

تأثیر نانوذره کیتوسان در درمان سوختگی بر روی مدل موشی

نازنین جباری، کاظم پریور و نسیم حیاتی رودباری

تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۰

چکیده

زخم‌های ناشی از سوختگی یکی از دیر بهبود یافته‌ترین زخم‌ها می‌باشند. درمان صحیح و مراقبت از زخم جهت افزایش سرعت بهبود، هم‌چنین جلوگیری از مزمن شدن و عفونت آن همواره مدنظر بوده است. کیتوسان مشتقی از گلوکان با واحدهای تکرار شونده کیتین دارای ساختاری طبیعی شبیه سلولز است که زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر است. ۴۲ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به صورت تصادفی در گروه‌های کنترل، شاهد و تجربی قرار گرفتند. با رعایت شرایط استریل و تحت بیهوشی یک زخم مدور به قطر یک سانتی‌متر و با ضخامت کامل پوست در پشت هر موش ایجاد شد. روز جراحی روز صفر محسوب گردید. از روز یک بطور روزانه همه موش‌ها به صورت موضعی با محلول نانوذره کیتوسان تیمار شدند. موش‌ها در روزهای ۷، ۱۴، ۲۸ پس از تیمار روزانه، با کلروفورم کشته و نمونه بستر زخم و پوست سالم مجاور، از هر موش برداشته شدند. بر نمونه‌های مربوط، مطالعات بافت‌شناسی انجام شد. یافته‌های این تحقیق و بررسی داده‌های آماری نشان می‌دهد که تعداد و قطر در سطح معنی‌داری ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری یافته است. با توجه به یافته‌های این تحقیق میتوان گفت نانو ذره کیتوسان بر روی رگ‌زایی اثر مثبت داشته و با مطالعه بیشتر بر روی این نانو ماده شاید بتوان برای درمان زخم پیشرفت‌های بیشتری حاصل کرد.

واژه‌های کلیدی: سوختگی، نانو ذرات کیتوسان، ترمیم، پوست، NMRI، موش.

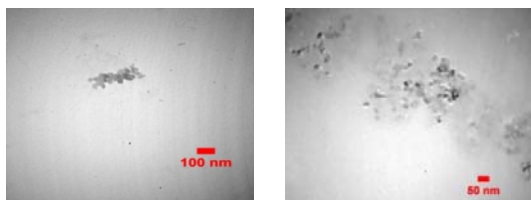
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۱۷۲۷۵۳، پست الکترونیکی: Nazanin.Jabbari@gmail.com

مقدمه

باضخامت نسبی یا درجه دوم (آسیب لایه‌های زیرین پوست)، سوختگی با ضخامت کامل یا درجه سوم (آسیب همه لایه‌های پوست) طبقه‌بندی می‌شود (۶). حدود ۱۱ میلیون نفر در جهان نیازمند درمان دارویی‌اند و هر ساله ۳۰۰۰۰۰ نفر در اثر سوختگی می‌میرند (۱۴). ترمیم زخم یکی از شگفت‌انگیزترین پدیده‌هایی است که علم پزشکی با آن روبرو است. به‌طور کلی، فرآیند ترمیم به سه گروه از وقایع زیر تقسیم می‌شود (۱). فاز التهاب (۲). فاز تکثیر (۳) فاز تجدید ساختار. هر ماده‌ای که بتواند زمان این فازها را کوتاه‌تر کند، منجر به تسریع روند ترمیم می‌شود (۵). در طول تاریخ انواع درمان‌های حاد برای سوختگی‌های درجه‌یک و دو مورد استفاده قرار گرفته است. غار

پوست سنگین‌ترین اندام منفرد بدن و بزرگترین ارگان بدن ما می‌باشد و شامل روپوست یا اپیدرم، میان‌پوست یا درم می‌باشد. در زیر درم، زیرپوست یا هیپودرم یا بافت زیرجلدی قرار دارد حاوی لایه‌ای از سلول‌های چربی به نام طبقه بافتی چربی یا پانیکولوس آدیپوزوس می‌باشد. اپیدرم خارجی‌ترین طبقه پوست و درم در زیر اپیدرم قرار گرفته و خیلی ضخیم‌تر از آن است و اپیدرم را تغذیه می‌کند. درم برخلاف اپیدرم دارای عروق خونی زیادی است (۱). سوختگی، نوعی آسیب به گوشت یا پوست است که بر اثر گرما، برق، موادشیمیایی، اصطکاک یا پرتو به وجود می‌آید. سوختگی‌ها در سه سطح، سوختگی‌های سطحی یا درجه اول (آسیب سطح پوست)، سوختگی

می‌گرفت. در این مطالعه از بیوپلیمر زیستی کیتوسان (Chitosan) استفاده شد. با توجه به وجود ناخالصی در کیتوسان‌های متداول و موجود در بازار، از بیوپلیمر زیستی کیتوسان با درجه خلوص ۹۰/۳۱٪ شرکت کیتوتک استفاده گردید. تشکیل نانو ذرات کیتوسان براساس فرایند اتصال یونی ذرات کیتوسان که در اثر انحلال در استیک‌اسید به صورت مثبت باردار شده‌اند و یونهای منفی STPP می‌باشد. برای تهیه این سوسپانسیون ابتدا ۲ میلی‌گرم کیتوسان را به ۱cc اسیداستیک ۰/۱ مولار اضافه و بعد به کمک NaOH، pH محلول به ۴/۴ رسانده شد. سپس محلول سدیم‌تری پلی فسفات (STPP) را با افزودن ۱ میلی‌گرم سدیم‌تری پلی فسفات به ۱cc آب مقطر تهیه گردید. به نسبت ۱ به ۳، محلول STPP به محلول کیتوسان، به صورت قطره‌قطره، افزوده شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس محلول را در میکروتیوپ‌ها ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی که حاوی نانو ذرات کیتوسان بود جمع‌آوری و استفاده شد. با استفاده از طیف‌سنج پراش اشعه ایکس (XRD) زاویه برابر $0,00375$ رادیان و در نتیجه قطر ذره (D) $374,59459$ آنگستروم و یا به عبارتی $37,4594$ نانومتر محاسبه شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی (TEM) نانو ذرات کیتوسان را نشان می‌دهد. تصاویر توسط شرکت دی پترونیک تهیه شد. با محاسبات انجام شده، میانگین شعاع ذرات ۱۷ نانومتر است این بدان معناست که قطر نانو ذرات ۳۴ نانومتر است که این رقم با داده‌های ایکس‌آردی همخوانی دارد (شکل ۱).



شکل ۱- تصاویر نانو ذره کیتوسان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM (۵۰ و ۱۰۰ نانومتر)

نگاره‌هایی که قدمت آن به بیش از ۳۵۰۰ سال پیش بازمی‌گردد سوختگی و درمان آن را نشان می‌دهد (۶). نانوتکنولوژی شاخه‌ای از علم است که به کاربرد اتم‌ها و مولکولها در مقیاس نانو اختصاص دارد (۱۷). ایران در تولید علم نانو فناوری در زمینه علوم و فناوری نانو، به جایگاه بیست و پنجم جهان دست‌یافته است (۳). کیتوسان بیوپلیمری است که به دلیل قیمت نازل و همچنین ویژگی‌های ژلیست شناختی نظیر زیست‌تخریب‌پذیری، آنتی‌باکتریال بودن و بی‌خطر بودن برای سلامتی، کاربرد فراوانی پیدا کرده است (۱۷). کیتوسان پلی‌ساکارید کاتیونی است که از فرآیند استیل زدایی قلیایی کیتین بدست می‌آید. منابع عمده تولید کیتوسان دیواره سلولی قارچها و پوست خارجی سخت‌پوستان است. عمده فعالیت‌های بیوشیمیایی کیتین و کیتوسان در بهبود زخم، فعال‌سازی پلی‌مورفونوکلیتر سلولی، فعال شدن فیبروبلاست، تولید سایتوکاین، مهاجرت سلول غول پیکر و شبیه‌سازی سنتز کلاژن نوع IV می‌باشد. کیتوسان سیستم‌های ترمیم، سلول‌های پلی‌مورفونوکلیتر، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها را فعال می‌کند. در تحقیقات گذشته ثابت شده که کیتین و کیتوسان روی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست‌ها اثر داشته و بر روی ترمیم زخم‌ها مؤثرند (۲)، در زمینه نانو ذره کیتوسان تحقیقات خاصی جهت بررسی روند ترمیم و بهبود زخم صورت پذیرفته است. بنابراین بر آن شدیم تا بدانیم آیا نانو ذره کیتوسان می‌تواند بر روند رگ‌زایی و التیام زخم تأثیرگذار باشد؟

مواد و روشها

در این مطالعه، ۴۲ سر موش نر بالغ نژاد NMRI با ۱۰-۱۲ هفته سن و با وزن 32 ± 3 گرم انتخاب شدند. دمای اتاق در حدود 22 ± 2 تنظیم شد و به منظور تنظیم سیستم فیزیولوژی بدن آنها، ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. تغذیه آنها با جبه‌های مخصوص حیوانات آزمایشگاهی و آب آشامیدنی لوله‌کشی صورت

طبق جدول ۱ موش‌ها به ۹ گروه تقسیم شدند:

جدول ۱- طبقه‌بندی گروه موش‌های استفاده شده در آزمایش

نام گروه	تعداد موش‌ها
گروه کنترل ۱ (واجد سوختگی بدون تیمار تا ۷ روز پس از سوختگی)	۴
گروه شم ۱ (واجد سوختگی و تیمار با حلال نانوذره کیتوسان (محلول STPP) تا ۷ روز پس از سوختگی)	۴
گروه تجربی ۱ (واجد سوختگی و تیمار با محلول نانوذره کیتوسان تا ۷ روز پس از سوختگی)	۶
گروه کنترل ۲ (واجد سوختگی بدون تیمار تا ۱۴ روز پس از سوختگی)	۴
گروه شم ۲ (واجد سوختگی و تیمار با حلال نانوذره کیتوسان (محلول STPP) تا ۱۴ روز پس از سوختگی)	۴
گروه تجربی ۲ (واجد سوختگی و تیمار با محلول نانوذره کیتوسان تا ۱۴ روز پس از سوختگی)	۶
گروه کنترل ۳ (واجد سوختگی بدون تیمار تا ۲۸ روز پس از سوختگی)	۴
گروه شم ۳ (واجد سوختگی و تیمار با حلال نانوذره کیتوسان (محلول STPP) تا ۲۸ روز پس از سوختگی)	۴
گروه تجربی ۳ (واجد سوختگی و تیمار با محلول نانوذره کیتوسان تا ۲۸ روز پس از سوختگی)	۶

بوئن خارج شده و به مدت ۱ ساعت در آب جاری شستشو داده شدند و در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند. پس از انجام مراحل آب‌گیری و تهیه قالب‌های پارافینی، برش‌های ۵ میکرونی از آنها تهیه شد و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین روی آنها صورت گرفت. بعد از اتمام این مرحله نمونه‌ها برای بررسی میکروسکوپی و عکس گرفتن آماده گردیدند. در بررسی میکروسکوپی، لایه‌های اپیدرم، درم، هیپودرم، لایه کراتینه شده، فولیکول‌های مو و رگ‌های خونی به‌آسانی قابل تشخیص بودند. به‌طور تصادفی در ۱۰ لام تهیه شده از هر گروه توسط چشمی ۴۰ میکروسکوپ، ضخامت لایه‌ها، قطر فولیکول مو و قطر رگ‌ها توسط گراتیکول مدرج و تعداد رگ‌ها توسط گراتیکول مشبک شمارش شدند. نتایج بدست آمده به‌صورت داده‌های اولیه به نرم افزار SPSS داده شد. سپس مقایسه میانگین‌ها با در نظر گرفتن انحراف معیار (SE) و ($P < 0.05$) انجام پذیرفت. سنجش‌های آماری بوسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و آزمون One way- Anova و Tukey صورت گرفت و با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷، نمودارهای

بعد از بیهوشی حیوان با تزریق درون صفاقی مخلوط کتامین (۲ipmg/kg) و زایلازین (۳ipmg/kg)، از ناحیه شکم روی سطح میز قرارگرفت و موهای پشت حیوان، با تیغ ژیلت کاملاً تراشیده شد. سپس به کمک هویه (در مدت‌زمان ۳۳ ثانیه، دمای آن به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسید) با قطر یک سانتی‌متر، سوختگی‌های نسبتاً عمیق دربرگیرنده دولایه پوست در محدوده ما بین دو کتف و زیر گردن، به وجود آمد. هویه به مدت ۱ دقیقه گرم شد و ۱۵ ثانیه روی پشت حیوان قرارگرفت. روزانه یک‌مرتبه محلول تیمار روی سطح زخم‌ها استفاده می‌شد به‌طوری که تمام سطح زخم‌ها و کناره آنها پوشانده می‌شد. بر روی زخم‌های کنترل هیچ ماده‌ای استعمال نشد. کلیه زخم‌ها بدون پانسمان و روباز ماندند. هرروز سطح زخم‌ها توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری می‌شد. سپس در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۸، موش‌ها از طریق استنشاق کلروفورم در دسیکاتور دچار مرگ سریع و بدون درد (اتانازی) شدند. پوست سوخته با تیغ اسکالپل جدا شد و نمونه‌ها به فیکساتیو بوئن منتقل و به مدت ۵ ساعت در محلول باقی ماندند. سپس از

میله ای رسم گردید.

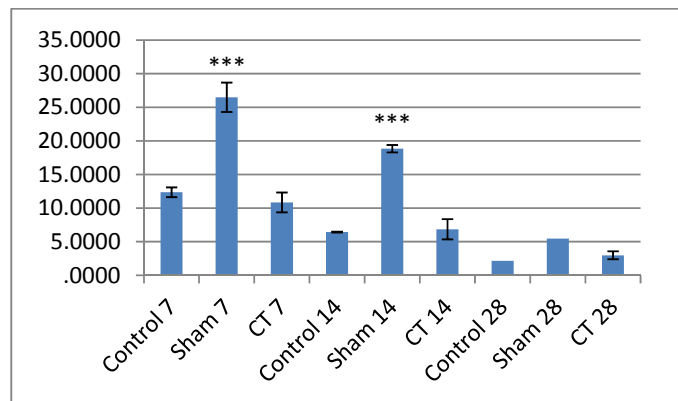
۲ و ۳ بافت‌های تمایز یافته اپیدرم، درم، هیپودرم، فولیکول‌های تازه تشکیل یافته مو، عروق خونی دیده شد.

نتایج

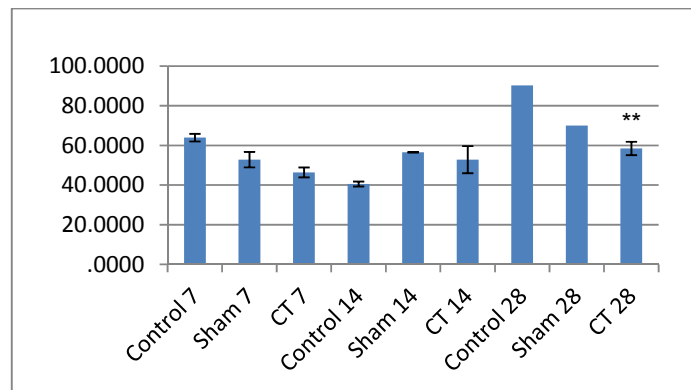
تصاویر ماکروسکوپی از محل زخم در گروه‌های آزمایشی بعد از گذشت مدت زمان تیمار، تأییدکننده جمع‌شدگی و بسته شدن کامل زخم در گروه‌های تیماری با نانوذره کیتوسان (تجربی) نسبت به گروه شاهد و کنترل می‌باشد. همچنین روند بهبود زخم در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل بهتر بود. در بررسی میکروسکوپی برشهای بافتی، بافت گرانوله و اپیتلیوم نازک، عدم تشکیل لایه کراتینه، بافت چربی و فولیکول‌های مو در گروه‌های کنترل مشاهده شد. ولی در محل ترمیم زخم گروه‌های تجربی ۱ و

ضخامت اپیدرم در گروه‌های شاهد و تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$). همچنین افزایش معنی‌دار ضخامت اپیدرم در گروه‌های شاهد نسبت به تجربی ۱ و ۲ مشاهده شد ($P < 0.001$). (نمودار ۱)

ضخامت درم در گروه‌های شاهد و تجربی نسبت به گروه کنترل افزایشی نشان داد که معنی‌دار نبود. همچنین افزایش ضخامت درم در گروه‌های شاهد نسبت به تجربی ۱ و ۲ مشاهده شد. (نمودار ۲)



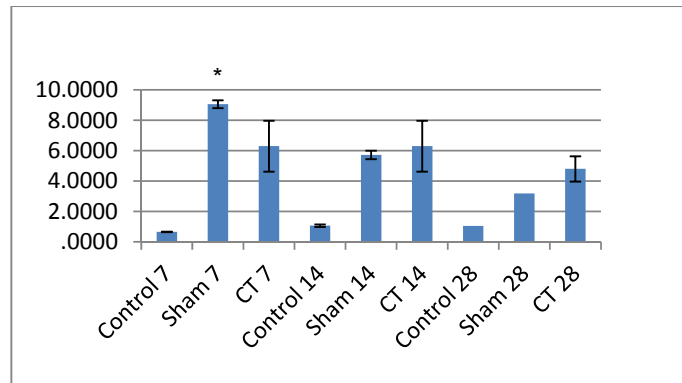
نمودار ۱- مقایسه ضخامت اپیدرم در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.05$ و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.01$ و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.001$)



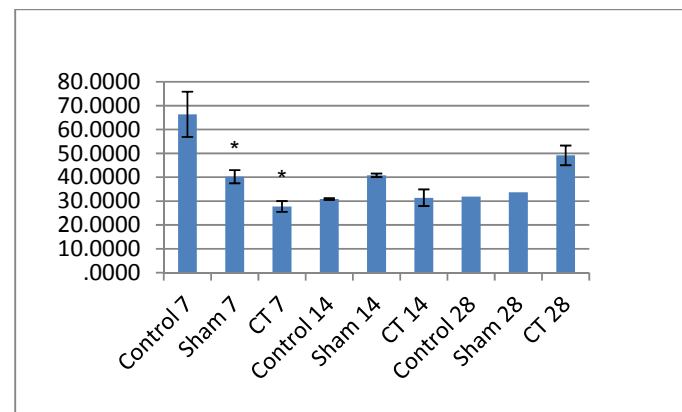
نمودار ۲- مقایسه ضخامت درم در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.05$ و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.01$ و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.001$)

ضخامت هیپودرم در گروه تجربی و شاهد ۲ نسبت به گروه کنترل ۲ و در گروه تجربی و شم ۳ نسبت به کنترل ۳ افزایش نشان می‌دهد (نمودار ۴).

ضخامت لایه کراتینه در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شاهد افزایش نشان داد. همچنین افزایش ضخامت لایه کراتینه در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ نسبت به گروه‌های شاهد ۲ و ۳ مشاهده گردید. (نمودار ۳)



نمودار ۳- مقایسه ضخامت لایه شاخی در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.05$ و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.01$ و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.001$)



نمودار ۴- مقایسه ضخامت هیپودرم در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.05$ و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.01$ و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.001$)

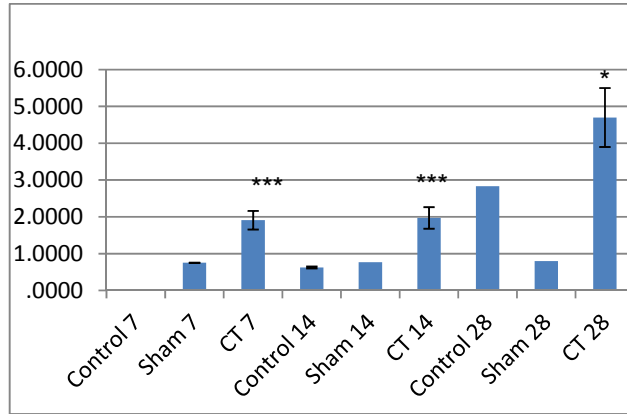
تعداد فولیکول‌های مو در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل ۱ و ۲ در سطح $P < 0.001$ نشان می‌دهد. گروه تجربی ۳ نیز نسبت به گروه کنترل ۳ افزایش معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ نشان می‌دهد (نمودار ۷).

جمع‌شدگی سطح زخم در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ و ۳ و شم ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ نسبت

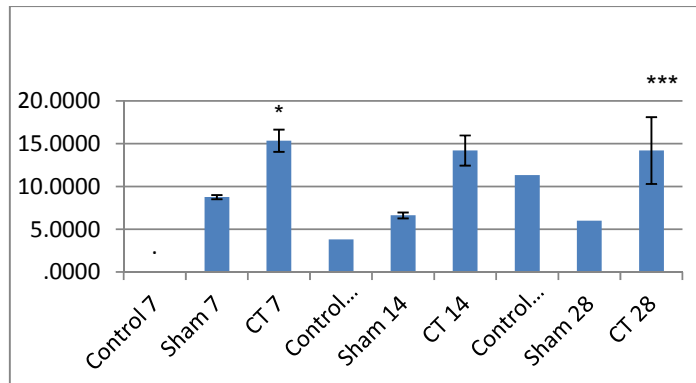
تعداد رگ‌های درمی گروه‌های تجربی ۱ و ۲ و ۳ در مقایسه با گروه کنترل ۱، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (نمودار ۵).

قطر رگ درمی در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه کنترل ۱ در سطح $P < 0.001$ افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. همچنین گروه تجربی ۱ نسبت به گروه تجربی ۱ در سطح $P < 0.05$ افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (نمودار ۶).

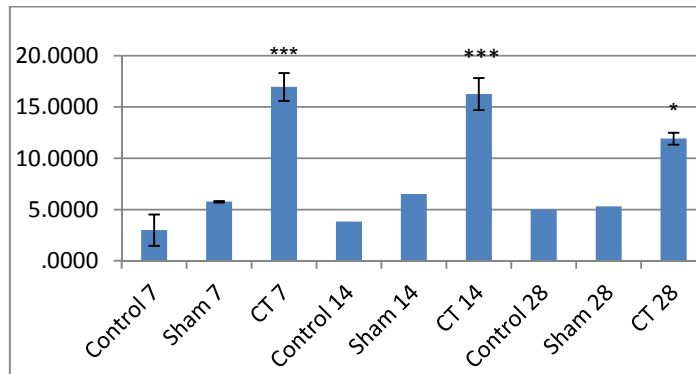
به گروه‌های کنترل داشته‌اند، همچنین گروه شام ۳ افزایش معنی‌داری در سطح (P<0.01) نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در گروه‌های تجربی نسبت به شام افزایش جمع شدگی بیشتری در سطح زخم قابل مشاهده است (نمودار ۸).



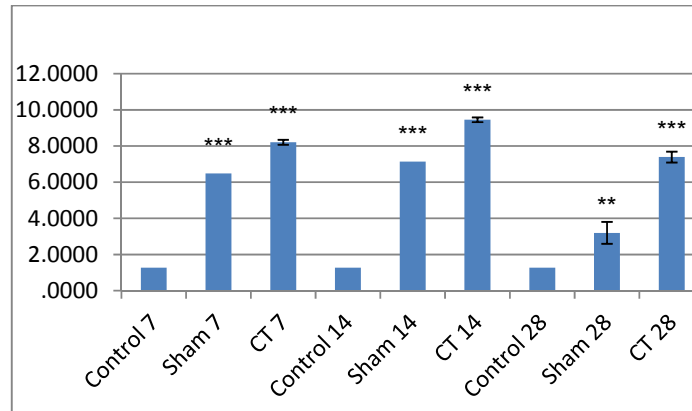
نمودار ۵- مقایسه تعداد رگهای درمی در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.05 و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.001 و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.01)



نمودار ۶- مقایسه قطر رگ درمی در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.05 و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.001 و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.01)



نمودار ۷- مقایسه تعداد فوولیکول مو در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (* دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.05 و ** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.001 و *** دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء P<0.01)



نمودار ۸- مقایسه مساحت زخم در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل (*دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.05$ و **دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.01$ و ***دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل به ازاء $P < 0.001$)

بحث

آسان آن و اثربخشی بالا یک عامل مناسب بهبود زخم در نظر گرفته شد (۵). بهبود زخم و تشکیل فولیکول مو در مطالعه انجام‌شده ما نیز قابل‌رؤیت است. در مطالعه ما، رگ‌زایی به‌وفور دیده می‌شود که حائز اهمیت است.

پانسمان زخمی متشکل از دولایه، لایه فوقانی هیدروژل کیتین کربوکسی متیل، لایه‌های پایین‌تر به‌عنوان ماده ضد میکروبی استفاده شد. لایه هیدروژل به‌عنوان یک مانع مکانیکی و میکروبی عمل می‌کند و قادر به جذب ترشحات زخم است. هیدروژل کربوکسی متیل کیتین، بطور قابل‌توجهی با جذب ۴ برابر وزن خود آب متورم شده و نیز بسیار متخلخل می‌گردد. نفوذ رطوبت از پانسمان مانع از تجمع مایع در زخم سوختگی درجه دوم می‌شود (۱۲) که از نظر ممانعت میکروبی و عفونی با مطالعه حاضر یکسان است.

مواد اسفنجی متخلخل حاوی سولفادیازین نقره، به منظور جلوگیری از عفونت باکتری‌ها در سطح زخم، مناسب برای پانسمان زخم از بتا-کیتین تهیه شد. نفوذپذیری اکسیژن از نمونه‌ها نسبتاً خوب بودند. ظرفیت کامل باکتریایی در برابر پسدوموناس آئروژینوزا را تا ۷ روز داشتند. مطالعه بافت‌شناسی، تکثیر فیبروبلاست‌ها در بستر زخم و کاهش

میزان رگ‌زایی یا آنژیوژنسیس و توسعه عروق خونی در واقع یکی از اساسی‌ترین عوامل مؤثر در امر ترمیم زخم است. در صورتی که عاملی بتواند در زمان مناسب تشکیل عروق خونی جدید را تحریک و تشدید نماید و خون‌رسانی به منطقه توقف را سبب شود می‌توان گفت که روند ترمیم با موفقیت پیش می‌رود و از عمیق شدن زخم جلوگیری می‌شود. آخرین گام در آنژیوژنسیس بلوغ سلولهای اندوتلیال و سازمان یافتن این سلولها برای تشکیل لوله‌های مویرگی است (۸). هیدروژل کیتین و کیتوسان به‌عنوان مواد پانسمان زخم استفاده شد. نتیجه، حساس‌تر بودن هیدروژل کیتین نسبت به کیتوسان در فعالیت آنزیم لیزوزیم بود. در برش زخم ایجادشده کیتین، کیتوسان، پودر کیتین و هیدروژل کیتین جاسازی شده بودند. پودر کیتین کارآمدتر از کیتین و کیتوسان به‌عنوان یک شتاب‌دهنده بهبود زخم مشاهده شد. زخم تحت درمان با هیدروژل کیتین به طور کامل دوباره اپیتلیزه شد، بافت‌های گرانوله تقریباً با فیروز و فولیکول مو جایگزین شدند و تقریباً ۷ روز پس از زخم اولیه درمان شد و پوست درمان شده بیشترین مقاومت کششی و آرایش الیاف کلاژنی را در پوست دارد که مشابه پوست طبیعی است. هیدروژل کیتین با توجه به کاربرد

از لبه انجام شده است. به نظر می‌رسد گروه سوم تحت درمان با کمپلکس پماد کیتوسان محلول در آب/ هپارین نسبتاً به صورت کامل درمان شده است (۱۰). مدت زمان ترمیم سوختگی در مطالعات ما کوتاهتر بود. در این مطالعه با توجه به وجود هپارین، توقف خونریزی مشهود بوده است.

زخم روی لاله گوش خرگوش ایجاد شد و با پماد کیتین مورد ترمیم قرار گرفت. استفاده از پماد کیتین محلول در آب به طور قابل توجهی سرعت ترمیم و انقباض زخم را افزایش می‌دهد. مناطقی از بافت پوششی و دانه‌های ریزبافتی که در مجاورت پماد کیتین محلول در آب بودند به صورت قابل ملاحظه‌ای بزرگتر از گروه کنترل و گروه شم بودند. تعداد زیادی از دانه‌های بافتی از جمله رسوب متراکم فیبروبلاست در زیر اپیتلیوم ضخیم در زخم تحت درمان با پماد کیتین محلول در آب رشد کرده بود. تعداد سلول‌های انتهایی به طور قابل توجهی در مقایسه با کسانی که در گروه شم و شاهد بودند کاهش یافته بود، نشان می‌دهد که کیتین محلول در آب می‌تواند محرک ترمیم زخم بوده و از تشکیل بیش از حد اسکار جلوگیری کند (۷). از نظر رشد درم نتایج یکسانی حاصل شد. فرایند آنژیوژنز، رشد لایه کراتینیزه و فولیکول‌های مو در مطالعه انجام شده ما، به وضوح قابل‌رویت است.

ماتریس نانوالیاف کیتوسان به عنوان داربست برای جایگزین پوست استفاده شد. مزایای استفاده از داربست، نفوذپذیری نسبت به اکسیژن با تخلخل بالا و شباهت ظاهری به ماتریکس خارج سلولی طبیعی در پوست است که به ترویج مهاجرت چسبندگی سلول و تکثیر می‌پردازد (۱۳). تشکیل اپیدرم، لایه شاخی و رگ با مطالعات انجام شده ما مطابقت دارد. اما در مطالعات ما رگها با تعداد بالا و کامل تشکیل شد و ضخامت لایه شاخی افزایش مشهودی داشت.

مشخص سلول‌های عفونی را تأیید کرد (۱۱). در مطالعات ما نیز افزایش تکثیر فیبروبلاست‌ها قابل مشاهده بود.

به منظور بررسی اثر شتاب‌دهندگی بر بهبود زخم، برشی در تمام ضخامت پوست پشت موش ایجاد شده و سپس محلول آبی کیتوسان فوتوکراس به زخم اضافه شد و تحت تابش اشعه ماوراءبنفش به مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفت. به طور قابل توجهی باعث انقباض زخم و تسریع بسته شدن و بهبود زخم در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده قرار گرفت، بررسی بافت‌شناسی میزان انقباض پیشرفته‌ای در ۲ روز اول و ترمیم نسبتاً کامل بافت در روز ۲ تا ۴ در زخم درمان شده با هیدروژل کیتوسان نشان داد (۹). بهبود زخم و انقباض آن با مطالعات انجام شده ما برابری می‌کند.

غشاهای کیتوسان نامتقارن حاوی سولفادیازین نقره توسط روش جداسازی فاز خشک/ مرطوب برای غلبه بر محدودیت‌های فعلی در کرم سولفادیازین نقره برای درمان زخم سوختگی حاد توسعه یافته بود. غشای کیتوسان نامتقارن که شامل یک پوست متراکم و لایه متخلخل اسفنج مانند است می‌تواند برای این غشا به عنوان پانسمان زخم مورد استفاده قرار گیرد. کرم سولفادیازین نقره به عنوان ضدباکتری به طور سنتی جهت پیشگیری از عفونت زخم مورد استفاده بوده است، با این حال مسئله مسمومیت بالقوه نقره مطرح شده است (۱۵) مهمترین خاصیت کیتوسان، عدم سمیت آن می‌باشد. در مطالعه مورد بررسی ما، نفوذ اکسیژن بررسی نشده است اما از نظر کنترل تبخیر رطوبت زخم یکسانند.

کمپلکس محلول در آب کیتوسان/ هپارین برای شتاب‌دهندگی مؤثر بهبود زخم آماده شد. پس از ۱۵ روز، بررسی بافت‌شناسی نشان داد که در گروه کنترل تیمار نشده به خوبی زخم در لبه بهبود یافته و توسط پوسته پوشیده شده بود. گروه دوم تحت درمان با پماد کیتوسان محلول در آب نشان داد اندازه زخم کوچک‌تر با مقدار کمتر از پوشش پوسته و لبه نامشخص که به نظر می‌رسد بازسازی

زخم‌های سوختگی میزان رگ‌زایی، میزان پیشروی اپیدرم از لبه سالم زخم، اندازه‌گیری ضخامت اپیدرم و درم و هیپودرم، تعداد فولیکول‌های مو، تعداد و قطر عروق تازه ساخته‌شده بود. در مشاهدات ماکروسکوپی، شاهد تسریع بهبود و جمع‌شدگی زخم در گروه‌های تجربی بودیم. ضخامت اپیدرم در گروه‌های تجربی و شم کاهش یافته بود. در ابتدا اسکار روی پوست تشکیل شد که جزئی از اپیدرم شده بود اما به مراتب با تأثیر نانوذره و بهبود فرایند ترمیم زخم، هرکدام از لایه‌های کراتینه و اپیدرم پوست به صورت مجزا شکل گرفتند. در گروه‌های تجربی و شم و نیز به میزان کمتر در گروه کنترل، تمایز و جایگزینی هیپودرم و توسعه سلول‌های چربی به زمان بیشتری نیاز دارد. هدف اصلی تحقیق حاضر تسریع روند ترمیم زخم با افزایش فعالیت آنژیوژنیزیس می‌باشد، اما برای بررسی بیشتر، ضخامت لایه‌های مختلف پوست و فاکتورهای دیگر مورد بررسی قرار گرفته را نیز اندازه‌گیری کردیم. هنگامی که محلول را روی زخم می‌ریزیم، چون موش حیوانی پرتحرک است، سریعاً با تکانی که به خود می‌دهد مایع را از پشت خود خارج می‌کند و در همان مدت کوتاه محلول فقط جذب لایه سطحی پوست یا همان اپیدرم می‌شود. پیش‌بینی می‌شود اگر طول مدت درمان طولانی‌تر شود و یا از این محلول پماد یا ژلی ساخته شود و روی زخم قرارگیرد ضخامت اپیدرم و همچنین ضخامت کل پوست بالاتر رود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه پرسنل مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران جهت اجرای این تحقیق، سپاسگزاری می‌شود. همچنین از پرسنل محترم شرکت دی پترونیک جهت تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی سپاسگزاری می‌شود.

هیدروژل دولایه متشکل از کیتوسان و آب تشکیل شد و جهت درمان جراحات سوختگی استفاده شد. آزمایشات در پوست خوک و بیوپسی در روز ۹، ۱۷، ۲۲، ۱۰۰ و ۲۹۳ انجام شد. تمام نتایج به دست آمده نشان داد که ترویج بازسازی بافت خوب است و منجر به مهاجرت التهابی سلول‌ها و فعالیت‌های رگ‌زایی می‌شوند. در روز ۲۲، کلاژن نوع یک و چهار در زیر بافت همبند ساخته شد و شکل‌گیری محل اتصال درم-اپیدرمی مشاهده شد. پس از ۱۰۰ روز، بافت جدید، به‌خصوص با جنبه‌های زیبایی‌شناختی آن و انعطاف‌پذیری زیاد آن کاملاً شبیه به پوست مادری بود (۴). از نظر رشد رگ‌زایی و ترمیم بافتهای پوشش هر دو مطالعه یکسان است با این تفاوت که در مطالعه ما طول دوره درمان بسیار کاهش یافته است.

برای بهبود سریع زخم، ورق هیدروژل متشکل از پودری مخلوط از آلژینات، کیتین/ کیتوسان و فوکوئیدان به‌عنوان پانسمان زخم استفاده شده است. بررسی بافت‌شناسی به‌طور قابل‌توجهی پیشرفت بافت گرانوله و شکل‌گیری مویرگی در زخم‌هایی که بهبودشان دچار اختلال شده بود و با ACF-HS (ورق هیدروژل متشکل از مخلوط پودری آلژینات، کیتین/ کیتوسان و فوکوئیدان) در روز ۷ تحت درمان قرارگرفتند، در مقایسه با کسانی که تحت درمان با فیبر آلژینات کلسیم و کسانی که بدون درمان مانده بودند، نشان می‌دهد (۱۶). شکل‌گیری عروق خونی و بافت گرانوله در هر دو مطالعه یکسان است. هر دو مطالعه این روند ترمیمی را در روز ۷ پس از جراحی نشان می‌دهند.

نقش کیتوسان در ترمیم زخم سوختگی به‌طور کامل مشخص نشده است و تاکنون از آثار سودمند و مضر آن گزارش‌های متعددی منتشر شده است. شاخص‌های اصلی برای بررسی هیستوپاتولوژی اثرهای ترمیمی کیتوسان در

منابع

۱. پرور، ک.، یغمایی، پ.، حیاتی‌رودباری، ن.، و محمدی‌محقق، پ.، ۱۳۹۰. مشاهده اثر استفاده توأم موضعی و خوراکی کمپوچا

- آبادان، اولین همایش ملی علوم و فناوری نانو، باشگاه پژوهشگران جوان واحد اهواز، ۷ صفحه.
۳. شیخ الاسلامی، ز.، ۱۳۹۰. استفاده‌های صنعتی کیتوسان، مجله علوم و صنایع پلاستیک، لاستیک و کامپوزیت. ماهنامه علوم و صنایع پلیمر، سال سیزدهم. شماره ۶ (پیاپی ۱۱۰)، ۱۰۸ صفحه، صفحه ۹۲.
4. Boucard, N., Vitona, C., Agayb, D., Maric, E., Rogerc, T., Chancerelleb, Y., and Domard, A., 2000. the use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 28, PP: 3478-3488.
5. Cho, Y.W., Cho, Y.N., Chung, S.H., Yoo, G., and Ko, S.W., 1999. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials*, 20, PP: 2139-2145.
6. Geerligs M, Breemen L, Peters G, Ackermans P Baaijens F and Oomens C., April, 2011. *In vitro* indentation to determine the mechanical properties of epidermis. *Journal of Biomechanics*. Volume 44, Issue 6, 7, PP: 1176-1181.
7. Han, S.S., 2005. Topical formulations of water-soluble chitin as a wound healing assistant evaluation on open wounds using a rabbit ear model. *Fibers and Polymers*, 6, PP: 219-223.
8. Herndon, D., ed., "Chapter 1: A Brief History of Acute Burn Care Management". *Total burns care* (4th Ed.). Edinburgh: Saunders.
9. Ishihara, M., Nakanishi, K., Ono, K., Sato, M., Kikuchi, M., Saito, Y., Yura, H., Matsui, T., Hattori, H., Uenoyama, M., and Kurita, A., 2002. Photo cross linkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, 23, PP: 833-840.
10. Kweon, D.K., Song, S.B., and Park, Y.Y., 2003. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, 24, PP: 1595-1601.
11. Lee, Y.M., Kim, S.S., Park, M.H., Song, K.W., Sung, Y.K., and Kang, I.K., 2000. Beta-chitin-based wound dressing containing silver sulfurdiazine. *J Mater Sci Mater Med*, 11, PP: 817-823.
- بر ترمیم جراحتهای ناشی از سوختگی درجه سوم در موشهای صحرایی بالغ، مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره ۲۲، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۱.
۲. خلیلی بروجنی، م، انوری پور، ب، متوسل، م، و جدیدی، ن، ۱۳۹۱. تولید نانو ذرات کیتوسان و بررسی عوامل مؤثر بر سایز نانو ذرات، دانشکده نفت شهید تندگویان، دانشگاه صنعت نفت
12. Loke, W.K., Lau, S.K., Yong, L.L., Khor, E., and Sum, C.K., 2000. Wound dressing with sustained antimicrobial capability. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*; 53: 8-17.
13. Mattioli-Belmonte M, Zizzi A, Lucarini G, Giantomassi F, Biagini G, Tucci G, Orlando F, Provinciali M, Carezzi F, Morganti P. 2007, Chitin nanofibrils linked to chitosan glycolate as spray, gel and gauze preparations for wound repair. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 22: 525-538.
14. Mezzana, P., 2008. Clinical efficacy of a new chitin nanofibrils-based gel in wound healing. *International journal of plastic surgery Acta Chir Plast (Acta chirurgiae plasticae)*, 50(3), PP: 81-4.
15. Mi, F.L., Wu, Y.B, Shyu, S.S., Chao, A.C., Lai, J.Y., and Su, C.C., 2003. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: A new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science*; 212, PP: 237-254.
16. Murakami, K., Aoki, H., Nakamura, S., Nakamura, S.I., Takikawa, M., Hanzawa, M., Kishimoto, S., Hattori, H., Tanaka, Y., Kiyosawa, T., Sato, Y., and Ishihara, M., 2010. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 31, PP: 83-90.
17. Peck, M.D., 2011. "Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors". *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 37 (7), PP: 1087-100. DOI: 10.1016/j.burns.2011.06.005. PMID 21802856.

Effect of Chitosan Nanoparticles in the treatment of burns

Jabbari N., Parivar K. and Hayati Roodbari N.

Basic Science Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Burns are one of the slowest healing wounds. Proper treatment and care for the wound to accelerate healing, preventing chronic infection has always been considered. Chitosan, Derivative of glucan, with repeating structural units of chitin, has natural cellulose that is biocompatible and biodegradable. 42 adult male NMRI mice were randomly assigned to experimental and control groups and sham. Sterile conditions and general anesthesia, a circular lesion with a diameter of 1 cm full thickness of the skin was created on the back of each mouse. Surgery day was considered as day zero. From day one every day, all animals were treated topically with a solution of chitosan nanoparticles. Mice on days 7, 14, 28 after daily treatment killed with chloroform and wounds and adjacent skin samples from each mouse were removed. Histological studies were performed. On the samples. The findings of the study's data shows that the number and diameter of the significance level of $P < 0.001$ compared to the control group, There has been a significant increase According to these results it can be said chitosan nanoparticles have a positive effect on angiogenesis and further research on nano materials may be obtained for further advances in wound healing

Key words: Burn, chitosan nanoparticles, repair, skin, *NMRI*, mice