

اثر اسید اسکوربیک خوراکی بر شاخص های هیستولوژیکی ترمیم زخم موش صحرایی با دیابت تجربی مزمن

محمد خاکساری^{۱*}، محمد مردانی^۲، علیرضا رضایی زاده^۳

۱-استاد گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- دانشیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳- کارشناس ارشد بافت شناسی گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی کرمان

سابقه و هدف: ویتامین C، یک ترکیب با توان آنتی اکسیدانی است. از آنجایی که افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن در دیابت شیرین همراه با کاهش ساخت کلاژن است، هدف این پژوهش تعیین اثر مصرف خوراکی اسید اسکوربیک بر شاخص های هیستولوژیکی ترمیم زخم موش صحرایی با دیابت مزمن می باشد.

مواد و روشها: این مطالعه بر روی ۱۶۰ سر موش صحرایی نر انجام و دیابت با تزریق ۵۰ mg/kg استرپتوزوتوسین (S.C) ایجاد شد. حیوانات به ۴ گروه تقسیم شدند، سپس همه گروه های مورد مطالعه هشت هفته در شرایط دیابتی باقی ماندند. گروه شاهد (I)، حیوانات دیابتی که آب آشامیدنی آنها معمولی بود. گروه پروفیلاکسی (II)، فقط یک ماه قبل از القاء دیابت ویتامین C به میزان ۲۵۰ mg/kg در آب آشامیدنی مصرف کردند. گروه درمان (III)، حیواناتی که یک ماه بعد از القاء دیابت، تحت درمان با اسیداسکوربیک قرار گرفتند و تا ترمیم کامل زخم، اسید اسکوربیک مصرف کردند. گروه ترکیبی (IV) که یک ماه قبل از دیابت و نیز پس از ایجاد دیابت تا ترمیم کامل زخم اسیداسکوربیک مصرف کردند. هشت هفته پس از القاء دیابت، زخمی به مساحت ۳ cm^۲ در پشت حیوان ها ایجاد شد. میانگین تراکم سطحی عروق خونی و اپیدرم، مقدار کلاژن و هیدروکسی پرولین در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ و ۲۰ پس از زخم اندازه گیری شد.

یافته ها: تراکم سطحی عروق خونی و اپیدرم تا روز هفتم در گروه II بیشتر از سایر گروه ها بود. هم چنین در همه روزهای مطالعه این دو شاخص در گروه I بیشتر از گروه های III و IV بود. میانگین مقدار کلاژن و هیدروکسی پرولین از روز یازدهم در گروه I بیشتر از بقیه گروه ها بود و علاوه بر این در همه روزهای مورد مطالعه این شاخص ها در گروه III کمتر از گروه IV بود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که مصرف اسیداسکوربیک خوراکی در حیوان با دیابت مزمن پس از القاء دیابت و هم چنین به صورت پروفیلاکسی و ترکیبی ترمیم زخم را مختل می کند.

واژه های کلیدی: اسیداسکوربیک، دیابت، ترمیم زخم، تراکم سطحی عروق خونی و اپیدرم، کلاژن، هیدروکسی پرولین.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۴، صفحه ۱۲-۲۱

مقدمه

بیماری دیابت یکی از شایع ترین بیماری های متابولیکی غدد درون ریز است که شیوع آن در جهان یک تا دو درصد می باشد و تخمین زده شده است که در ایران حدود دو میلیون نفر بیمار دیابتی وجود داشته باشد(۱). این بیماری دارای عوارض متابولیکی حاد مانند

کتواسیدوز و اغمای هیپراسمولار غیرکتونی و عوارض مزمنی مانند گرفتاری عروق ته چشم، گرفتاری عروق کلیوی، گرفتاری اعصاب [۱] هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۷۹۳۱۱ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تامین شده است.

(نوروپاتی)، ضایعات پوستی، زخم های دیابتی در پا (سندرم زخم پای دیابتی) و بهبودی تاخیری و غیر طبیعی در زخم می باشد (۲۳). زخم پای دیابتی عامل بستری شدن بیماران دیابتی در بیمارستان برای چندین روز در هر سال است، این سندرم در نتیجه نارسایی عروق و گرفتاری اعصاب ایجاد می شود، اکسیژن رسانی بافتی مختل شده و افزایش طبیعی جریان خون که برای ترمیم و بهبودی زخم به دنبال جراحت و عفونت باید صورت بگیرد به علت بیماری عروق رخ نمی دهد (۴).

نارسایی در ترمیم زخم در بیماران دیابتی هم چنین ممکن است ناشی از التهاب مزمن در محل زخم، تغییرات ایجاد شده در عروق کوچک از قبیل تکثیر یاخته های اندوتلیال در شریانچه های کوچک و ضخیم شدن غشاء پایه مویرگ ها، مساعد بودن محیط زخم برای ابتلاء به عفونت (۵)، کاهش جریان خون و هیپوکسی ناشی از آن، به علت کاهش گلوکز داخل یاخته ای (۴) مهار عمل بیگانه خواری ماکروفاژها و به دنبال آن عدم حذف مواد نکروتیک و زائد از موضع زخم بوده و بدین ترتیب عروق جدید، فیبروبلاست و مواد غذایی در زخم کاهش می یابد (۵) باشد.

بیماری دیابت حداقل در سه مرحله در طی سیکل زندگی کلاژن بر روی کاتابولیسم آن نقش دارد که عبارتند از (۶) (الف) پروکلاژن داخل سلولی، (ب) سنتز کلاژن خارج سلولی قبل از آن که به فیبر تبدیل شود، (ج) فیبرهای کلاژن بالغ، هم چنین دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین (STZ) یک اثر ویژه بر روی متابولیسم کلاژن بافتی دارد، که باعث از بین رفتن توده کلاژنی در پوست می شود (۷).

مطالعات نشان داده اند که در بیماری دیابت از یک سو، متابولیسم اسید اسکوربیک غیر طبیعی بوده و مقدار آن در پلاسما و بافت ها کاهش می یابد؛ هم چنین در این بیماری اسید دهیدرواسکوربیک نیز کاهش یافته ولی نسبت اسید دهیدرواسکوربیک به اسید اسکوربیک افزایش می یابد (۸)، هم چنین در موش های صحرایی دیابتی شده با STZ، میزان اسید اسکوربیک در آن ها کاهش می یابد (۹) و نیز از سوی دیگر، افزایش استرس اکسیداتیو در این بیماری وجود دارد (۱۰)، به علاوه اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل نموده و تشکیل رادیکال های آزاد

اکسیژن را مهار می کند (۸) و بدین طریق با بروز استرس اکسیداتیو مخالفت می کند. هم چنین گزارش شده است، افرادی که جیره غذایی فاقد اسید اسکوربیک دریافت کرده اند در التیام زخم دچار مشکل شده اند و در ساختارهای عروقی آنها نیز اختلال ایجاد شده است (۸ و ۱۰). گزارش شده است مصرف مکمل اسید اسکوربیک باعث افزایش کلاژن و بهبود زخم در افراد سالم می شود (۸). علاوه بر این نشان داده شده است که فیبروبلاست های لایه درم پوست انسانی در شرایط آزمایشگاهی در حضور اسید اسکوربیک قادر به تولید مقادیر بیشتری از کلاژن می باشند، به علاوه اسید اسکوربیک قادر به بهبود قابلیت تکثیری فیبروبلاست ها و ارتقاء سنتز کلاژن توسط این سلول ها می باشد (۱۱). آنزیم پرولیل هیدروکسیلاز که سنتز کلاژن را افزایش می دهد، اسید اسکوربیک به عنوان یک کوفاکتور برای این آنزیم می باشد (۹).

ویتامین C تشکیل غشاء اپیدرم را در خارج بدن موجب می شود. بنابراین در درمان زخم پوستی مفید است (۱۲). اسید اسکوربیک تاخیر در بهبودی زخم ناشی از تشعشعات اشعه گاما را کاهش داده و محتوای کلاژن و تراکم عروقی را در این نوع زخم افزایش می دهد (۱۳). هم چنین گزارش شده است که ویتامین C بهبود شکستگی استخوان را در موش صحرایی تسریع می کند (۱۴). ویتامین C از طریق تولید NO در بهبود زخم پوستی موثر است (۱۵)، علاوه بر این نشان داده شده است که فاکتور رشد اپیدرم از طریق افزایش اسید اسکوربیک بهبودی زخم قرنیه خرگوش را موجب می شود (۱۶).

بنابراین با توجه به شیوع زخم پای دیابتی و علل نارسایی بهبود زخم در بیماران دیابتی و اثرات ضد اکسیدانی اسید اسکوربیک و نیز اثرات اسید اسکوربیک در تسریع بهبودی زخم که در مدل های مختلف زخم در بالا بیان شد و از سوی دیگر اثر این ویتامین بر تولید رشته های کلاژن و تولید هیدروکسی پرولین (اندازه گیری میزان هیدروکسی پرولین به عنوان یک شاخص برای سنتز کلاژن محسوب می شود)، در پژوهش حاضر این فرضیه مورد آزمون قرار گرفت که آیا مصرف خوراکی اسید اسکوربیک بر روی تجدید ساختار رشته های کلاژن، رشد اپی تلیالی و تراکم عروق در محل زخم موش های صحرایی با دیابت مزمن نیز موثر می باشد یا خیر.

مواد و روشها

حیوانات: این مطالعه تجربی روی ۱۶۰ سر موش صحرایی (Rat) بالغ، جنس نر، از نژاد آلبینو-ان - ماری باوزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم و سن ۳ تا ۴ ماهه انجام گرفت. موش‌ها در قفس‌های ۵ تایی در حیوانخانه دانشکده پزشکی رفسنجان با درجه حرارت ۲۲-۲۰ درجه سانتی گراد و سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده و هیچگونه محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا نداشتند.

روش ایجاد دیابت تجربی: دیابت تجربی در موش‌ها با تزریق زیر جلدی ۵۰ mg/kg استرپتوزوتوسین [Upjohn (STZ)، آمریکا] در ناحیه بین دو گوش انجام شد. برای نتیجه‌گیری بهتر حدود ۱۸ ساعت قبل از تزریق به حیوان غذا داده نشد، سه روز بعد از تزریق STZ، حیوان‌هایی که قند خون آنها بیش از ۳۰۰ mg/dl بود و همچنین علائم دیابت از قبیل پرنوشی، پرادراری، کاهش وزن و تأییدیه پاتولوژی جهت تخریب جزایر لانگرهانس را داشتند، دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۷).

دوز و روش مصرف اسیداسکوربیک: اسیداسکوربیک یا ویتامین C به میزان ۲۵۰ mg/lit در آب مصرفی حیوانات حل شد و در شیشه‌های آب‌خوری که جدار آنها تیره شده بود، در اختیار گروه‌های مورد مطالعه به جزء گروه شاهد قرار گرفت، تنها مورد اختلاف در ارتباط با مدت زمان مصرف اسیداسکوربیک در گروه‌های مختلف بود (۱۸).

گروه‌های آزمایشی: موش‌ها به طور تصادفی به چهار گروه که هر گروه شامل ۴۰ سر موش صحرایی بود به شرح زیر طبقه‌بندی شدند: گروه I، یا «گروه شاهد»، که دیابتی شده و آب آشامیدنی آنها معمولی بود. گروه II، یا «گروه پروفیلاکسی»، یک ماه قبل از ایجاد دیابت در آب مصرفی آنها اسیداسکوربیک حل شده و پس از ایجاد دیابت دیگر اسیداسکوربیک به آب آن‌ها اضافه نشد. گروه III، یا «گروه درمان»، دیابتی شده و یک ماه پس از القاء دیابت تحت درمان با اسیداسکوربیک قرار گرفتند و تا ترمیم کامل زخم، اسیداسکوربیک مصرف کردند. گروه IV، یا «گروه ترکیبی»، حیوانهایی که یک ماه قبل از دیابت و نیز پس از ایجاد دیابت تا ترمیم کامل زخم اسید اسکوربیک مصرف کردند.

روش ایجاد زخم: چون مطالعه بر روی دیابت مزمن می‌باشد، ۸ هفته پس از القاء دیابت تجربی (۱۹) قند خون حیوان‌ها، اندازه‌گیری

شد و پس از حصول اطمینان مجدد از دیابتی بودن حیوان، به منظور ایجاد زخم ابتدا موش‌ها با اتر بیهوش شده، موهای پشت حیوان کوتاه (shave) شد، سپس با قرار دادن مارکر فلزی در استامپ و قرار دادن آن روی قسمت تراشیده شده پشت حیوان دایره‌ای به قطر حدود ۱/۹۶ سانتی متر (مساحت ۳ cm²) رسم شد، سپس توسط قیچی جراحی پوست این ناحیه به طور کامل یا تمام ضخامت (Full- thickness) در شرایط غیرعفونی برداشت شد (۲۰)، به طوری که عمق زخم شامل درم و هیپودرم بود.

روش تعیین درصد بهبودی زخم: سطح زخم در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ و ۲۰ بعد از ایجاد زخم اندازه‌گیری شد و درصد بهبودی زخم محاسبه گردید (۱).

روش نمونه‌گیری از محل زخم: در روزهای مختلف پس از ایجاد زخم (روزهای ۳، ۷، ۱۱، ۱۵، ۲۰ و بهبودی کامل) موش‌ها را درون محفظه سربسته‌ای که حاوی پنبه آغشته به اتر بود قرار داده و بدین ترتیب حیوان‌ها بیهوش شده و پس از مدت کوتاهی کشته شدند (۱)، سپس از یک سوم میانی ناحیه زخم نواری به طول ۳ تا ۴ سانتیمتر و عرض حدوداً ۵/۱ تا ۱ سانتیمتر و به صورت تمام ضخامت برداشته شد. بدین ترتیب بخش مرکزی و حاشیه‌ای زخم و نواحی سالم مجاور بستر زخم در نمونه‌ها به صورت قرینه قابل مشاهده بود. **روش انجام مطالعات هیستولوژیک:** پس از فیکس کردن نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد و پردازش‌های لازم، نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین وائوزین و نیز تری کروم ماسون رنگ آمیزی شدند. سپس از سرتاسر برش، ۵ منطقه به طور تصادفی و قراردادی انتخاب شد این ۵ منطقه شامل ۲ منطقه از پوست سالم به نام S_1 و S_2 که در واقع به عنوان پوست استاندارد مبنای کار قرار گرفت و سه منطقه از محل زخم بنام W_1 ، W_2 ، W_3 که به ترتیب از لبه زخم به سمت مرکز زخم نامگذاری و مورد مطالعه قرار گرفت،

لذا با توجه به این که بهبود زخم در ناحیه W_3 در واقع بهبود نهایی زخم را نشان می‌دهد اهمیت خاص و ویژه این ناحیه کاملاً مشهود بوده و بروز علائم بهبودی (رشد اپیدرم، عروق خونی و کلاژن) در این ناحیه بمنزله بهبودی در این ناحیه و نهایتاً بهبودی کامل زخم خواهد بود و پس از آن براساس جدول موجود مقدار

گروه استفاده شد. نتایج همه آزمایش ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شد و با شرط $p < 0.05$ اختلاف معنی دار منظور گردید.

یافته ها

میانگین تراکم سطحی عروقی خونی در روز سوم در نواحی S_2 و W_2 ، در گروه پروفیلاکسی بیشتر از هر سه گروه شاهد، درمان ترکیبی می باشد، هم چنین در گروه شاهد بیشتر از گروه درمان است. در روز هفتم، در نواحی S_2 ، W_1 و W_2 در گروه پروفیلاکسی بیشتر از گروه درمان ($p < 0.05$) می باشد. در روز یازدهم، میانگین تراکم سطحی عروقی خونی در نواحی S_2 و W_1 و W_2 ، در گروه شاهد بیشتر از هر سه گروه پروفیلاکسی، درمان ($p < 0.01$) و ترکیبی ($p < 0.05$) بود.

همچنین این شاخص در گروه پروفیلاکسی کمتر از گروه های درمان ($p < 0.05$) و ترکیبی ($p < 0.01$) بود. در روز پانزدهم، در نواحی W_1 و W_2 و W_3 ، در گروه شاهد بیشتر از دو گروه پروفیلاکسی و درمان بود و نیز در گروه پروفیلاکسی کمتر از گروه ترکیبی شد. در روز بیستم و بهبود کامل هیچگونه اختلاف معنی داری وجود نداشت هر چند که بیشترین میانگین تراکم سطحی عروقی خونی در ناحیه W_2 مشاهده شد (جدول ۱).

کلاژن درجه بندی و مطالعه شد (۲۱). هم چنین تراکم سطحی اپیدرم و عروق خونی در محل زخم مورد بررسی قرار گرفت، به منظور ارزیابی های مورفومتری از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین جهت مشاهده اپیدرم و نیز مشاهده عروق خونی استفاده شد که به همین منظور از قطعه چشمی کالیبره مربع شکل شطرنجی (Eye-Piece) که دارای ۱۲۱ نقطه تلاقی یا آزمایش (Test-Point) بود استفاده گردید و سپس با استفاده از فرمول های ویژه محاسبات انجام شد (۲۲ و ۲۰).

روش ارزیابی هیستولوژیک کلاژن: بررسی مقدار کلاژن به روش رنگ آمیزی تری کروم ماسون انجام و سپس با استفاده از جدول ویژه میزان تغییرات ایجاد شده در بافت از نظر آغاز تولید رشته های جدید درجه بندی (Score) و مورد مطالعه قرار گرفت (۲۳ و ۲۱).

روش انجام مطالعات بیوشیمیایی: هیدروکسی پرولین سال ها است که به عنوان یک شاخص برای وجود کلاژن در بافت مطرح می باشد، بنابراین اندازه گیری آن به روش بیوشیمیایی انجام شد و میزان این اسید آمینه مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت (۲۳).

روش آماری: جهت پاسخگویی به فرضیات از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه بین گروه ها و آزمون Tukey و در بعضی موارد t-student برای مقایسه بین دو

جدول ۱. مقایسه میانگین ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) تراکم سطحی عروقی خونی در روز یازدهم پس از عمل در مناطق مختلف مورد مطالعه

مناطق ضایعه	S_1	S_2	W_1	W_2	W_3
گروه ها					
شاهد	0.82 ± 0.06	0.57 ± 0.35	0.33 ± 0.33	0.21 ± 0.41	0.14 ± 0.4
پروفیلاکسی	0.81 ± 0.04	0.78 ± 0.23	0.07 ± 0.04	0.26 ± 0.14	0.45 ± 0.26
درمان	0.6 ± 0.05	0.45 ± 0.19	0.09 ± 0.14	0.29 ± 0.09	0.57 ± 0.5
ترکیبی	0.71 ± 0.11	0.15 ± 0.47	0.11 ± 0.18	0.38 ± 0.41	0.16 ± 0.29

مناطق S_1 و S_2 منطقه نواحی از پوست سالم اطراف محل زخم می باشند که در واقع به عنوان پوست استاندارد مبنای مطالعه قرار گرفتند و نیز مناطق W_1 و W_2 و W_3 منظور نواحی از محل زخم (Wound) می باشند که به ترتیب از لبه زخم تا مرکز زخم را شامل می شوند.

a: اختلاف معنی دار گروه شاهد با بقیه گروه ها در نواحی S_2 ، W_1 و W_3 با $p < 0.01$.

b: اختلاف معنی دار گروه پروفیلاکسی با گروه درمان در نواحی S_2 ، W_1 و W_2 با $p < 0.05$.

c: اختلاف معنی دار گروه پروفیلاکسی با گروه ترکیبی در نواحی S_2 ، W_1 و W_2 با $p < 0.01$.

d: اختلاف معنی دار گروه پروفیلاکسی با گروه های درمان و ترکیبی در ناحیه W_3 با $p < 0.01$.

کامل هیچگونه اختلاف معنی داری وجود نداشته هر چند که بیشترین میانگین تراکم سطحی اپیدرم در ناحیه W_۲ مشاهده شد. جدول (۳)، میانگین مقدار کلاژن را در گروه های مختلف و در روزهای مختلف مطالعه نشان می دهد. مقدار کلاژن در روز هفتم در گروه پروفیلاکسی (۱/۸±۰/۲) بیشتر از دو گروه درمان (۰/۸±۰/۱۲) و گروه ترکیبی (۰/۹±۰/۱) است (p<۰/۰۱). در روزهای یازدهم و پانزدهم در گروه شاهد میانگین مقدار کلاژن بیشتر از دو گروه پروفیلاکسی و درمان بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی داری می باشد (p<۰/۰۵). بیشترین اختلاف در روز یازدهم وجود داشت به طوری که این میزان در گروه شاهد ۳±۰/۱۲ بود، به علاوه در روز یازدهم مقدار کلاژن در گروه شاهد بیشتر از گروه ترکیبی می باشد به طوری که این اختلاف نیز از نظر آماری معنی دار می باشد (p<۰/۰۱). در روز بیستم، مقدار کلاژن در گروه شاهد نسبت به دو گروه درمان و ترکیبی بیشتر است و هم چنین این شاخص در گروه پروفیلاکسی (۴±۰/۰۹) بیشتر از گروه درمان (۲/۸±۰/۲۸) می باشد (p<۰/۰۵). در حالت بهبودی کامل زخم اگر چه مقدار کلاژن در گروه شاهد (۵/۱۶±۰/۴۷) بیشتر از بقیه گروه ها است، اما اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

میانگین تراکم سطحی اپیدرم در روز سوم در نواحی S_۲ و W_۱ نشان می دهد در گروه پروفیلاکسی از هر سه گروه شاهد، درمان و ترکیبی بیشتر بوده و نیز گروه شاهد بیشتر از گروه درمان می باشد. در روز هفتم، نواحی S_۲ و W_۱ و W_۲ در گروه پروفیلاکسی بیشتر از همه گروه های مورد مطالعه بوده است، هر چند که فقط گروه پروفیلاکسی با گروه درمان در هر سه ناحیه اختلاف معنی داری (p<۰/۰۵) را نشان می داد. در روز یازدهم، در نواحی S_۲ و W_۱ و W_۲ در گروه شاهد بیشتر از هر سه گروه مورد مطالعه بوده است و نیز در گروه پروفیلاکسی کمتر از دو گروه درمان و ترکیبی می باشد (جدول ۲)، مقایسه میانگین تراکم سطحی اپیدرم به عنوان یک شاخص بهبودی در ترمیم زخم را در روز پانزدهم بعد از جراحی نشان می دهد. در این روز، نواحی S_۱ و S_۲ هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد هر چند که در نواحی W_۱ و W_۲ و W_۳ در گروه شاهد بیشتر از گروه درمان (p<۰/۰۵) و پروفیلاکسی (p<۰/۰۱) بود و نیز در گروه پروفیلاکسی در نواحی W_۱ و W_۲ کمتر از گروه ترکیبی بود (p<۰/۰۱). در ناحیه W_۳، نیز اختلاف بین گروه شاهد با گروه درمان (p<۰/۰۱) و گروه پروفیلاکسی با گروه های شاهد و ترکیبی (p<۰/۰۰۱) وجود دارد. در روز بیستم و بهبود

جدول ۲. مقایسه میانگین (Mean±SEM) تراکم سطحی اپیدرم در روز پانزدهم پس از عمل در مناطق مختلف مورد مطالعه

W۳	W۲	۱W	S۲	S۱	مناطق ضایعه
					گروه ها
h. /۸۴±۰/۰۴	d,e۲۴/۲۵±۰/۹۸	a,b۱۳/۲۵±۱/۰۲	۱۳/۸۵±۰/۶۵	۱۲/۸±۰/۷	شاهد
g. /۳۴±۰/۰۲	f۱۷/۲۱±۰/۹۸	c۷/۵۷±۱/۰۹	۱۲/۰۱±۰/۸۵	۱۲/۸±۰/۷	پروفیلاکسی
۰/۵۴±۰/۰۲	۱۹/۳۱±۱/۰۲	۹/۱۴±۰/۹۳	۱۲/۷۵±۰/۲۱	۱۳/۲±۱/۰۹	درمان
۰/۷۴±۰/۰۹	۱۳/۱۴±۰/۹۴	۱۲/۴۷±۰/۹۷	۱۳/۷۴±۰/۶۴	۱۴/۷۶±۰/۲۶	ترکیبی

مناطق S_۱ و S_۲ منطقه نواحی از پوست سالم اطراف محل زخم می باشند که در واقع به عنوان پوست استاندارد مبنای مطالعه قرار گرفتند و نیز مناطق W_۱ و W_۲ و W_۳ منظور نواحی از محل زخم (Wound) می باشند که به ترتیب از لبه زخم تا مرکز زخم را شامل می شوند.

- a: اختلاف معنی دار بین گروه شاهد با گروه پروفیلاکسی در ناحیه W_۱ با p<۰/۰۱. b: اختلاف معنی دار بین گروه شاهد با گروه درمان در ناحیه W_۱ با p<۰/۰۵. c: اختلاف معنی دار بین گروه پروفیلاکسی با گروه ترکیبی در ناحیه W_۱ با p<۰/۰۵. d: اختلاف معنی دار بین گروه شاهد با گروه پروفیلاکسی در ناحیه W_۲ با p<۰/۰۰۱. e: اختلاف معنی دار بین گروه شاهد با گروه درمان در ناحیه W_۲ با p<۰/۰۵. f: اختلاف معنی دار بین گروه پروفیلاکسی با گروه ترکیبی در ناحیه W_۲ با p<۰/۰۱. g: اختلاف معنی دار بین گروه پروفیلاکسی با دو گروه شاهد و ترکیبی در ناحیه W_۳ با p<۰/۰۰۱. h: اختلاف معنی دار بین گروه شاهد با گروه درمان در ناحیه W_۳ با p<۰/۰۰۱.

جدول ۳. مقایسه میانگین (Mean±SEM) مقدار کلآزن در گروه های مختلف در روزهای مورد مطالعه

گروه ها	روزهای بررسی						بهبود
	۳	۷	۱۱	۱۵	۲۰		
شاهد	صفر ۰/۵±	۱/۲±۰/۲	b,c,d ۳±۰/۱۲	e ۳/۹±۰/۰۹	f,g ۴/۶۶±۰/۲۴	۵/۱۶±۰/۴۷	
پروپیلاکسی	صفر ۰/۵±	a ۱/۸±۰/۲	۲±۰/۱	۱/۸±۰/۵۷	h ۴±۰/۰۹	۵±۰/۴۴	
درمان	صفر ۰/۵±	۰/۸±۰/۱۲	۱/۵±۰/۲۵	۲/۱±۰/۲۵	۲/۸±۰/۲۸	۴/۶±۰/۴۲	
ترکیبی	صفر ۰/۵±	۰/۹±۰/۱	۱/۷±۰/۲۵	۳±۰/۱	۳/۳±۰/۴۱	۴/۸±۰/۴۷	

a: اختلاف معنی دار گروه پروپیلاکسی با دو گروه درمان و ترکیبی در روز هفتم $p<0/01$.b: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه پروپیلاکسی در روز یازدهم با $p<0/05$.c: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه درمان در روز یازدهم با $p<0/001$.d: اختلاف معنی دار بین گروه شاهد با گروه ترکیبی در روز یازدهم با $p<0/01$.e: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه پروپیلاکسی و درمان در روز با $p<0/01$.f: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه درمان در روز بیستم با $p<0/01$.g: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه ترکیبی در روز بیستم با $p<0/05$.h: اختلاف معنی دار گروه پروپیلاکسی با گروه درمان در روز بیستم با $p<0/05$.

جدول ۴. مقایسه میانگین (Mean±SEM) مقدار هیدروکسی پرولین در گروه های مختلف در روزهای مورد مطالعه

گروه ها	روزهای بررسی						بهبود
	۳	۷	۱۱	۱۵	۲۰		
شاهد	۰/۳±۰/۰۹	۰/۸۷±۰/۱۲	c ۳/۸±۰/۲۴	d ۴/۵±۰/۱۴	e,f ۶±۰/۲۴	۹/۳±۰/۴۷	
پروپیلاکسی	۰/۳±۰/۰۷	a,b ۱/۷۱±۰/۲۵	۱/۸±۰/۱۳	۲±۰/۲۵	۴/۵±۰/۴۸	۹/۱±۰/۳۴	
درمان	۰/۱±۰/۰۹	۰/۴۷±۰/۲۱	۲/۲±۰/۱۲	۲/۳±۰/۵۴	۲/۸±۰/۴۷	۸/۹±۰/۴۷	
ترکیبی	۰/۴±۰/۰۸	۰/۵±۰/۲۱	۲/۴±۰/۲۸	۲/۸±۰/۵۴	۳/۱±۰/۰۵	۹/۱±۰/۵۴	

a: اختلاف معنی دار گروه پروپیلاکسی با دو گروه شاهد در روز هفتم $p<0/05$.c: اختلاف معنی دار گروه شاهد با بقیه گروه ها در روز یازدهم با $p<0/001$.e: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه درمان در روز بیستم با $p<0/001$.b: اختلاف معنی دار گروه پروپیلاکسی با گروه درمان و ترکیبی در روز هفتم با $p<0/01$.d: اختلاف معنی دار گروه شاهد با بقیه گروه ها در روز پانزدهم با $p<0/01$.f: اختلاف معنی دار گروه شاهد با گروه ترکیبی در روز بیستم با $p<0/01$.

جدول (۴)، میانگین مقدار هیدروکسی پرولین را در گروه های

مختلف و در روزهای مختلف مطالعه نشان می دهد. نتایج حاصل از

مطالعه بیوشیمیایی بر روی مقدار هیدروکسی پرولین نشان می دهد

که میانگین مقدار هیدروکسی پرولین در روز هفتم در گروه پروپیلاکسی ($1/71 \pm 0/25 \mu\text{g/ml}$) بیشتر از گروههای شاهد ($p<0/05$) و درمان ($0/87 \pm 0/12 \mu\text{g/ml}$)، درمان ($p<0/01$) و ($0/47 \pm 0/21 \mu\text{g/ml}$) و

حیوان دیابتی نه تنها مفید نیست بلکه دارای اثر منفی نیز می باشد به طوری که مصرف ویتامین C در حیوان های مورد مطالعه باعث کاهش در میزان کلاژن و هیدروکسی پرولین شده است به طوری که در تمام روزهای مورد مطالعه هر سه گروه مصرف کننده اسیداسکوربیک از مقادیر کلاژن و هیدروکسی پرولین کمتری در محل زخم برخوردار می باشند.

نتایج مطالعه حاضر هماهنگ با گزارش پژوهش های دیگر است که نشان داده اند کاربرد موضعی اسید اسکوربیک اثری بر بهبودی زخم غشاء صماخی نداشته و شاخص های هیستولوژیکی بهبود زخم را تحت تاثیر قرار نمی دهد (۲۵)، همچنین در مطالعه ای که بر روی بیماران بستری در بیمارستان هندوستان انجام شده است، گزارش شده است که زمان بهبودی زخم ارتباطی به غلظت سرمی ویتامین C ندارد (۲۶). کاهش آنتی اکسیدان ها نقشی در تاخیر بهبود زخم در حیوان دیابتی ندارد (۲۷). هم چنین مصرف دوز بالای اسید اسکوربیک نه تنها ابتلا به عفونت را کم نمی کند بلکه حتی فعالیت باکتری کشی را مهار می کند (۸)، شاید اسید اسکوربیک به علت این که دارای اثرات دیابتوژنیک است دیابت را تشدید کرده (۲۸) و ترمیم زخم را به تاخیر انداخته است. هم چنین گزارش شده است دریافت اسید اسکوربیک کمتر از (Recommended RDA dietary allowance) با افزایش آسیب رادیکال های آزاد به DNA همراه است و نیز مکمل اسید اسکوربیک با دوز بالا همین اثر را دارد (۲۹). علاوه بر این گزارش شده است که ایمنی و سلامتی حاصل از مصرف دوزهای بالای اسیداسکوربیک به صورت خوراکی مورد شک و تردید می باشد (۳۰). احتمال دیگر این است که شاید اسید اسکوربیک (آنتی اکسیدان) با مهار تکثیر سلولی از طریق پیشگیری از اکسیداسیون موقتی که باعث تحریک فسفوریلاسیون پروتئین و فاکتورهای رونویسی می گردد (۲۹) عمل مهارتی خود را روی ترمیم زخم انجام داده باشد.

اگرچه همه گزارش های فوق حاکی از عدم تاثیر مثبت ویتامین C بر روی بهبودی زخم می باشند اما گزارش های دیگری که مخالف با نتایج حاصل از مطالعه حاضر باشند وجود دارند به طوری که بیان شده است، تغذیه چهار هفته ای با ویتامین C میزان گلوکز را در حیوان های دیابتی کنترل نموده و میزان کلاژن را

ترکیبی ($p < 0.01$ و $0.5 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$) می باشد. این جدول هم چنین نشان میدهد که در روزهای یازدهم و پانزدهم، میانگین مقدار هیدروکسی پرولین در گروه شاهد (بترتیب $3.8 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$ و 4.5 ± 0.14) نسبت به بقیه گروه ها بیشتر است. به علاوه میانگین مقدار هیدروکسی پرولین در روز بیستم، در گروه شاهد ($6 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$) نسبت به دو گروه درمان ($2.8 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$ و $p < 0.01$) و ترکیبی ($3.1 \pm 0.50 \mu\text{g/ml}$ و $p < 0.01$) اختلاف معنی داری را نشان میدهد، هم چنین در روز بهبود کامل، گروه شاهد ($9.3 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$) بیشترین مقدار هیدروکسی پرولین را نسبت به گروههای دیگر دارا می باشد اگرچه اختلاف معنی دار بین گروهها مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهشی حاکی از این است که میانگین تراکم سطحی عروق خونی در روز یازدهم در مناطق W_1 ، W_2 ، S_2 ، در گروه شاهد بیشتر از هر سه گروه پروفیلاکسی، درمان و ترکیبی می باشد و هم چنین در گروه پروفیلاکسی کمتر از گروه های درمان و ترکیبی است. به علاوه میانگین تراکم سطحی اپیدرم در روز پانزدهم در مناطق W_1 ، W_2 و W_3 در گروه شاهد بیشتر از سه گروه پروفیلاکسی، درمان و ترکیبی می باشد و نیز در گروه پروفیلاکسی کمتر از گروه های درمان و ترکیبی است؛ بنابراین با توجه به نتایج فوق مصرف اسید اسکوربیک به صورت پروفیلاکسی نه تنها باعث افزایش در نورگزی و تجدید اپیدرم نمی شود بلکه باعث به تاخیر افتادن این مکانیسم نیز شده است. از سوی دیگر نتایج این مطالعه بیانگر این است که مقدار کلاژن و هیدروکسی پرولین اولاً در گروه شاهد از روز هفتم به بعد بیشتر از بقیه گروه ها می باشد. ثانیاً در گروه پروفیلاکسی در روز هفتم بیشتر از بقیه گروه ها می باشد هرچند که مقدار کلاژن در روز هفتم در گروه پروفیلاکسی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی دار را نشان نمی دهد. ثالثاً در گروه ترکیبی در همه روزهای مورد مطالعه بیشتر از گروه درمان می باشد. نتایج به دست آمده در این مطالعه هماهنگ با نتایج مشاهده شده در بهبودی زخم در حیوان های هیپرگلیسمیک و بیماران دیابتی (۲۴) می باشد که در مطالعات قبلی مشاهده شده است. یافته های دیگر این پژوهش حاکی از این است که مصرف اسید اسکوربیک در

که برای بروز اثرات ضد التهابی اسید اسکوربیک احتیاج بمدت زمان مصرف حدود یک ماه است تا با تاثیر در سیستم های نورواندوکراین پاسخ ضد التهابی ایجاد نماید که احتمالاً این عمل خود را از طریق کاهش رادیکال های آزاد اکسیژن اعمال می کند (۲۴) که این موضوع موید آن است که اولاً اثرات ضد التهابی اسید اسکوربیک در حیوان دیابتی تضعیف شده است و ثانیاً احتمال دیگر این است که غلظت اسید اسکوربیک در دیابت کاهش می یابد (۲۸).

قبل از القاء دیابت اسید اسکوربیک مصرف شده است، این ماده به اندازه کافی در سلولها ذخیره شده و پس از ایجاد زخم، این اسید اسکوربیک ذخیره شده در طی فاز حاد (۷ روز اول) موثر واقع شده است، در حالی که در گروه ترکیبی هر چند قبل از القاء دیابت اسید اسکوربیک مصرف شده است اما چون پس از القاء دیابت نیز مصرف آن ادامه پیدا کرده است شاید به دلیل بالا بودن دوز مصرفی (۲۵۰ mg/lit) که در حیوان دیابتی دوز بالا می باشد، احتمالاً در روند بهبود زخم اختلال ایجاد کرده است.

در مجموع بررسی حاضر نشان داد که مصرف خوراکی اسید اسکوربیک به میزان ۲۵۰ mg/lit ترمیم زخم را در موش صحرایی دیابتی مزمن نه تنها تسریع ننموده است، بلکه هنگامی که به صورت درمانی یا ترکیبی مصرف شود ترمیم زخم را به تعویق می اندازد. بنابراین شاید بتوان گفت حوادثی که در حیوان دیابتی رخ داده از اثرات بهبودی بخش اسید اسکوربیک کاسته است. لازم است که شناخت دقیق سازو کار عمل ویتامین C روی سنتز کلاژن، تکثیر فیبروبلاست ها، کاهش التهاب و افزایش خون در موضع زخم در حیوان های دیابتی انجام گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مسئولان ذیربط و همچنین از مسئولین آزمایشگاه و مرکز کامپیوتر دانشکده پزشکی رفسنجان قدردانی و تشکر به عمل می آید.

افزایش و بهبود زخم را تسریع می نماید (۳۱). اسید اسکوربیک تشکیل اپیدرم را در خارج بدن موجب شده و بنابراین در درمان زخم پوستی تمام ضخامت مفید هستند (۱۲). در بیماران با جراحی، اسید اسکوربیک بهبود زخم را تسریع می کند (۳۲). ویتامین C محتوای کلاژن، فیبروبلاست و تراکم عروقی را در زخم های در معرض اشعه گاما افزایش می دهد (۱۳).

برخی از دلایل احتمال عدم تاثیر اسید اسکوربیک در حیوان دیابتی عبارتند از این که شاید علی رغم مصرف دوز بالای اسید اسکوربیک جذب سلولی آن افزایش پیدا نکرده زیرا گزارش شده است که جذب سلولی این ویتامین توسط انسولین افزایش و توسط قند خون کاهش می یابد (۳۳). احتمال دیگر اختلال در ورود ویتامین C به داخل سلول ها می باشد زیرا نشان داده شده است که این ویتامین با گلوکز در ورود به سلول ها رقابت می کند (۲۴) و شاید همین عدم (کاهش) ورود ویتامین به داخل سلول نقش کوفاکتوری خود را در سنتز رشته های کلاژن به خوبی ایفا نکرده و در نتیجه کلاژن تولید نشده و یا به صورت ناقص (غیرطبیعی) تولید می شود (۳۴)، هم چنین گزارش شده است که مصرف یک آنتی اکسیدان بعد از شروع آسیب اکسیداتیو می تواند به تشدید آسیب منجر شود و به عبارت دیگر به عنوان یک پرواکسیدان عمل می کند (۲۹).

از آنجایی که در پژوهش حاصل تفاوت بین روش درمان با پروفیلاکسی وجود داشت دلایل احتمالی زیر را می توان برشمرد. مصرف اسید اسکوربیک خوراکی قبل از ایجاد دیابت، باعث شده است که به مقدار کافی در سلول ها جایگزین شده و در نتیجه ذخیره سلولی آن افزایش یابد، پس مصرف آن به صورت پروفیلاکسی در مراحل اولیه ترمیم (روزهای ۳ و ۷) از این طریق مؤثر بوده زیرا گزارش شده که اولاً هفت روز ابتدای ترمیم مربوط به مرحله التهابی است و نیز اثرات ضد التهابی اسید اسکوربیک شناخته شده است (۳۵) و ثانیاً میزان اسید اسکوربیک و هیدروکسی پرولین در ۷ روز اول در محیط زخم کاهش پیدا می کند، (۳۶). بنابراین می توان نتیجه گرفت

منابع

۱. خاکساری م، سجادی م ع، حاجی زاده س، شریعتی م، حسنی صفات م. اثر رژیم غذایی حاوی روغن ماهی بر ترمیم زخم در موش صحرایی دیابتی. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳۷۸؛ ۲ (۳): ۹۲-۱۸۱.

2. Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full thickness excised skin lesions. *Ultrasound Med Biol* 1990; 28: 178-80.
3. McLennan S, Dennis K. Deficiency of ascorbic acid experimental diabetes. *Diabetes* 1988; 37: 359-61.
4. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Eng J Med* 1986; 314 (14): 892-902.
5. Goodson WH, Hunt TK. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res* 1977; 22: 221-7.
6. Schneir M, Ramamurthy N, Golub L. Skin collagen metabolism in the streptozotocin- induced diabetic rat. *Diabetes* 1982; 31: 426-31.
7. Rajkumar L, Srinivasan N. Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 1991; 29: 1081-3.
۸. یگانی م. نگاهی تازه به ویتامین C، تهران نشر سپهر ۱۳۷۷؛ ص: ۹-۱۵۱.
9. Abe T, Abe Y, Aida Y, Hara Y, Maeda K. Extracellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts. *J Cell Physiol* 2001; 189(2): 144-51.
10. Nersi SM, Bruno CM. Alteration of oxid- reductive and hemostatic factors in type 2 diabetes. *J Int Med* 1994; 236: 495- 500.
11. Sternberg M, Cohen Forterre L. Connective tissue in diabetes mellitus: biochemical alteration of the intercellular matrix with special reference of proteoglycans, collagen and basement membrane. *Diabetes Meta* 1985; 11: 27-50.
12. Boyce ST, Supp AP, Swope VB, Warden GD. Vitamin C regulates keratinocyte viability, epidermal barrier basement membrane in vitro, and reduces wound contraction after grafting of cultured skin substitutes. *J Invest Dermatol* 2002;118(4): 565-72.
13. Jagetia GC, Rajanikant GK, Baliga MS, Rao KV, Kumar P. Augmentation of wound healing by ascorbic acid treatment in mice exposed to gamma- radiation. *Int J Radiat Biol* 2004; 80(5): 347-54.
14. Sarisozen B, Durak K, Diner G, Bilgen OF. The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats. *J Int Med Res* 2002; 30(3): 309-13.
15. Hardwick JB, Tucker AT, Wilks M, Johnston A, Benjamin N. A novel method for the delivery of nitric oxide therapy to the skin of human subjects using a semi-permeable membrane. *Clin Sci, Lond* 2001; 100(4): 395-400.
16. Gonul B, Kaplan B, Bilgihan K, Budak MT. Effect of epidermal growth factor in artificial tear on vitamin C levels of corneal wounded eye tissues. *Eye* 2001; 15(Pt2): 213-6.
17. Wohaieb SA, Godin DV. Alteration in free radicals tissue-defence mechanism in STZ-induced diabetes in rat. *Diabetes* 1987; 36: 1014-18.
18. Gembal M. The effect of ascorbic acid on protein glycation in streptozotocin -diabetic rats. *Diabetologia* 1994; 37: 731.
19. Michael S, Nangavaram R. Skin collagen metabolism in the streptozotocin- induced diabetic rat. *Diabetes* 1982; 31: 426-31.

۲۰. مهرز ش، ایزدیار ب، نظری ف. بررسی اثر پماد فاندرومول بر روند التیام زخم پوستی در موش صحرایی و مقایسه آن با سرم فیزیولوژی. مجله پزشکی کوثر؛ ۱۳۷۶؛ ۹۵-۱۰۰.

21. Yoshimi N, Hiroyasu K. Wound healing effect of the new imidazole antimycotic Lanoconazole in rats. *Arzneim Forsch Drug Res* 1996; 46(1): 218-23.
22. Isler H, Bauen A, Hubler M, et al. Morphometric assesment of wound healing in rats treated with a protein-free haemodialysate. *Burns* 1991; 17(2): 99-103.
23. Keasava GR, Chukuka SE. A simplified method for the analysis of hydroxyprolin in biological tissue. *Clin Biochem* 1996; 29(3): 225-9.
24. Madhu CG, Kiran PS. Effect of vitamin C supplementation on oxidative stress in experimental diabetes. *Indian J Exp Biol* 1997; 35: 264-6.
25. Yigit O, Cinar U, Coskun BU. The effect of ascorbic acid application on the healing rat tympanic membrane perforations. *Kulak Burum Bogaz Ihtis Derg* 2003; 11(1): 1-4.
26. Agrawal S, Pandey SS, Shukla VK, Kaur P. Nutritional and vitamin status of non-healing wounds in patient attending a tertiary hospital in India. *J Dermatol* 2003; 30 (2): 98-103.
27. Rasik AM, Shukla A. Antioxidant status in delyed healing type of wounds. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(4): 757-63.
28. Stankova L, Riddle M. Plasma ascorbate concentration and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Metabolism J* 1984; 33 (4): 347-53.
29. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355: 1179-80.
30. Chatterjee IB, Kar NC, Guha BC. Aspects of ascorbic acid biosynthesis in animals. *Ann NY Acad Science* 1961; 92: 36.
31. Rajasekaran NS, Nithya M, Rose C, Chandra TS. The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689 (3): 190-201.
32. Long CL, Maull KI, Krishnan RS. Ascorbic acid dynamics in the seriously ill and injured. *J Surg Res* 2003; 109 (2): 144-8.
33. Sinclair AJ, Taylor PB, Lunec J, et al. Low plasma ascorbate levels in patients with type 2 diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Diabet Med* 1994; 11 (9): 893-8.
34. Ramamurthy NS, Greenwald RA. The effect of alloxan diabetes on prolyl and lysyl hydroxylase activity in uninflamed and inflamed rat gingiva. *Arch Oral Boil* 1985; 30(9): 679-83.
35. Goldenberg H, Schweinzer E. Transport of vitamin C in animal and human. *Cell J Bio* 1994; 26 (4): 359-67.
36. Kaplan B, Gonul B, Dincer S, Dincer Kaya FN, Babul A. Relationship between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline, and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing. *Surg Today* 2004; 34(9): 747-51.

*آدرس نویسنده مسئول: کرمان، دانشگاه علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳-۵.