

اثر لیپیداحشایی بر میزان تغییرات هیدروکسی پرولین و هیستوپاتولوژی در روند ترمیم زخم جراحی در موش صحرایی نر

کیمیا دیده ور^۱، غلامعلی جاودان (PhD)^۲، سیدحسین داوودی (PhD)^{۳*}

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۲- مرکز تحقیقات جراحی کم تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات سرطان، پژوهشکده تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۹۸/۲/۱۴، اصلاح: ۹۸/۵/۱۵، پذیرش: ۹۸/۵/۲۲

خلاصه

سابقه و هدف: هزینه های بالای درمان و توانبخشی منجر به افزایش گرایش به استفاده از ترکیبات طبیعی و ارزان تر شده است. عصاره بافت چربی حاوی درصد بالایی از انواع اسیدهای چرب ضد التهاب موثر بر بهبود زخم است که تاثیر ترکیب این اسید چرب ها در عصاره چربی تابحال مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدالتهابی و ترمیمی لیپید احشایی گوسفند بر ترمیم زخم پوست موش صحرایی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی نژاد Sprague-Dawley با وزن نسبی ۲۵۰-۳۰۰ gr انتخاب و بطور تصادفی به در ۲ گروه ۲۵ تایی، تیمار و شاهد بررسی شدند. پس از تهیه لیپید احشایی از ناحیه اطراف کلیه بره های جوان ذوب و استریل کردن آن، زخم ها به روش Excisional Wounding بر پوست پشت آنها تحت بیهوشی ایجاد شد و سطح زخم گروه تیمار روزانه با CC۱۰ از آن توسط سرنگ آغشته شد. در روزهای ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۵ ارزیابی اندازه زخم روزانه توسط یک کولیس دقیق و نرم افزار Image J انجام گرفت. بیوپسی بافتی از هر دو گروه کنترل و تیمار برای مقایسه میزان اپیتلیزاسیون، آرایش رشته های کلاژن، سلولهای التهابی، واسکولاریزیشن و فیبروبلاستی در محل انجام شد. همچنین از اسکار زخم روز ۲۱ برای بررسی مقدار هیدروکسی پرولین نمونه برداری شد.

یافته ها: طبق یافته های مورفومتری در روز ۱۰، گروه تیمار با متوسط مساحت زخم $44 \pm 43/6 \text{ mm}^2$ بیشترین و گروه شاهد با متوسط مساحت زخم $50 \pm 98/5 \text{ mm}^2$ کمترین میزان جمع شدگی زخم مشاهده شد همچنین در روز ۵ درصد جمع شدگی دو برابر بیشتر از گروه شاهد بود ($p < 0/05$). در بررسی هیستولوژی گروه تیمار در روز دهم بافت ترمیمی و رشته های کلاژن سازمان یافتگی بهتری داشتند و در مجموع امتیاز پارامترهای ترمیم، دارای متوسط امتیاز $17 \pm 2/74$ در مقایسه با گروه کنترل با امتیاز $16 \pm 1/42$ از ۳ امتیاز کل بود. همچنین اختلاف مقادیر هیدروکسی پرولین پوست سالم و اسکار زخم های گروه تیمار ($23 \pm 3/69 \text{ mg/g}$) کمتر از گروه شاهد ($32 \pm 6/08 \text{ mg/g}$) بود ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: طبق شواهد این مطالعه استعمال لیپید احشایی حیوانی، با اثرات ضدالتهابی و همچنین تحریک ساخت کلاژن و افزایش هیدروکسی پرولین بافت، در التیام زخم های جلدی مؤثر است. همچنین خون رسانی ومهاجرت سلولهای موثر در ترمیم زخم را نیز تقویت خواهد کرد.

واژه های کلیدی: چربی احشایی، اسیدچرب، موش صحرایی، زخم، هیدروکسی پرولین.

مقدمه

شیوع زخم های مزمن در اجتماع ۴/۵ در ۱۰۰۰ نفر و زخم های حاد حدوداً دوبرابر یعنی ۱۰/۵ در ۱۰۰۰ نفر گزارش شده است (۱). درمان زخم ها و سوختگی ها هنوز یکی از مشکلات اصلی کشور های پیشرفته است. شناخت داروهای ارزان قیمت و موثر (از جمله بافت چربی) که عوارض جانبی ترمیم زخم کمتری دارند امروزه یکی از اهداف تحقیقات است (۲،۳). در طب سنتی نیز روغن های حیوانی برای ترمیم زخم مورد استفاده قرار گرفته اند همچنین از عصاره گیاهان مختلفی برای درمان بیماری های پوستی استفاده شده است که دارای ترکیبات موثر مشترک با روغن های حیوانی هستند (۴) همچنین مطالعات برون تنی در بافت موش

صحرایی نیز نشان می دهد که بافت چربی رشد پوست را تحریک می کند (۵). فرآیند ترمیم زخم شامل چهار مرحله مجزای انعقاد، التهاب، تکثیر و بازسازی می باشد (۶-۸). بافت چربی علاوه بر سلول های ادیپوسیت، شامل فیبروبلاست و سلول های اندوتلیال عروقی و انواع مختلفی از سلول های ایمنی مانند ماکروفاژها (ATMS) است (۹،۱۰). همچنین به عنوان یک غده اندوکراین هورمون هایی از قبیل لپتین و استروژن ورستین و سیتوکین ها و عوامل رشد و پروستاگلاندین و انژیوتانسین II و فاکتور نکروز توموری الفا و اینترلوکین و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (۱۱) VEGF و فاکتور رشد شبه انسولین IGF-I (۱۲) فاکتور تحریک

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۵۱۸۶ دانشگاه علوم پزشکی ایران می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر سیدحسین داوودی

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور. تلفن: ۲۱-۲۳۸۷۱

E-mail: hdavoodi1345@gmail.com

مواد و روش ها

تهیه و نگهداری حیوانات: در این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز با کد ۱۳۹۶.۳۶ Abzums.Rec. ۵۰ موش صحرایی نر نژاد اسپیراگو با وزن نسبی ۲۰۰-۳۰۰ g و سن متوسط ۱۲ هفته انتخاب و از پژوهشگاه رویان تهران خریداری شد. هریک از موش صحرایی ها در قفسه های جداگانه با غذای پلت و آب سالم تغذیه و نگهداری شدند. تحقیق در اتاقی با شرایط کنترل شده (درجه حرارت 24°C و رطوبت نسبی ۷۰٪) با روشنایی طبیعی انجام گرفت. زایلایزین (1.0 mg/kg I.M) و کتامین (6.0 mg/kg I.M) و اسید کلریدریک و کلروامین T هیدراته ۹۵٪ و معرف ارلیش (۲.۵ g of p-dimethylaminobenzaldehyde, 2.7 ml of 12 N HCl, 16 ml of isopropanol) از شرکت سیگما (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) خریداری شد.

تهیه پماد: لیپید احشائی اطراف کلیه بره جوان از کشتارگاه دام تهران تهیه و پس از شستشو کامل با نرمال سالین و قطعه قطعه کردن آنها با قرار گیری ۴۰ دقیقه در مجاورت لامپ یو وی (UV) استریل شد و قبل از استعمال در ظرف درپوشیده در دمای 60°C به تدریج ذوب و پس از کاهش دمای نسبی قابل استعمال گشت. **نحوه ایجاد تروما:** پس از القای بیهوشی موش های صحرایی با زایلایزین ۲٪ و کتامین ۱۰٪، سطح پشتی آنها در ناحیه کتف آماده سازی و موهای آن کوتاه شد. سپس زخم تمام ضخامت دایره ای شکل به قطر ۱/۵ cm با استفاده از پانچ بیوپسی استریل ایجاد شد.

با ایجاد زخم به روش Excisional Wounding لایه های اپیدرم، درم و هایپودرم و Panniculus Carnosus به طور کامل برداشته شدند. پس از ایجاد تروما، به دو گروه ۲۵ تایی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. گروه اول تحت عنوان گروه تیمار با استعمال موضعی روزانه ۱۰CC لیپید ذوب شده به مدت ۲۱ روز پیایی تیمار شدند و گروه شاهد نیز دارویی دریافت نکرد. در روزهای ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۵ و ۲۱ از هر دو گروه ۵ سر موش به صورت تصادفی انتخاب شد. اندازه گیری زخم و بررسی مورفولوژیک و همچنین نمونه برداری از بافت زخم تحت بیهوشی جراحی با اثر انجام گرفت و سپس موش های مذکور حذف شدند.

جمع آوری و تحلیل داده های مورفومتریک و هیستوپاتولوژیک: روزانه قبل از تجویز دارو سطح زخم ها با یک تامپون استریل آغشته به سرم فیزیولوژی تمیز شدند. سپس با قرار دادن یک مارکر در مجاورت و به موازات لبه های زخم بدون فشار با کشتی بر پوست مجاور اندازه گیری قطرهای زخم توسط کولیس و بررسی تصویربرداری دیجیتالی در بررسی مورفومتریک فرآیند التیام زخم استفاده شد، سپس با توجه به میانگین داده ها از فرمول زیر درصد بهبودی زخم محاسبه گردید:

$$100 \times \text{مساحت زخم در روز اول} + (\text{مساحت زخم در روز اول} - \text{مساحت زخم در روز آخر}) \times \text{درصد بهبودی زخم}$$

(روز آخر) درصد بهبودی زخم

مطالعات باف شناسی: در روز های ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۵ از کل ضخامت زخم توسط پانچ بیوپسی به قطر ۲ cm ناحیه ترمیم شده، نمونه هیستوپاتولوژی تهیه شد. لامها با استفاده از رنگ آمیزی تری کروم و Hematoxylin and Eosin (H&E) برای فاکتورهای التیام زخم مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

کننده ماکروفاژ MCSF تولید می کند که در روند ترمیم بافت موثرند (۱۳). چربی از نوع زیرجلدی بین لایه درم و فاسیا قرار دارد و چربی از نوع احشایی در حفره شکمی و اطراف ارگان های بدن قرار دارد که عموماً نیمه جامد هستند (۱۴ و ۱۵). لینولئیک اسید با شرکت در ساخت متالوپروتئین ها، در زدودن بافت های آسیب دیده از بستر زخم و ضمن القا فرایند گرانولاسیون به عنوان یه ایمنوژن عمل کرده و پوست را در مقابل عوامل شیمیایی و آنزیمی محافظت می کند. عصاره لیپید احشائی نیز حاوی درصد قابل توجهی از چندین اسیدچرب امگا ۳ بصورت همزمان می باشد (۱۵ و ۱۶). غنی شدن غشای گلبول های قرمز با اسیدهای چرب امگا ۳ با افزایش قابلیت انعطاف پذیری گلبول های قرمز باعث افزایش خونرسانی و دسترسی مواد غذایی مورد نیاز برای ترمیم می گردد (۱۶).

برای توضیح مکانیسم این نتایج یک فرض موجود آن است که این اسیدهای چرب از فرو رفتن اسید آراشیدونیک به داخل فسفولیپید غشایی جلوگیری کرده و خود جایگزین این اسید میگردند که نتیجه آن کاهش سوبسترای لازم برای تولید پروستاگلاندین و لکوترین هاست (۱۷). در ضمن اسیدهای چرب توسط آنزیم های اکسیژناز متابولیزه شده و محصولات از قبیل پروستاگلاندین E2 و ترومبوکسان A3 را تولید می نمایند که دارای توان کمتری در مقایسه با محصولات مشتق از اسید آراشیدونیک بوده و فعالیت این محصولات را از طریق رقابت کاهش می دهند (۱۴). علاوه بر آن با ایجاد یک لایه ضد رطوبت بر روی زخم ضمن حفظ رطوبت مناسب از وارد شدن رطوبت اضافه هوا و محیط که در روند طبیعی اختلال ایجاد می کنند، جلوگیری می کند (۱۹ و ۱۸). وجود ویتامین های A و D در روغن حیوانی نیز در ساخت کلاژن بی تأثیر نیست (۲۰). پژوهشگران گزارش کردند که، وفور اسیدهای چرب ضروری در روغن حیوانی دلایل احتمالی دیگر تأثیر آن در ترمیم زخمها است (۱۹) که مهم ترین آنها لینولئیک اسید و لینولئیک اسید می باشند، که در پستانداران جزء اسیدهای چرب ضروری بشمار میروند (۱۷ و ۱۴). اسیدهای چرب موجود در لیپید احشایی گوسفند عبارتند از: پالمیتیک اسید ۲۶٪، استئاریک اسید ۱۴٪، میریستیک اسید ۳٪، اولئیک اسید ۴۷٪، پالمیتوئیک اسید ۳٪، لینولئیک اسید: ۳٪، لینولئیک اسید: ۱٪. لینولئیک اسید به عنوان یک عامل کموتاکتیک برای ماکروفاژ ها و در تنظیم سنتز کلاژناز به عنوان یک عنصر اصلی عمل می کند (۲) و در سنتز پروتئین، اسید های نوکلئیک، غشای سلولی و تقسیم سلولی موثر است (۲۱). همچنین جریان خون موضعی از مهمترین عوامل ترمیم زخم به دلیل فرآیند های ایسکمی-رپرفیوژن می باشد (۲۴-۲۲). فرآیند ایسکمی-رپرفیوژن با تغییر در میزان ROS موجود در محل آسیب، بر این فرآیند اثر مستقیم دارد. هیدروکسی پرولین یکی از مهمترین شاخص اندازه گیری سنتز کلاژن است لذا برای سنجش میزان کلاژن سازی بافت در حال ترمیم بعنوان معیار التیام زخم از این معیار استفاده شد (۱۷). مقایسه ساختاری و عملکردی چربی احشایی و زیر جلدی نشان داده است که visceral adipose tissue (VAT) در مقایسه با adipose tissue (subcutaneous SCAT) سلول و عروق و اعصاب و سلول های التهابی و ایمنی بیشتری دارد (۲۵). همچنین VAT ظرفیت بیشتری برای تولید اسیدچرب آزاد دارد (۹). تاکنون مطالعه ای در مورد اثر بافت چربی احشایی گوسفند در درمان زخم جراحی در موش صحرایی نر انجام نگرفته است و در این مطالعه سعی بر آن بوده است که تغییرات ریخت شناسی و بافت شناسی و همچنین هیدروکسی پرولین بافت حین ترمیم زخم تحت تأثیر بافت چربی احشایی گوسفندی در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گیرد.

حاصل، ترکیب رنگی ایجاد شد و پس از استخراج تولوئن در طی دو مرحله، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. **بررسی آماری نتایج:** داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۹ تجزیه و تحلیل و برای مقایسه نتایج بین گروهها از آزمونهای آماری آنالیز واریانس یکطرفه به همراه آزمون توکی (one way ANOVA و Tukey) استفاده گردید و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

اندازه گیری هیدروکسی پرولین بافت: میزان هیدروکسی پرولین نمونه های بافتی، با استفاده از روش Summa و همکاران، که به وسیله محققین اصلاح گردید و به روش تصویربرداری دیجیتال و هیستولوژی اندازه گیری شد (۱۷). در این روش ابتدا نمونه های بافتی با استفاده از اسید کلریدریک ۶ مولار و در دمای 105°C بمدت ۱۶ ساعت هیدرولیز شدند. سپس با اضافه کردن محلول کلورامین T، هیدروکسی پرولین در آنها اکسید شد. با اضافه کردن معرف اربیش به محصول

جدول ۱. امتیاز بندی متغیرهای هیستوپاتولوژی

امتیاز	اینتلیزاسیون	التهاب رگزایی	مقدار رسوب کلاژن	آرایش کلاژنی	فیبروبلازی
۰	بی تغییر	بی تغییر	بی تغییر	به طور کامل نامنظم	بی تغییر
۱	یک سوم سطح تحتانی	خفیف	خفیف	کمی نامنظم	خفیف
۲	دو سوم سطح تحتانی	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط
۳	کامل	شدید	شدید	شدید	شدید

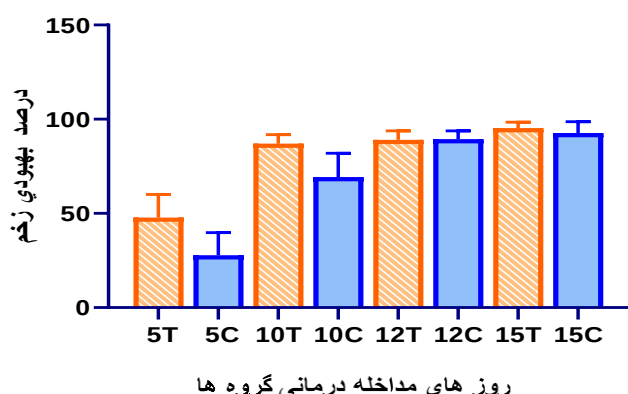
یافته ها

زخمهای گروه شاهد ($6/08 \pm 0/32$) بود (جدول ۳). این تفاوت نشان داد که درمان با لیبیداحشائی در مقایسه با زخمهای شاهد به طور معنی داری باعث افزایش میزان هیدروکسی پرولین بافت التیامی شده است. ($p < 0/05$).



الف ب

شکل ۱. مقایسه ترمیم زخم روز ۵ (الف) گروه شاهد (ب) گروه تیمار



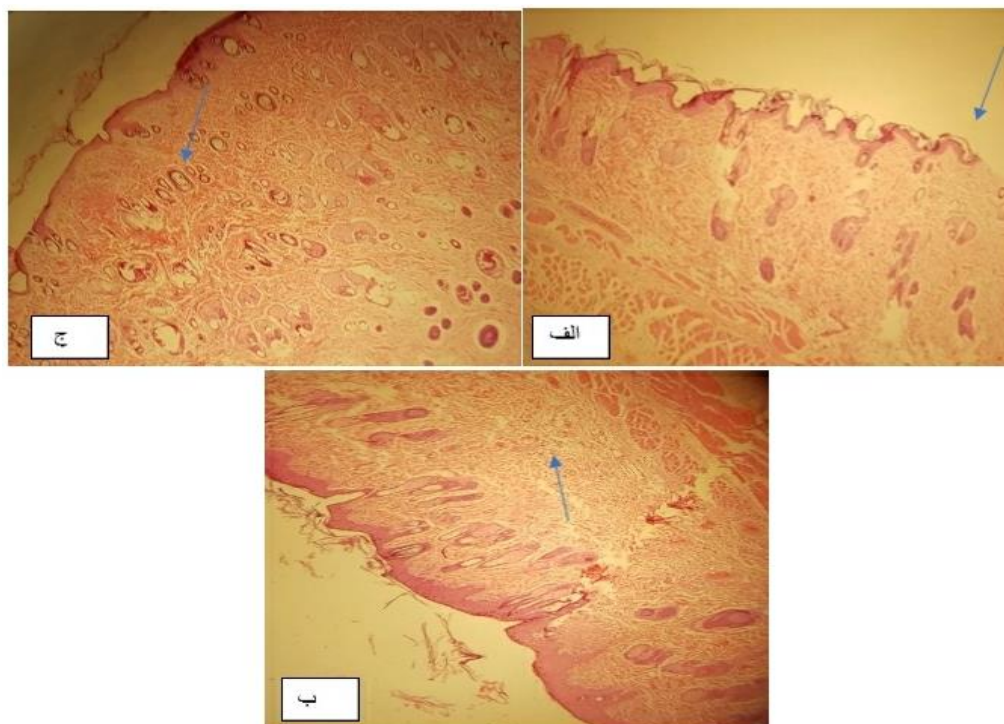
نمودار ۱. مقایسه درصد بهبودی زخم در گروههای مختلف

گروه روز ۵ کنترل: 5C، گروه روز ۵ تیمار 5T: ($p < 0/05$). گروه روز ۱۰ کنترل: 10C، گروه روز ۱۰ تیمار 10T: ($p < 0/05$).

یافته های مورفومتریک: در روز پنجم دوره تیمار اندازه زخم در هردو گروه در مقایسه با روز صفر در گروه تیمار چربی احشائی کاهش چشمگیری داشت. با توجه به میانگین مساحت زخم های روز پنجم در گروه های تیمار با چربی احشائی $17/42 \pm 0/73 \text{ mm}^2$ در مقایسه با گروه کنترل $23/02 \pm 0/34 \text{ mm}^2$ بیشترین میزان جمع شدگی زخم مشاهده شد (شکل ۱). در روز دهم دوره تیمار، در گروه تیمار با چربی احشائی با متوسط اندازه زخم ($43/6 \pm 0/44 \text{ mm}^2$) بیشترین و گروه شاهد با متوسط اندازه ($98/5 \pm 0/07 \text{ mm}^2$) کمترین میزان جمع شدگی زخم مشاهده شد (نمودار ۱). در نهایت داده های مورفومتریک مابین گروه ها در روزهای مورد مطالعه غیر از روز ۱۲ و ۱۵ از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/05$).

یافته های هیستوپاتولوژیک: در روز پنجم درمان در گروه تیمار رویش بافت پوششی از کناره زخم آغاز شده بود و پوستول روی زخم را پوشانده و تعداد سلولهای آماسی به نسبت گروه کنترل کاهش بیشتری داشته است. در بافت همبند هیپودرم ارتشاح فیبروبلاست ها و سلولهای آماسی به ویژه نوتروفیل ها به همراه رسوب فیبرین در داخل بافت همبند سست قابل مشاهده بود. در گروه شاهد، ارتشاح شدیدتر سلولهای آماسی در بستری از فیبرین در محل زخم وجود داشت، ادم و پرخونی مشاهده شد و رویش بافت پوششی آغاز شده بود. در روز ۱۰ دوره تیمار در گروه ها مهاجرت سلول های بازال از لبه های زخم ادامه داشت. در گروه تیمار، بافت گرانولر زخم را اشغال کرده و این مقطع به عنوان بهترین لام روز ۱۰ تشخیص داده شد (شکل ۲ الف). در گروه کنترل بر خلاف گروه تیمار، بافت همبند سست وجود نداشت و بافت گرانولر پرسلول و پرعروق بخش کمتری از زخم را اشغال کرده بود. گروه تیمار در روز ۱۵ بافت ترمیمی سازمان یافتگی بهتری داشت و اپیتلیوم ضخیم تمام سطح زخم را پوشانده بود. رشته های کلاژن ضخیم تر و سازمان یافته تر بودند، و در مجموع پارامترها، دارای متوسط امتیاز $2/85 \pm 0/33$ بود. در صورتیکه به لحاظ خصوصیات هیستوپاتولوژیکی و بلوغ بافتی تفاوت چشمگیری در روز ۱۲ و ۱۵ دوره بین دو گروه تیمار و کنترل وجود نداشت (جدول ۲).

تغییرات هیدروکسی پرولین بافت زخم: اختلاف بین مقادیر هیدروکسی پرولین پوست سالم و اسکار زخم در گروه تیمار ($3/69 \pm 0/23$) بطور معنی داری کمتر از



شکل ۲. مطالعه هیستولوژی در لام (رنگ آمیزی H&E) گروه تیمار به ترتیب در روز ۱۰ و ۱۵ (الف) فلش محل رگزایی را نشان میدهد (ب) محل نوزایش و تکثیر بافت پوششی از کناره زخم را نشان می دهد (ج) تعدادی از ضمایم جلدی مانند فولیکول مو و غدد سباسه در مرکز بافت گرانولاسیون و آرایش رشته های کلاژن

جدول ۲. میانگین امتیاز متغیرهای هیستوپاتولوژی برای هر گروه و دوزهای مختلف مورد بررسی

دوره	روز پنجم	روز دهم	روز دوازدهم	روز پانزدهم
گروه	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
تیمار	۱/۸۹±۰/۰۵	۲/۷۴±۰/۱۷	۲/۸۳±۰/۰۴	۲/۸۵±۰/۰۳۳
کنترل	۱/۰۸±۰/۱۰	۱/۴۲±۰/۱۶	۲/۲۱±۰/۲۰	۲/۵۷±۰/۰۲
P-value	۰/۰۳۲	۰/۰۱۹	۰/۰۶۹	۰/۰۷۶

جدول ۳. مقادیر هیدروکسی پرولین در نمونه بافت پوست (میلی گرم در هر گرم ماده خشک - mg/g)

گروه	پوست سالم mg/g	اسکار زخم mg/g	اختلاف بین پوست سالم و اسکار نهایی mg/g *
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
تیمار	۸/۳۷±۰/۸۵	۵/۸۷±۰/۶۲	۳/۶۹±۰/۲۳
شاهد	۹/۴۵±۰/۹۲	۴/۲۳±۰/۶۷	۶/۰۸±۰/۳۲

$$p=۰/۰۰۸۶ *$$

بحث و نتیجه گیری

طبق نتایج بدست آمده از این مطالعه استعمال موضعی عصاره لیپید احشائی حیوانی بر زخم با ضخامت کامل موش صحرایی، بطور معنی داری باعث تسریع زمان بسته شدن سطح زخم و کاهش بازه فاز التهابی ترمیم می شود و با تقویت کیفیت رگزایی و کلاژن سازی، باعث افزایش میزان هیدروکسی پرولین بافت اسکار زخم در فاز تکثیر گردید. بارزترین تغییرات مورفولوژیکی در ۱۰ روز اول بهبود زخم رخ داد بطوری که در روز پنجم مساحت سطح زخم گروه شاهد دو برابر مساحت سطح زخم گروه تیمار بوده است. تجزیه و تحلیل بافت شناسی نشان داد که رسوب

کلاژن، بازسازی اپیدرم و تکثیر (فیبروبلاست و سلول های اندوتلیال) از گروه تحت درمان بالاتر از گروه کنترل بود. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که، میزان هیدروکسی پرولین پوست که یک معیار ویژه از میزان ساخت کلاژن می باشد، در اسکار زخم های تحت درمان با عصاره چربی بطور معنی داری افزایش یافته است. مطالعات قبلی نشان داده اند که در روند ترمیم بهبودی موفقیت آمیز زخم پس از آسیب دیدگی بافت، نیاز به رفع پاسخ التهابی دارد. اما در صورت ادامه این مرحله، ممکن است زخم وارد مرحله مزمن شود و باعث بجا ماندن اسکار زخم بعد از ترمیم

یافته تری در مدت کمتری صورت گرفت. شواهد هیستوپاتولوژی در بافت درحال ترمیم با لیپید احشایی حاکی از تقویت آنژیوژنز (رگزایی) است. مطالعه Casano و همکارانش نیز تاثیر مثبت عصاره بافت چربی زیر پوستی بر ترمیم زخم و تقویت بازسازی سلول‌های اندوتلیال عروقی را تأیید میکند (۲۱). در مجموع نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات مشابه در این زمینه همخوانی داشت و بر اساس نتایج این مطالعه لیپید احشایی حیوانی فرایند ترمیم زخم را با اثرات ضد التهابی در پوست تسریع می کند و با توجه به یافته های این پژوهش به نظر می رسد که می توان از روغن های حیوانی به عنوان پایه برای ساخت ترکیبات موضعی جهت درمان زخم های پوستی استفاده کرد. اثرات مختلف لیپید احشایی گوسفندی مربوط به ترکیبات متنوع آن است که جهت معرفی مکانیسم عمل این ترکیبات، انجام مطالعات بیشتر در زمینه ارزیابی اثرات هر یک از اسیدچرب ها به صورت جداگانه بعنوان کنترل مثبت و مقایسه آنها بایکدیگر ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی ایران و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز تقدیر و تشکر می گردد.

باشد (۵-۳). در مطالعه ای که توسط Ajami و همکارانش انجام شد مشخص گردید که استفاده از عصاره بافت چربی زیرپوستی موجب افزایش ماکروفاژ و کاهش نوتروفیل در مرحله تاخیری فاز التهابی می شود (۲۵) براساس شواهد مطالعات بیوشیمی توسط Mohiuddin و همکاران در مقایسه ساختاری و عملکردی چربی احشایی و زیر جلدی ظرفیت بیشتر چربی احشائی برای تولید اسیدچرب آزاد (۹)، بنظر میرسد استفاده از چربی احشایی در این مطالعه درمقایسه با استعمال چربی زیر پوستی در مطالعات قبلی موثر تر واقع شود. نتایج هیستولوژی حاصل از مطالعه حاضر نیز کاهش سلول های آماسی از قبیل نوتروفیل را در فاز التهاب حاد نشان داد. در تایید این نتایج، طبق مطالعه انجام شده توسط Hu و همکارانش مشخص شد که مصرف موضعی روغن حاصل از بافت چربی بعلت غنی بودن از اسید چرب امگا۳، التهاب را کاهش می دهد (۱۲). از جمله مطالعات انجام شده در این زمینه تاثیر مثبت عصاره بافت چربی بر تسریع مهاجرت سلول های موثر بر ترمیم زخم توسط López و همکاران است (۲۰). مصرف موضعی اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه می تواند نقصان اسیدهای چرب ضروری را بر طرف نموده و باعث پروفراسیون طبیعی پوست و عدم تشکیل اسکارهای هیپرتروفی شود (۶). بنابراین افزایش هیدروکسی پرولین به طور واضح تسریع بسته شدن زخم را به دلیل انباشت سریعتر کلاژن توضیح می دهد. در این مطالعه نیز درگروه تیمار، کلاژن سازی با آرایش منظم و تکامل

Effect of Visceral Fat on the Amount of Hydroxyproline and Histopathological Changes on Surgical Wound Healing in Male Rat

K. Didevar¹, G. Javdan (PhD)², S.H. Davoodi (PhD)^{*3}

1. Department of Biochemistry, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, I.R.Iran

2. Minimally Invasive Surgery Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

3. Cancer Research Center, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 349-56

Received: May 4th 2019, Revised: Aug 6th 2019, Accepted: Aug 13th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: expensive treatments and rehabilitation has increased the tendency to use natural and cheaper compounds. Animal visceral lipids contain a high percentage of different types of effective anti-inflammatory fatty acids, which till now have not been studied together. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the anti-inflammatory and regenerative effects of sheep visceral lipids on surgical wound healing in rat rats.

METHODS: In this experimental study 50 Sprague-Dawley adult male rats with the average weight of 250-300 g were selected and randomly divided into 2 groups with 25 rats in each group. After providing visceral fat from the pre renal part of the young sheep and melting and sterilizing them, the treatment group which were wounded under surgical anesthesia by excisional wounds, were treated by 10 ml of it on the wound each day. The evaluation of the wound size was measured by using an accurate caliper and Image J software on days 5, 10, 12, 15. Tissue biopsies from both control and treatment groups were performed to compare the rate of epithelialization, collagen filament formation, inflammatory cells, vascularization, and fibroplasia in situ. Also a biopsy was performed at day 21th to check the amount of hydroxyproline in the tissue.

FINDINGS: Based on morphometric findings, on the 10th day of treatment, the mean ulcer size of the treatment group with visceral fat was 43.6 ± 0.44 mm² while the mean size of the ulcer in control group was 98.5 ± 0.07 mm², which has shown to have the least amount of wound contraction. Also on the 5th day, the wound contraction of the treatment group, was twice as high as the control group ($p < 0.05$). The histological examination shows the mean 2.74 ± 0.17 points of restoration parameters score in treatment group compared to the control group with a score of 1.42 ± 0.16 points. Also, the difference between the Hydroxyproline concentration of the healthy skin and the scarring wounds in treatment group (3.69 ± 0.23 mg/g) was less than the control group (6.08 ± 0.32 mg/g) ($p < 0.05$).

CONCLUSION: According to the findings of this study, the usage of animal visceral lipid, with anti-inflammatory effects and as a stimulator of collagen production, increases the amount of hydroxyproline and affects the healing process of cutaneous ulcers. It also improves the blood perfusion and angiogenesis by increasing RBC membrane flexibility, which will also enhance the migration of cells that are effective in wound healing.

KEY WORDS: Wound, Visceral Fat, Rat, Fatty Acid, Hydroxyprolin.

Please cite this article as follows:

Didevar K, Javdan G, Davoodi SH. Effect of visceral fat on the amount of Hydroxyproline and Histopathological changes on surgical wound healing in male rat. J Babol Univ Med Sci. 2019;21: 349-56.

*Corresponding Author: H. Davoodi (PhD)

Address: National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 23871

E-mail: hdavoodi1345@gmail.com

References

1. Tan QW, Tang SL, Zhang Y, Yang JQ, Wang ZL, Xie HQ, Lv Q. Hydrogel from Acellular Porcine Adipose Tissue Accelerates Wound Healing by Inducing Intradermal Adipocyte Regeneration. *J Invest Dermatol*. 2019;139(2):455-63
 2. Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, et al. Wound Healing Effects of Curcumin: A Short Review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(11):1002-7.
 3. Gawronska-Kozak B, Bukowska J, Wu X, Strong AL, Frazier T, Bunnell BA, et al. Contribution of Adipose-Derived Cells to Skin Wound Healing.[Chapter 7], In: *Wound Healing: Stem Cells Repair and Restorations, Basic and Clinical Aspects*. John Wiley & Sons, Inc.; 2018. p.89-101.
 4. Boniakowski A, Kimball A, Davis F, Joshi A, Schaller M, denDekker A, Kunkel S, Gallagher K. Fatty acid binding protein 4, fabp4, causes impaired wound healing in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*. 2018;38(Suppl_1):255.
 5. Silva JR, Burger B, Kühl C, Candreva T, dos Anjos MB, Rodrigues HG. Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: From Inflammation to Repair. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:2503950.
 6. Ehrampoush E, Homayounfar R, Davoodi SH, Zand H, Askari A, Kouhpayeh SA. Ability of dairy fat in inducing metabolic syndrome in rats. *Springerplus* 2016;5(1):2020.
 7. Amani H, Ajami M, Nasser Maleki S, Pazoki-Toroudi H, Daglia M, Tsetegho Sokeng AJ, et al. Targeting signal transducers and activators of transcription (STAT) in human cancer by dietary polyphenolic antioxidants. *Biochimie*. 2017;142:63-79.
 8. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*. 1998;25(3):321-40.
 9. Mohiuddin OA, Campbell B, Poche JN, Thomas-Porch C, Hayes DA, Bunnell BA, Gimble JM. Decellularized Adipose Tissue: Biochemical Composition, in vivo Analysis and Potential Clinical Applications. *Adv Exp Med Biol*. 2019.
 10. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* 2000;130(12):3110S-5S.
 11. Javedan G, Shidfar F, Davoodi SH, Ajami M, Gorjipour F, Sureda A et al. Conjugated linoleic acid rat pretreatment reduces renal damage in ischemia/reperfusion injury: Unraveling antiapoptotic mechanisms and regulation of phosphorylated mammalian target of rapamycin. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(12):2665-77.
 12. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, Huang F, Zhang H, Chen L. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scient Rep*. 2016;6:32993.
 13. Dehghan G, Tahmasebpour N, Hosseinpour Feizi M, Banan S, Sheikhzadeh F, Monirinasab H. Effects of methanol extract of *teucrium orientale* on the serum levels of glucose and lipids in diabetic rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2014; 16(1):44-9. [In Persian]
 14. Sheidaei S, Jafarnejad F, Rajabi O, Najafzadeh M. Comparison of vaginal cream of coconut oil and clotrimazole on candidal infection of vagina. *J Babol Univ Med Sci*. 2019; 21 (1) :93-8. [In Persian]
 15. Davoodi SH, Shahbazi R, Esmaili S, Sohrabvandi S, Mortazavian A, Jazayeri S, et al. Health-Related Aspects of Milk Proteins. *Iran J Pharm Res*. 2016;15(3):573-91.
 16. Shamsaldini s, Zohour a.. Comparison between the effects of animal fat and sulfadiazine on healing of skin lesions in rabbits. *J ZANJAN UNIV MED SCI*. 2002;39(10):21-4.
- Available from: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=31858>
17. Habibey R, Pazoki-Toroudi H. Morphine dependence protects rat kidney against ischaemia-reperfusion injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(10):1209-14.
 18. Zarch AV, Toroudi HP, Soleimani M, Bakhtiarian A, Katebi M, Djahanguiri B. Neuroprotective effects of diazoxide and its antagonism by glibenclamide in pyramidal neurons of rat hippocampus subjected to ischemia-reperfusion-induced injury. *Int J Neurosci*. 2009;119(9):1346-61.

19. Amani H, Mostafavi E, Arzaghi H, Davaran S, Akbarzadeh A, Akhavan O, et al. Three-dimensional graphene foams: synthesis, properties, biocompatibility, biodegradability, and applications in tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;5(1):193-214.
20. López JF, Sarkanen JR, Huttala O, Kaartinen IS, Kuokkanen HO, Ylikomi T. Adipose tissue extract shows potential for wound healing: in vitro proliferation and migration of cell types contributing to wound healing in the presence of adipose tissue preparation and platelet rich plasma. *Cytotechnology*. 2018;70(4):1193-204.
21. Summa M, Russo D, Penna I, Margaroli N, Bayer IS, Bandiera T, et al. A biocompatible sodium alginate/povidone iodine film enhances wound healing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;122:17-24.
22. Casano AM, Sixt M. A Fat Lot of Good for Wound Healing. *Dev Cell*. 2018;44(4):405-6.
23. Toroudi HP, Rahgozar M, Bakhtiarian A, Djahanguiri B. Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34(10):962-6.
24. Mehrjerdi FZ, Aboutaleb N, Pazoki-Toroudi H, Soleimani M, Ajami M, Khaksari M, et al. The protective effect of remote renal preconditioning against hippocampal ischemia reperfusion injury: role of katp channels. *J Mol Neurosci*. 2015;57(4):554-60.
25. Ajami M, Egtesadi S, Razaz JM, Kalantari N, Habibey R, Nilforoushzadeh MA, et al. Expression of Bcl-2 and Bax after hippocampal ischemia in DHA + EPA treated rats. *Neurol Sci*. 2011;32(5):811-8.