاهای درون بافت نفوذ می‌کند، در نتیجه سبب استریلیزه شدن زخم و از بین رفتن باکتری‌ها می‌شود و بر این اساس به نظر می‌رسد که

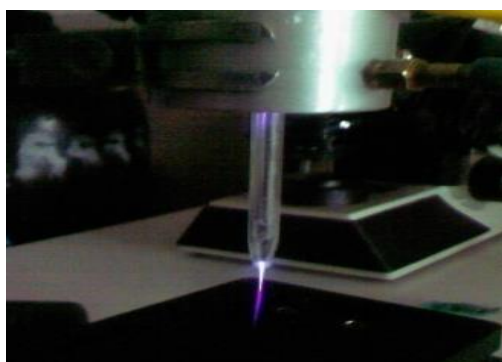
احتمالاً در آینده می‌تواند از قطع عضو ناشی از زخم‌های مزمن (مانند زخم پای دیابتی) یا سوختگی‌های وسیع جلوگیری کند (Fridman., 2008). در این ارتباط نتایج حاصل از تحقیقات هینلین و همکاران نشان داده است که تابش پلاسما سرد آرگون روی زخم پوستی، از ایجاد عفونت در زخم جلوگیری کرده و سبب بهبود اپیتلیزاسیون مجدد در زخم می‌گردد، درحالی که پوست اطراف زخم حالت طبیعی خود را حفظ می‌کند (Heinlin et al., 2013). نتایج تحقیق پامپل و همکاران نیز نشان داده است که تیمار کوتاه‌مدت پلاسما روی پوست انسان و حیوانات در شرایط درون‌تنی و بیرون‌تنی هیچ‌گونه آسیب میکروسکوپی در پوست ایجاد نمی‌کند (Pompl et al., 2006). همچنین، با توجه به این‌که اثرات مفید دستگاه پلاسما سرد آرگون در افزایش سرعت انعقاد قطره خون در شرایط *in vitro* و همچنین افزایش سرعت انعقاد خون در بافت کبد آسیب‌دیده در شرایط *in vivo* نشان داده شده است (Janani., 2013)، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثرات هیستوپاتولوژی پلاسما سرد آرگون در فشار اتمسفری در روند ترمیم زخم پوستی در موش‌های صحرایی و همچنین افزایش سرعت انعقاد خون در شرایط *in vivo* بود.

مواد و روش‌ها

- ویژگی‌های دستگاه تولید کننده پلاسما سرد آرگون در فشار اتمسفری: دستگاهی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است (شکل ۱)، دستگاه تولید پلاسما جت سرد آرگون در فشار اتمسفری می‌باشد که با شماره ۷۴۵۶۲ ثبت اختراع شده است. این دستگاه از

فلز نگه‌دارنده این مجموعه هم از جنس آلومینیوم می‌باشد. این فلز یک قسمت ورودی گاز دارد که فلومتر (جریان‌سنج) به آن متصل می‌شود. گاز آرگون با فشار ۵/۵-۱/۲ لیتر بر دقیقه وارد دستگاه شده و پلاسمای تولیدشده از لوله شیشه‌ای آن خارج می‌گردد. براساس آزمایش‌های انجام‌شده گاز آرگون با فشار ۲ لیتر بر دقیقه، پلاسمایی با طول بیشتر و با کیفیت بهتر تولید می‌کند (Janani., 2013). در بررسی حاضر این دستگاه با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۱/۱ کیلوولت و جریان ۰/۱ میلی‌آمپر مورد استفاده قرار گرفت.

یک لوله شیشه‌ای به طول ۵ سانتی‌متر و قطر خارجی ۸ میلی‌متر ساخته شده است. الکتروود داخل این لوله از جنس نیکل-کروم و به طول ۱۱ سانتی‌متر و قطر ۱ میلی‌متر می‌باشد. این الکتروود متحرک بوده و بنابراین می‌توان به نحوی آن را تنظیم کرد که پلاسمای بهترین کارایی را داشته باشد. در این دستگاه ۷ سانتی‌متر از طول الکتروود داخل لوله قرار دارد. قطر عایق دور الکتروود حدود ۴ میلی‌متر و جنس آن از پیرکس می‌باشد. الکتروود دوم از جنس پیرکس بوده و لایه نازکی به طول ۲ سانتی‌متر دور لوله شیشه‌ای آن پیچیده می‌شود تا پلاسمای کیفیت و طول بیشتری داشته باشد.



شکل ۱- دستگاه تولید پلاسمای سرد آرگون در فشار اتمسفری که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته است.

غذای کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. آزمایش برای گروه درمان و کنترل در شرایط کاملاً یکسان و با رعایت کامل موازین اخلاقی انجام گرفت.

- ارزیابی اثر پلاسمای سرد آرگون بر سرعت انعقاد خون زخم تمام ضخامت پوست در شرایط *in vivo* در این مرحله از مطالعه، موش‌های گروه کنترل با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) (ساخت شرکت آلفاسان هلند) بیهوش شدند. در حالت بیهوشی کامل موهای پشت

- حیوانات مورد مطالعه: جهت انجام این مطالعه تجربی در شرایط *in vivo*، ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) با محدوده وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و درمان (هر گروه شامل ۲۴ سر از موش‌های مذکور) تقسیم شدند. موش‌ها در اتاق حیوانات با درجه حرارت کنترل‌شده 23 ± 3 درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند و در طول دوره آزمایش آب و

زخم‌ها به همراه پوست سالم اطراف آن جدا شده و به منظور انجام بررسی‌های بافتی به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت گردید و پس از ایجاد برش‌های ۴ میکرونی به روش معمول هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی گردید. جهت درجه‌بندی پارامترهای موثر بر ترمیم زخم، در هر نمونه بافتی ۱۰ ناحیه به صورت تصادفی مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و میانگین هریک از پارامترهای ترمیم زخم شامل اپیتلیزاسیون، حضور یا عدم حضور سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای، حضور فیبروبلاست‌ها، نوزایش عروقی و تشکیل رشته‌های کلاژنی به عنوان یک امتیاز واحد نیمه‌کیفی (Beldon, 2010) در نظر گرفته شد (جدول‌های ۲ تا ۶).

یافته‌ها

- یافته‌های مربوط به اثر پلاسمای سرد بر سرعت انعقاد خون در زخم تمام ضخامت پوست در شرایط *in vivo* مطابق جدول ۱، تابش پلاسمای سرد آرگون بلافاصله پس از ایجاد زخم (روز صفر)، سبب کاهش معنی‌دار ($p=0/03$) مدت زمان لازم برای انعقاد خون در زخم گردید.

حیوانات در نزدیکی دم تراشیده شده، سپس بر روی پوست در ناحیه خاجی و در دو طرف ستون مهره‌ها با استفاده از پانچری با قطر ۱۵ میلی‌متر زخمی به عمق اپیدرم و هیپودرم ایجاد گردید و بلافاصله مدت زمان لازم برای انعقاد کامل خون و تشکیل لخته با کرنومتر ثبت گردید. سپس پانسمان خشک توسط نخ بخیه روی زخم تثبیت شد. در ادامه در گروه درمان نیز مشابه گروه کنترل، زخم ایجاد گردید ولی با این تفاوت که بلافاصله پس از ایجاد زخم، پوست موش‌ها، به مدت ۳۰ ثانیه تحت تابش یکنواخت پلاسمای سرد آرگون قرار گرفت و هم‌زمان با تابش پلاسمای سرد، مدت زمان انعقاد خون در آن‌ها ثبت گردید (جدول ۱)، سپس پانسمان خشک توسط نخ بخیه روی زخم تثبیت شد. لازم به ذکر است که در گروه‌های کنترل و درمان، روز ایجاد زخم، روز صفر در نظر گرفته شد و تابش پلاسمای سرد در گروه درمان، فقط یک بار و آن‌هم در روز صفر صورت گرفت.

- بررسی آسیب‌شناختی بافتی: در این مرحله جهت انجام بررسی‌های آسیب‌شناختی بافتی، موش‌های گروه کنترل و گروه درمان هر یک به سه زیرگروه مربوط به روزهای صفر، ۷ و ۲۱ (هر کدام حاوی ۸ سر موش) تقسیم شدند. این موش‌ها به ترتیب در روزهای صفر، ۷ و ۲۱ پس از ایجاد زخم با اتر آسان‌کشی شدند. سپس

جدول ۱- مقایسه میانگین مدت زمان انعقاد خون در زخم پوستی موش‌های صحرائی گروه کنترل و گروه درمان

گروه‌های آزمایش		شاخص
درمان	کنترل	
میانگین مدت زمان لازم جهت انعقاد خون در زخم	۰±۳۴۰/۹۹ ثانیه	۱۲/۰±۱۵/۴۱* ثانیه

*: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($p=0/03$)

روز ۲۱ پس از ایجاد زخم، سبب افزایش معنی دار ($p=0/046$) حضور فیبروبلاست‌ها، نوزایش عروقی و تشکیل رشته‌های کلاژن در گروه درمان در مقایسه با گروه کنترل شد، در حالی که حضور سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای به طور معنی‌داری ($p=0/048$) کاهش یافت (جدول ۲ تا ۶ و شکل‌های ۲ و ۳).

- یافته‌های آسیب‌شناختی در نمونه‌های پوست موش‌های گروه‌های کنترل و درمان: تابش پلاسمای سرد آرگون پس از ایجاد زخم، سبب افزایش معنی‌دار ($p=0/048$) اپیتلیزاسیون، نوزایش عروقی، حضور فیبروبلاست‌ها، حضور سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای و رسوب کلاژن در گروه درمان در روز ۷ در مقایسه با گروه کنترل گردید. همچنین تابش پلاسمای سرد در

جدول ۲- مقایسه ترمیم زخم بر اساس تشکیل بافت پوششی (به صورت نیمه کمی)

شاخص ترمیم زخم	امتیاز	گروه‌های آزمایش						
		کنترل			درمان			
		۰	۷	۲۱	۰	۷	۲۱	
-	ضخیم شدن لبه های برش							
+	مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰ درصد							
تشکیل بافت پوششی (اپیتلیزاسیون)	مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰ درصد	-	+	++++	-	++*	++++	
+++	پل زدن ناحیه برش							
++++	شاخی شدن							

* اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل روز ۷ ($p=0/048$).

جدول ۳- مقایسه ترمیم زخم بر اساس میزان حضور سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای (به صورت نیمه کمی)

شاخص	امتیاز	گروه های آزمایش					
		کنترل			درمان		
		۰	۷	۲۱	۰	۷	۲۱
-	عدم حضور						
+	خفیف (کمتر از ۲۵ درصد)						
حضور سلول‌های التهابی تک هسته‌ای	خفیف (بین ۲۵ تا ۵۰ درصد)	-	+	+++	-	++++*	+++ [#]
+++	متوسط (بین ۵۰ تا ۷۵ درصد)						
++++	برجسته (بیش از ۷۵ درصد)						

* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۷ ($p=0/043$) و [#]: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۲۱ ($p=0/048$).

جدول ۴- مقایسه ترمیم زخم بر اساس حضور فیروبلاست‌ها (به صورت نیمه کمی)

شاخص	امتیاز	گروه‌های آزمایش					
		کنترل			درمان		
		۰	۷	۲۱	۰	۷	۲۱
حضور فیروبلاست‌ها	-						
	+						
	++	-	+	+++	-	+++*	++++#
	+++						
	++++						

*: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۷ ($p=0/041$) و #: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۲۱ ($p=0/044$)

جدول ۵- مقایسه ترمیم زخم در بر اساس ایجاد عروق جدید (به صورت نیمه کمی)

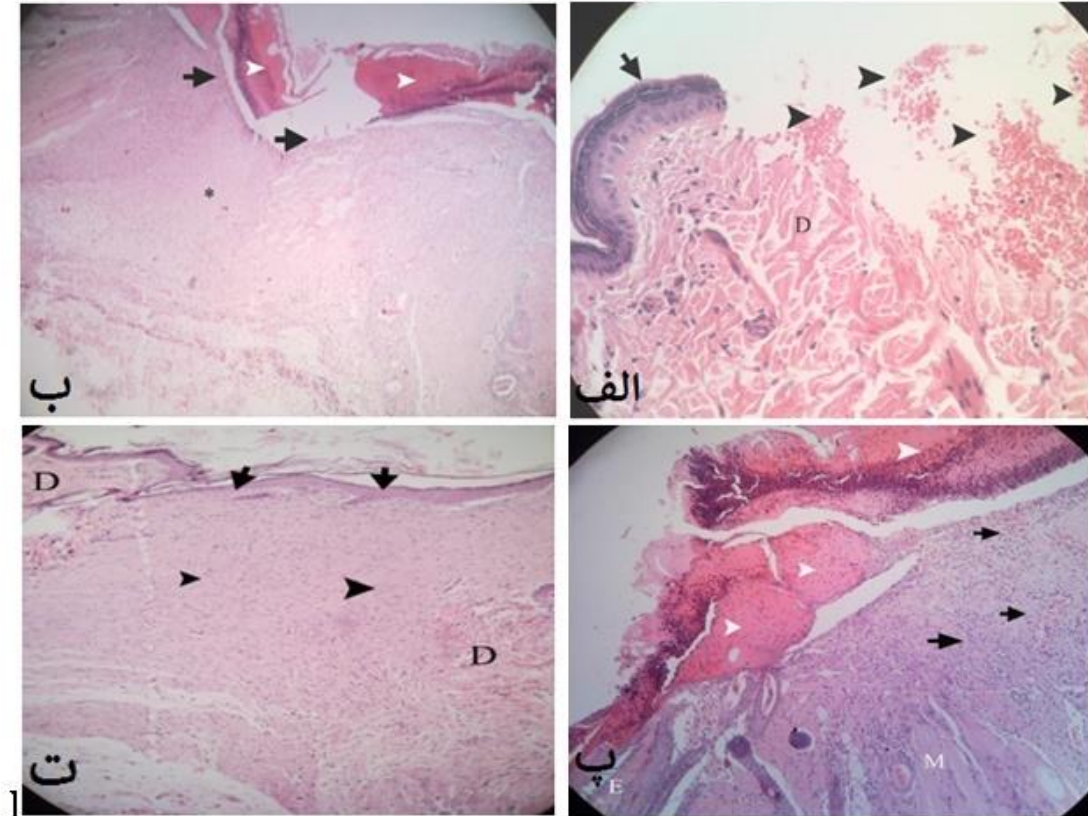
شاخص	امتیاز	گروه‌های آزمایش					
		کنترل			درمان		
		۰	۷	۲۱	۰	۷	۲۱
نوزایش عروقی	-						
	+						
	++	-	++	+++	-	++++*	++++#
	+++						
	++++						

*: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۷ ($p=0/044$) و #: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۲۱ ($p=0/041$)

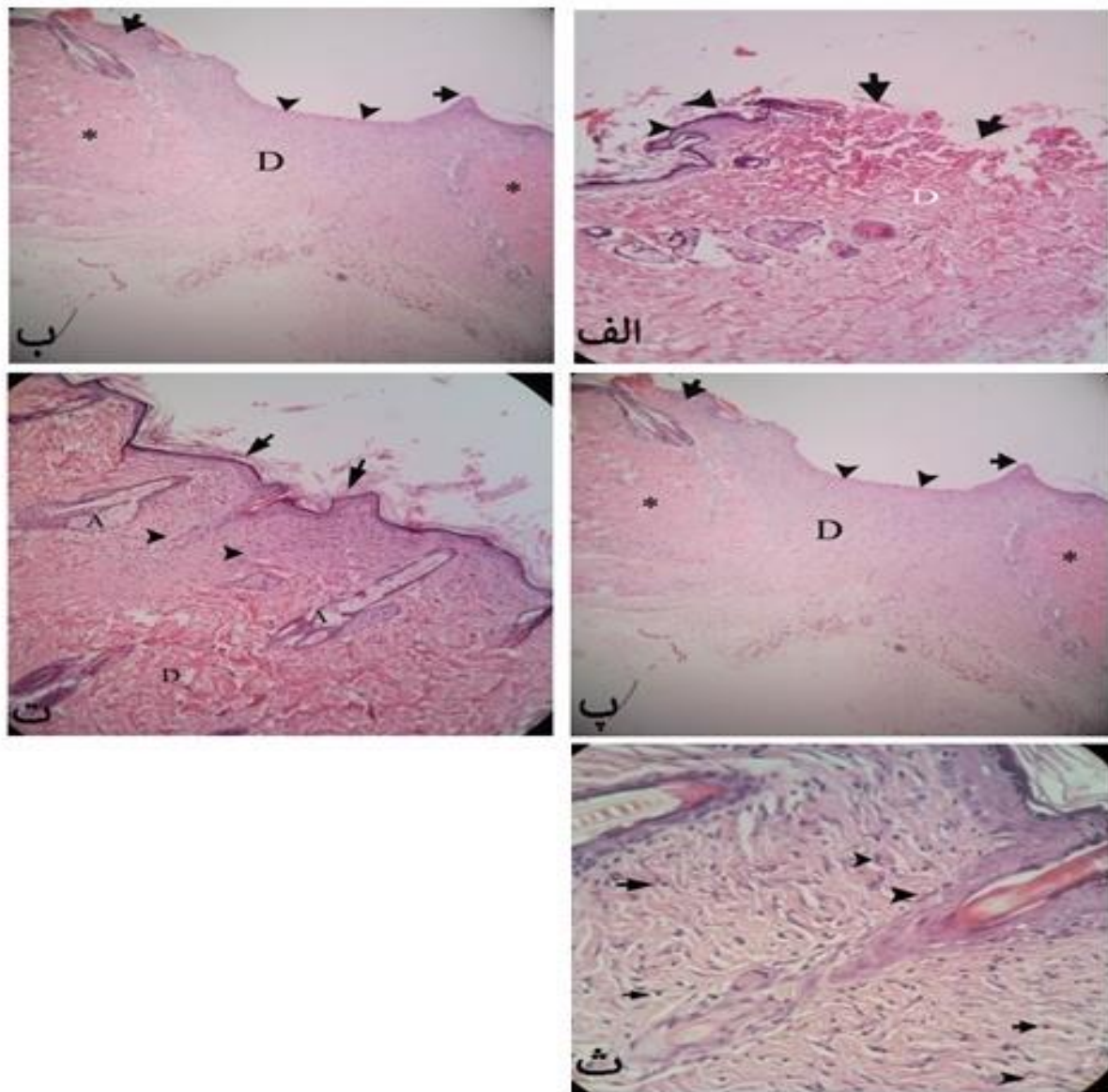
جدول ۶- مقایسه ترمیم زخم بر اساس حضور رشته‌های کلاژن (به صورت نیمه کمی)

شاخص	امتیاز	گروه‌های آزمایش					
		کنترل			درمان		
		۰	۷	۲۱	۰	۷	۲۱
حضور رشته‌های کلاژن	-						
	+						
	++	-	+	+++	-	+++*	++++#
	+++						
	++++						

*: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۷ ($p=0/041$) و #: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل روز ۲۱ ($p=0/043$)



شکل ۲- نمای ریزبینی از تغییرات بافت‌شناسی در زخم تمام ضخامت پوست موش‌های گروه کنترل در روزهای صفر، ۷ و ۲۱ پس از ایجاد زخم. الف- گروه کنترل روز صفر: اپیدرم سالم (پیکان) و درم سالم (D) و در محل برش از بین رفتن اپیدرم و درم و خونریزی زیاد (نوک پیکان) مشاهده می‌گردد (بزرگ‌نمایی $\times 160$). ب- گروه کنترل روز ۷: اپیدرم دو طرف لبه زخم هنوز به یکدیگر نرسیده است (نوک پیکان). در سطح اپیدرم مقدار زیادی لخته خون و واکنش التهابی چند هسته‌ای مشاهده می‌شود. در درم نیز بافت جوانه گوشتی (*) دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی $\times 64$). پ- گروه کنترل روز ۷: در کنار اپیدرم در حال ترمیم (E) میزان زیادی اکسودای چرکی (نوک پیکان) دیده می‌شود. در لایه درم واکنش التهابی و بافت جوانه‌ای (پیکان) مشاهده می‌شود. لایه عضلانی (M) دچار بی‌نظمی شده و به داخل لایه درم وارد شده است (بزرگ‌نمایی $\times 160$). ت- گروه کنترل روز ۲۱: اپیدرم کاملاً ترمیم یافته (پیکان) و درم نیز در حال التیام است (نوک پیکان) و در اطراف آن درم سالم (D) مشاهده می‌شود (بزرگ‌نمایی $\times 160$) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین).



شکل ۳- نمای ریزبینی از تغییرات بافت‌شناسی در زخم پوستی تمام ضخامت موش‌های گروه درمان تیمار شده با پلاسما در روزهای صفر، ۷ و ۲۱ پس از ایجاد زخم الف- گروه درمان صفر: محل برش به صورت از بین رفتن اپیدرم (پیکان) مشاهده می‌شود. قسمتی از اپیدرم سالم (نوک پیکان) و درم (D) نیز مشاهده می‌شود (بزرگ‌نمایی $\times 40$). ب- گروه درمان روز ۷: اپیدرم در حال ترمیم (پیکان) که هنوز کامل نشده است (نوک پیکان) و لایه درم (D) که در آن بافت التیامی دیده می‌شود و درم سالم در اطراف آن (*) قابل مشاهده است (بزرگ‌نمایی $\times 160$). پ- گروه درمان روز ۷: اپیدرم در حال ترمیم (پیکان) که همراه با اندکی خونریزی است (نوک پیکان سیاه). در لایه درم بافت التیامی همراه با تعداد زیادی از فیبروبلاست‌ها (نوک پیکان سفید) مشاهده می‌شود (بزرگ‌نمایی $\times 640$). ت- گروه درمان روز ۲۱: اپیدرم کاملاً ترمیم یافته (پیکان) و در قسمت درم (D) بافت همبند التیامی (نوک پیکان) دیده می‌شود. در ناحیه سالم کناری فولیکول‌های مو و غدد چربی (A) نیز دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی $\times 160$). ث- گروه درمان روز ۲۱: در قسمت درم ناحیه التیامی بسیار پر عروق بوده (نوک پیکان) و سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای نیز مشاهده می‌شود (پیکان). همچنین ضخامت رشته‌های کلاژن قابل توجه می‌باشد (بزرگ‌نمایی $\times 640$) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

بحث و نتیجه گیری

حرارت گاز استفاده شده یا به حرارت خون بستگی ندارد (Kalghatgi, 2007; Fridman, 2008). از طرف دیگر نتایج تحقیقات پیشین نشان می دهد که پلاسمای قادر به فعال سازی پلاکت ها و تشکیل رشته های فیبرین است. در شرایط فیزیولوژیکی، فعال سازی و تجمع پلاکت ها اولین مرحله از مسیر طبیعی انعقاد خون و تبدیل شدن فیبرینوژن به فیبرین آخرین مرحله ی انعقاد می باشد و پلاسمای به طور مؤثری روی هر دو مرحله تأثیر دارد (Pompl *et al.*, 2006; Kalghatgi, 2007). تحقیقات دیگر نشان می دهد که حتی تابش پلاسمای روی محلول فیبرینوژن نیز سبب تولید فیبرین می شود، در حالی که پلاسمای روی سایر محلول های پروتئینی از جمله آلبومین اثری ندارد. این امر نشان می دهد که پلاسمای سرد به طور انتخابی روی پروتئین هایی که در مکانیسم انعقاد طبیعی شرکت دارند، اثر می گذارد. بنابراین اثر آن روی پروتئین ها نه تنها مخرب نیست، بلکه کاملاً انتخابی و طبیعی می باشد (Fridman *et al.*, 2008).

بر اساس نتایج بافت شناسی مطالعه حاضر، یک بار تابش پلاسمای به مدت ۳۰ ثانیه، اثرات مفیدی در بهبود زخم پوستی موش ها نشان داد. فرایند ترمیم زخم با تکثیر و مهاجرت سلول های پوششی که از لبه های زخم منشأ می گیرند، آغاز می شود. در این تحقیق، ۷ روز پس از ایجاد زخم در هر دو گروه کنترل و درمان، لبه های زخم در حال نزدیک شدن به یکدیگر بودند ولی مهاجرت سلول های پوششی در گروه درمان تحت تابش پلاسمای به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. این امر نشان می دهد که پلاسمای روند اپیتلیزاسیون را تسریع می نماید. در توافق با این نتایج، یافته های تحقیقات سایر

التیام سریع زخم های جراحی و جلوگیری از عفونت های ثانویه اهمیت بسیار زیادی دارد (Beck, 2003). در مطالعه حاضر اثر التیامی پلاسمای سرد آرگون در روند ترمیم زخم پوستی تمام ضخامت در موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تابش پلاسمای به مدت ۳۰ ثانیه سبب افزایش سرعت انعقاد خون در زخم ایجاد شده در پوست موش ها در شرایط *in vivo* گردید. به طوری که میانگین مدت زمان انعقاد خون در پوست حیوانات گروه درمان تیمار شده با پلاسمای به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. یافته های بافت شناسی نیز در روز صفر پس از ایجاد جراحی، مقدار خونریزی بیشتری را در گروه کنترل نسبت به گروه درمان تحت تابش پلاسمای نشان داد. این نتایج در توافق با نتایج سایر محققین بود که اثر پلاسمای سرد را در افزایش سرعت انعقاد خون نشان داده اند (Robotis, 2003; Fridman *et al.*, 2008; Manner, 2008). هر چند جزئیات مسیر بیوشیمیایی اثر پلاسمای سرد بر انعقاد خون هنوز کاملاً مشخص نیست، ولی چندین مکانیسم احتمالی در این خصوص پیشنهاد شده است. بررسی های مورفولوژیکی لایه لخته از طریق میکروسکوپ الکترونی (SEM scanning electron microscope) نشان می دهد که پلاسمای خون را نمی پزد، بلکه مسیر طبیعی انعقاد خون را تسریع می کند. پلاسمای تشکیل لخته را نه در حجم بلکه در سطح آغاز می کند و به صورت انتخابی روی آن دسته از پروتئین های خون که در فرایند طبیعی انعقاد نقش دارند، تأثیر می گذارد. همچنین اثرات پلاسمای، غیرحرارتی است و به درجه

بیمار با زخم‌های عفونی مزمن انجام شد، تیمار زخم با پلاسمای سرد آرگون سبب کاهش معنی‌داری در میزان باکتری‌های موجود در زخم در مقایسه با گروه کنترل گردید (Isbary *et al.*, 2010). این اثر به دلیل تولید گونه‌های واکنش‌گر در پلازما است که با ضد‌عفونی بسیار سریع بافت و غیرفعال‌سازی پاتوژن‌ها و تحریک فرایندهای ترمیمی، سبب تسریع بهبود زخم می‌شوند (Heinlin *et al.*, 2010). در این ارتباط مزیت مهم پلاسمای سرد این است که اثرات آن به صورت موضعی بوده و عملکردشان فقط به ناحیه‌ای از بافت‌ها که گونه‌های واکنش‌گر نفوذ می‌کنند، یعنی چند ده میکرومتر، محدود می‌شود (Volotskova *et al.*, 2011). از طرف دیگر نشان داده‌اند که بهبود زخم همچنین با فعال شدن فیروبلاست‌ها هم در ارتباط است (Dobryninet *et al.*, 2009). در تحقیق حاضر حضور فیروبلاست‌ها در گروه کنترل روز ۷ به صورت خفیف و فقط در اطراف بافت مشاهده گردید، در حالی که در گروه درمان حضور فیروبلاست‌ها به صورت متوسط و همراه با بافت جوانه‌ای بود و از این نظر افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. اثرات پلاسمای سرد بر آغاز تکثیر فیروبلاست‌ها در چندین مطالعه مشخص شده است و احتمالاً این اثر نیز مربوط به گونه‌های واکنش‌گر تولیدشده در پلازما می‌باشد (Shashurin *et al.*, 2010; Volotskova, 2011). البته نتایج برخی مطالعات حاکی از این است که اثر پلازما بر فعال‌سازی اینتگرین (integrin) فیروبلاست‌ها بیشتر از اثر پلازما بر مهاجرت آن‌ها می‌باشد (Volotskova *et al.*, 2012). نشان داده‌اند که پلاسمای سرد با تحریک تکثیر، مهاجرت و بیان فیروبلاست‌ها می‌تواند

محققین نیز نشان می‌دهد که پلاسمای سرد با افزایش تکثیر و مهاجرت سلول‌های اپیتلیالی (Volotskova, 2012)، نقش مهمی در تسریع بهبود زخم ایفا می‌کند (Nakajima *et al.*, 2014). نکته دیگر این‌که در روز ۲۱ در هر دو گروه کنترل و درمان، عمل اپیتلیزاسیون کامل شده و به مرحله شاخی شدن رسیده بود که از این نظر تفاوتی بین این دو گروه مشاهده نشد.

همچنین در مطالعه حاضر پس از ایجاد زخم، حضور سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در گروه درمان در روز ۷ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود، در حالی که در روز ۲۱ حضور سلول‌های التهابی در گروه درمان کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. عقیده بر این است که احتمالاً پلاسمای سرد این اثر خود را از طریق تولید گونه‌های واکنش‌گر از جمله NO اعمال می‌کند (Soneja *et al.*, 2005). از آنجا که ماکروفاژها در محل زخم، برخی از فاکتورهای رشد از جمله PDGF (platelet derived growth factor) و TGF-B (transforming growth factor-beta) را نیز ترشح می‌کنند، بنابراین سبب تحریک فیروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتلیالی و اندوتلیالی و در نتیجه ترمیم زخم هم می‌شوند (Heinlin *et al.*, 2013).

در تحقیق حاضر همچنین در زخم‌های گروه درمان، واکنش چرکی کمتری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. به نظر می‌رسد که این امر می‌تواند به دلیل اثرات پلاسمای سرد در استرلیزه کردن بافت‌های زنده باشد (Fridman *et al.*, 2008). بایستی توجه گردد که عفونت مهم‌ترین عامل شناخته‌شده در به تأخیر افتادن التیام زخم‌ها می‌باشد (Nakajima, 2014). در تحقیقی که توسط ایسباری و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۱۵۰

این یافته‌ها، نتایج تحقیق پامپل و همکاران در سال ۲۰۰۶ و همچنین سوسنین و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که تیمار کوتاه مدت پلاسمای سرد روی پوست انسان و حیوانات در شرایط *in vivo* و *in vitro*، با وجود از بین بردن باکتری‌ها، هیچ‌گونه آسیب میکروسکوپی و ماکروسکوپی در پوست ایجاد نمی‌کند (Sosnin et al., 2004; Pompl et al., 2006). این امر می‌تواند به این دلیل باشد که سلول‌های یوکاریوتی با داشتن متابولیسم سلولی متفاوت، سازمان‌دهی سلولی بالا و همچنین نسبت سطح به حجم بیشتری که دارند، نسبت به پروکاریوت‌ها در برابر استرس خارجی مقاومت بیشتری دارند (Dobrynin et al., 2009). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که یکبار تابش پلاسمای سرد آرگون بر زخم پوستی تمام ضخامت به مدت ۳۰ ثانیه، علاوه بر تسریع در عمل انعقاد خون، سبب افزایش سرعت اپیتلیزاسیون، نوزایش عروقی، ساخت کلاژن، تراکم فیبروبلاست‌ها و در نتیجه افزایش سرعت بهبود زخم گردید. با توجه به پتانسیل بالای پلاسمای سرد آرگون در استریلیزاسیون بافت‌های زنده، افزایش سرعت انعقاد خون و بهبود زخم، به نظر می‌رسد که استفاده از پلاسمای سرد یک تکنولوژی مفید برای درمان بیماری‌های پوستی مختلف از جمله زخم‌های مزمن می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از آقای دکتر محمود قرآن‌نویس رئیس مرکز تحقیقات فیزیک پلاسمای واحد علوم و تحقیقات جهت پشتیبانی از اجرای این طرح قدردانی می‌نمایند.

نقش مهمی را در تسریع بهبود زخم ایفا کند (Shashurin et al., 2010). در این ارتباط لازم به ذکر است که چندین راه برای ایجاد میوفیبروبلاست‌ها وجود دارد، از جمله تمایز از فیبروبلاست‌ها که از طریق فاکتور TGF- β میانجی‌گری می‌شود. پلاسمای سرد احتمالاً دو نقش اصلی روی این مکانیسم دارد: افزایش تکثیر فیبروبلاست‌ها در سطح زخم و همچنین فعال‌سازی فاکتور رشد TGF- β از طریق گونه‌های واکنش‌گر که در نتیجه منجر به افزایش تعداد میوفیبروبلاست‌ها می‌گردد (Nakajima et al., 2014). بر اساس نتایج هیستوپاتولوژی این مطالعه، تراکم سازماندهی رشته‌های کلاژن در گروه‌های درمان روزهای ۷ و ۲۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های کنترل آن‌ها بود. لازم به ذکر است که ساخت رشته‌های کلاژن با حضور فیبروبلاست‌های فعال نیز در ارتباط است. در واقع فیبروبلاست‌ها از بافت سالم اطراف زخم به محل زخم مهاجرت می‌کنند و با ساخت کلاژن و دیگر پروتئین‌های ماتریکس سلولی به تدریج سبب تقویت بافت جدید می‌شوند.

از نظر تئوری، التهاب حاد از دو جزء تغییرات عروقی و وقایع سلولی تشکیل شده است. پلاسمای سرد آرگون می‌تواند نقش مهمی را در رشد و اتساع عروق و متعادل‌سازی گردش خون بافتی ایفا کند (Nakajima et al., 2014). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، یک بار تیمار زخم با پلاسمای سرد سبب افزایش معنی‌داری در نوزایش عروقی در گروه درمان روزهای ۷ و ۲۱ نسبت به گروه کنترل گردید.

در مطالعه حاضر تابش پلاسمای سرد در گروه درمان هیچ‌گونه اثر سوختگی یا نکروز ایجاد نکرد. در توافق با

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

منابع

- Beck, A. (2003). Influence of herbal extract of Echinacea on fracture healing. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 123(7): 327-332.
- Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery*, 28(9): 409-412.
- Dobrynin, D., Fridman, G. and Fridman, A. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*, 11(3): 1-26.
- Emmert, S., Brehmer, F., Hanble, H., Helmke, A., Mertens, N., Ahmed, R., *et al.* (2013). Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clinical Plasma Medicine*, 1(1): 24-29.
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A., Vasilets, V.N. and Fridman, A. (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5(3): 503-533.
- Ghaderi, R. and Afshar, M. (2013). Novel advances in wound healing management. *Birjand University Scientific Journal*, 21(1): 1-19. [In Persian]
- Gravesb, D.B. (2014). Low temperature plasma biomedicine: A tutorial review. *Physics of Plasmas*, 21(8): 101-112.
- Heinlin, J.L., Zimmermann J., Zeman, F., Bunk, W., Isbary, G., Landthaler, M., *et al.* (2013). Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair and Regeneration*, 21(6): 800-807.
- Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary G., Zimmermann, J.L., *et al.* (2010). Plasma medicine. Possible Applications in Dermatology, 8(12): 968-76.
- Isbary, G., Morfill, G., Schmidt, H.U., Georgi, M., Ramrath, K., Heinlin, J., *et al.* (2010). A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology*, 163(1): 78-82.
- Janani, E., Ale-Ebrahim, M. and Mortazavi P. (2013). In Vitro and in Vivo studies of the Effects of Cold Argon Plasma on Decreasing the Coagulation Time. *Iranian Journal of Medicine Physics*, 10(1-2): 31-36.
- Kalghatgi, S., Cooper, M., Fridman, G., Peddinghaus, L., Najaraj, G., Balasubramanian, M., *et al.* (2007). Mechanism of blood coagulation by non-thermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma, in: Drexel University Ninth Annual Research Innovation Scholarship and Creativity (RISC) Day, Philadelphia, USA.
- Kenda, K. Plasma Needle. (2007). Faculty of Mathematics and Physics University of Ljubljana Department of Physics. Ljubljana, December 5th, 1-16.
- Manner, H., Enderle, M.D., Pech, O., May, A., Plum, N., Riemann, J.F., *et al.* (2008). Second-generation argon plasma coagulation: two-center experience with 600 patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23(6): 872-878.
- Nakajima, N., Mukai, K., Setyowati, H., Rahayu, E., Nur, M., Ishijima, T., *et al.* (2014). Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. *Clinical Plasma Medicine*, 2(1): 28-35.

-
- Pompl, R., Shimizu, T., Schmidt, H.U., Bunk, W., Jamitzky, F., Steffes, B., *et al.* (2006). Efficiency and medical compatibility of low-temperature plasma sterilization. 6th International Conference on Reactive Plasmas. Matsushima, Japan, pp: 24-29.
 - Robotis, J., Sechopoulos, P. and Rokkas, T.H. (2003). Argon plasma coagulation: Clinical applications in gastroenterology. *Annales the Gastroenterology*, 16(2): 131-137.
 - Shashurin, A., Stepp, M.A., Hawley, T.S., Pal-Ghosh, S., Brieda, L. and Bronnikov, S. (2010). Influence of cold plasma atmospheric jet on surface integrin expression of living cells. *Plasma Processes and Polymers*, 7(3-4): 294-300.
 - Soneja, A., Drews, M. and Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57(Suppl.): 108-119.
 - Sosnin, E.A., Stoffels, E., Erofeev, M.V., Kieft, I.E. and Kunts, S.E. (2004). The effects of UV irradiation and gas plasma treatment on living mammalian cells and bacteria: a comparative approach. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 32(4): 1544-1550.
 - Volotskova, O., Shashurin, A., Stepp, M.A., Pal-Ghosh, S., Keidar, M. (2011). Plasma controlled cell migration: localization of cold plasma-cell interaction region. *Plasma Medicine*, 1(1): 85-92.
 - Volotskova, O., Stepp, M.A. and Keidar, M. (2012). Integrin activation by a cold atmospheric plasma jet. *New Journal of Physics*, 14(5): 1-16.