

## بررسی اثر اسید رتینوئیک موضعی بر ترمیم زخم در موش دیابتی

دکتر فرزانه دلگشایی\*، محمدرضا خاکزاد\*\*، دکتر کامران غفارزادگان\*\*\*، دکتر جمشید یوسفی\*\*\*\*

دریافت: ۸۹/۸/۵، پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** زخم های مزمن هنوز یک مشکل جدی در بیماران مراجعه کننده به متخصصین پوست و جراحان پلاستیک می باشد. دیابت یک علت شایع تاخیر و یا اختلال در ترمیم زخم است. ۱۵٪ افراد مبتلا به دیابت دچار زخم اندام تحتانی می شوند. زخم های دیابتیک اندام تحتانی با موربیدیتی بالا همراه است. اسید رتینوئیک یک مشتق ویتامین A می باشد که اثر قابل توجهی در پرولیفراسیون سلولی و تمایز پروتئین های خارج سلولی بافت همبند دارد. گزارشات در باره اثر آن در ترمیم زخم کنترال و سیال است. بهمین منظور این مطالعه با هدف تعیین اثر اسید رتینوئیک بر ترمیم زخم در موش دیابتی انجام گرفت. **روش کار:** این مطالعه از نوع مورد-شاهدی می باشد که بر روی ۸۸ رت نر با نژاد Wistar انجام شد. پس از دیابتی انجام کردن حیوانات موش ها به دو دسته تقسیم شدند. در هر دو گروه یک زخم تمام ضخامت در سطح پشتی ایجاد شد. در گروه مورد سطح زخم روزانه با لوسیون تره تینوئین ۰/۱٪ و در گروه شاهد با نرمال سالین آغشته می شد. سپس هر دو گروه در روزهای ۵ و ۱۰ و ۱۵ مورد بررسی ماکروسکوپی و بافت شناسی قرار گرفتند و اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمونهای آماری ANOVA و t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**نتایج:** در بررسی ماکروسکوپی زخم ها در گروه تحت درمان با تره تینوئین، در روزهای پنجم و دهم در مقایسه با گروه شاهد، تسریع در ترمیم زخم مشاهده شد. (به ترتیب  $P=0.002$  و  $P=0.001$ ) اما در روز پانزدهم این اثر قابل توجه نبود ( $P=0.212$ ). در بررسی بافت شناسی در روز پنجم، در گروه مورد افزایش بافت جوانه ای و افزایش ضخامت اپیدرم و کلاژن مشاهده شد اما از نظر آماری قابل توجه نبود (به ترتیب  $P=0.417$  و  $P=0.999$  و  $P=0.470$ ) در روز دهم نیز این افزایش به طور نسبی وجود داشت اما از نظر آماری قابل توجه نبود (به ترتیب  $P=0.400$  و  $P=0.999$  و  $P=0.999$ ) **نتیجه نهایی:** با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده می شود که درمان موضعی با تره تینوئین در زخم های دیابتیک می تواند موجب تسریع در ترمیم زخم شود.

**کلید واژه ها:** التیام زخم / تریتینوئین / دیابت شیرین / موش

### مقدمه:

تحتانی افزایش فشار وریدی، بیماریهای شریانی و دیابت می باشد (۱).

دیابت، یک علت شایع تاخیر و یا اختلال در ترمیم زخم می باشد. ۱۵٪ افراد مبتلا به دیابت ملیتوس دچار زخم اندام تحتانی می شوند. زخم های دیابتیک اندام تحتانی با موربیدیتی بالا همراه است بطوریکه ۲۴-۱۴٪ بیماران، بالاخره دچار قطع عضو می شوند (۱). نوروپاتی محیطی و بیماریهای عروق محیطی،

زخم های مزمن هنوز یک مشکل جدی در بیماران مراجعه کننده به متخصصین پوست و جراحان پلاستیک می باشد. زخم های مزمن به دلایل متفاوتی ایجاد می شوند که شامل زخم های فشاری، زخم های به دنبال سوختگی و زخم های اندام تحتانی و ... می باشند. زخم های اندام تحتانی ۱٪ جمعیت بالغین و ۳/۶٪ افراد بالای ۶۵ سال را مبتلا می کند. علل اصلی زخم های اندام

\* استادیار گروه پوست دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد (f\_delgoshai@yahoo.com)

\*\* عضو هیأت علمی گروه ایمونولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

\*\*\* متخصص پاتولوژی

\*\*\*\* استادیار گروه کودکان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

پس از اتمام مرحله مقدماتی، مطالعه اصلی آغاز شد.

نمونه هایی که دیابتیک بودن آنها توسط آزمایش قند خون ثابت شده بود انتخاب شده و به صورت تصادفی در دو گروه، گروه A (گروه مورد) و گروه B (گروه شاهد) تقسیم شدند. در هر دو گروه، پس از بیهوش کردن حیوان، یک زخم تمام ضخامت (توسط پانچ بیوپسی ۶ میلی متری) در سطح پشتی در مجاورت ستون فقرات ایجاد شد.

در گروه A زخم پوستی از روز اول توسط لوسیون ترینوئین ۰/۱ درصد روزی یکبار تحت درمان قرار گرفت. در گروه B از محلول نرمال سالین استفاده گردید.

هر دو گروه A و B به سه دسته تقسیم شدند. دسته اول به مدت ۵ روز، دسته دوم به مدت ۱۰ روز و دسته سوم به مدت ۱۵ روز تحت درمان های ذکر شده در بالا قرار گرفتند. پس از اتمام طول دوره درمان، در هر گروه پس از بیهوش کردن حیوان، بزرگترین قطر زخم با خط کش اندازه گیری شده و از محل زخم عکس تهیه گردید.

سپس محل زخم به ابعاد  $2 \times 2$  سانتی متر و عمق ۲ سانتی متر برداشته شد و مورد بررسی آسیب شناسی (با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین) قرار گرفت. نمونه های بافت شناسی از نظر توزیع بافت جوانه ای، ضخامت اپیدرم و کراتینه شده شدن، تراکم فیبروبلاست ها و ضخامت کلاژن بررسی شده و رتبه بندی ۰، ۱، ۲، ۳ به ترتیب انجام شد (۰ = فقدان، ۱ = کم، ۲ = متوسط، ۳ = زیاد).

در خاتمه یافته ها با استفاده از روش ANOVA و به وسیله student t-test تجزیه و تحلیل شدند و P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

### نتایج:

۷۲ ساعت پس از تزریق استرپتوزوتوسین، میانگین سطح گلوکز سرم، ۴۴۰ میلی گرم در دسی لیتر و میانگین وزن حیوان  $300 \pm 10$  گرم بود.

در بررسی ماکروسکوپی زخم ها، در روز پنجم پس از ایجاد زخم، در گروه A اندازه زخم به  $3/37$  میلی متر و در گروه B به  $4/33$  میلی متر کاهش یافت و در مقایسه آماری  $P = 0/002$  به دست آمد (تصویر ۱).

فاکتورهای زمینه ای در ایجاد زخم دیابتیک هستند اما آتروفی پوست که موجب می شود مقاومت کمتری نسبت به ایجاد زخم پیدا کند نیز یک فاکتور مسئول در بعضی موارد می باشد.

اسید رتینوئیک، یک مشتق ویتامین A شناخته شده است که اثر قابل توجهی در پرولیفراسیون سلولی و دیفرانسیاسیون پروتئین های خارجی سلولی بافت همبند دارد. در کمبود ویتامین A، پروسه ترمیم زخم به تاخیر می افتد (۱).

گزارشات درباره اثر اسید رتینوئیک در ترمیم زخم کنترال و سیال است. مصرف سیستمیک اسید رتینوئیک اثرات تخریب کننده در زخم های تمام ضخامت در مدل های حیوانات دیابتیک داشته است. اما پاپ و همکارانش نشان دادند که بهبود زخم های تمام ضخامت در انسان توسط تره تینوئین موضعی سریع می شود (۲) کیتانو و همکارانش گزارش کردند که درمان قبلی با ترانس رتینوئیک اسید ترمیم زخم های آسیب دیده را در موش های دیابتیک برگشت می دهد (۳) گرچه هانگ نشان داد که تره تینوئین به دلیل ایجاد التهاب مقاوم در دم سبب تاخیر در ترمیم زخم و اپی تلیالیزه شدن مجدد می شود (۴).

با توجه به گزارشات متناقض بر آن شدیم تا این مطالعه را انجام داده و اثر اسید رتینوئیک موضعی را در ترمیم زخم های دیابتیک در مدل حیوانی بررسی کنیم.

### روش کار:

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی می باشد که بر روی ۴۸ عدد رت نر با نژاد wistar انجام شد. به منظور به دست آوردن دوز مناسب دارو جهت القاء دیابت در حیوان، ابتدا یک مطالعه مقدماتی اولیه انجام شد و در این مطالعه مقدماتی، موش های نر نژاد wistar دارای وزن  $300 \pm 10$  گرم را به صورت تصادفی انتخاب کرده، پس از بیهوش کردن حیوان با استفاده از محلول کتامین و گزایلازین، ماده استرپتوزوتوسین محلول در سیترات سدیم، با دوز ۶۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن، تزریق شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق، سطح گلوکز سرم در حیوان اندازه گیری شد. موش هایی که گلوکز سرم آنها بیش از ۳۰۰ میلی گرم در دسی لیتر بود به عنوان حیوان دیابتیک انتخاب شدند. نمونه هایی که سطح سرمی گلوکز آنها کمتر از ۳۰۰ میلی گرم در دسی لیتر بود از مطالعه حذف شدند.

**جدول ۱: تغییرات بافت شناسی در روز پنجم در گروه مورد و شاهد**

ارزش P	تعداد	شدت تغییر بافت شناسی				
		+۳	+۲	+۱	۰	
						توزیع بافت جوانه ای
۰/۴۱۷	۷	۰	۷	۰	۰	A
	۵	۰	۴	۰	۱	B
						ضخامت اپیدرم
۰/۹۹۹	۷	۰	۱	۱	۵	A
	۵	۰	۰	۰	۵	B
						ضخامت کراتینیزه شدن
۰/۲۰۵	۷	۰	۰	۳	۴	A
	۵	۰	۰	۰	۵	B
						دانسیته فیبروبلاست ها
۰/۴۱۷	۷	۰	۷	۰	۰	A
	۵	۰	۵	۰	۰	B
						ضخامت کلاژن
۰/۴۷۰	۷	۰	۱	۴	۲	A
	۵	۰	۰	۵	۰	B

A: (تحت درمان با تره تینوئین) گروه مورد  
B: (تحت درمان با نرمال سالین) گروه شاهد

**جدول ۲: تغییرات بافت شناسی در روز دهم در گروه مورد و شاهد**

ارزش P	تعداد	شدت تغییر بافت شناسی				
		+۳	+۲	+۱	۰	
						توزیع بافت جوانه ای
۰/۴۰۰	۴	۰	۱	۰	۳	A
	۶	۰	۰	۰	۶	B
						ضخامت اپیدرم
۰/۹۹۹	۴	۳	۰	۱	۰	A
	۶	۵	۰	۱	۰	B
						ضخامت کراتینیزه شدن
۰/۹۹۹	۴	۲	۱	۰	۱	A
	۶	۴	۱	۰	۱	B
						دانسیته فیبروبلاست ها
۰/۹۹۹	۴	۰	۴	۰	۰	A
	۶	۰	۵	۰	۱	B
						ضخامت کلاژن
۰/۹۹۹	۴	۰	۳	۱	۰	A
	۶	۱	۴	۰	۱	B



تصویر ۱: موش دیابتیک تحت درمان با تره تینوئین در روز پنجم پس از ایجاد زخم

در بررسی روز دهم، اندازه زخم در گروه A به ۰/۵۸ میلی متر و در گروه B به ۳/۷۹ میلی متر رسیدند. در مقایسه آماری  $P = ۰/۰۰۱$  بدست آمد.

در بررسی روز پانزدهم در گروه A اندازه زخم ۰/۴۲ میلی متر و در گروه B ۰/۷۳ میلی متر بود. در بررسی آماری  $P = ۰/۲۱۲$  بدست آمد (تصویر ۲).



تصویر ۲: موش دیابتیک تحت درمان با تره تینوئین در روز پانزدهم پس از ایجاد زخم

نتایج بررسی های بافت شناسی در جداول ۱، ۲، ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: تغییرات بافت شناسی در روز پانزدهم در گروه

ارزش P	مورد و شاهد				
	شدت تغییر				
	بافت شناسی				
تعداد	+۳	+۲	+۱	۰	
	توزیع بافت جوانه ای				
۰/۹۹۹	۶	۰	۰	۱	۵
	۳	۰	۰	۰	۳
	ضخامت اپیدرم				
۰/۳۳۳	۶	۵	۱	۰	۰
	۳	۳	۰	۰	۰
	ضخامت کراتینه شدن				
۰/۹۹۹	۶	۵	۱	۰	۰
	۳	۳	۰	۰	۰
	دانسیته فیبروبلاست ها				
۰/۹۹۹	۶	۰	۶	۰	۰
	۳	۰	۲	۱	۰
	ضخامت کلاژن				
۰/۹۹۹	۶	۱	۵	۰	۰
	۳	۱	۲	۰	۰

**بحث:**

تره تینوئین مشتقی از ویتامین A می باشد که به طور وسیعی در درمان آکنه وولگاریس و پیری پوست استفاده می شود و اثرات عمیقی بر تمایز سلولی، رگ سازی، سنتز کلاژن جدید و فیبروپلازی دارد. از نظر بافت شناسی، درمان موضعی با تره تینوئین، از طریق افزایش عروق درم و تهاجم سلول های التهابی موجب هیپرتروفی در اپیدرم و درم می شود(۲).

بیش از ۵۰ سال است که مطالعات در زمینه اثر ویتامین A در مراحل ترمیم زخم انجام می شود(۳).

مطالعات متعددی در تاثیر تره تینوئین در ترمیم زخم های آسیب دیده و یا زخم های غیر آسیب دیده انجام شده است. هین و همکارانش مهار قابل توجهی را در پرولیفراسیون فیبروبلاست ها در این ویترو مشاهده کردند که به طور مستقیم بستگی به غلظت رتینوئید داشت(۵). در دیگر مطالعات دیده شده که تره تینوئین پرولیفراسیون فیبروبلاست و نیز سنتز کلاژن را کاهش می دهد(۶).

علیرغم این یافته ها باسکا و همکارانش افزایش تولید کلاژن، رگ سازی و بافت جوانه ای را تحت درمان با تره تینوئین نشان دادند(۷).

از طرف دیگر نشان داده شده است که اضافه کردن

تره تینوئین بعضی از اثرات جانبی درمان با استروئید، دیابت و رادیاسیون بر روی ترمیم زخم را بر می گرداند(۸-۱۰).

در مطالعه کیتانو و همکارانش، در بررسی قبلی با ترمیم زخم در موش های دیابتیک مشاهده نمودند که درمان موضعی با اسید رتینوئیک با هیپرتروفی قابل توجه اپیدرم و درم، ایجاد عروق جدید و انوازیون سلولهای التهابی بیشتر همراه بوده است(۳).

در مطالعه لاتف و همکارانش مشاهده شد که زخمهای موش های دیابتیک که تحت درمان با ترانس رتینوئیک اسید بودند، سریعتر از گروهی که با حامل درمان شده بودند بسته شده است. در بررسی بافت شناسی نیز ماتریکس متراکم تر با سلول های دوکی شکل فراوان تر در زخم ترمیم شده مشاهده شد(۱۱).

در یک مطالعه که توسط تام و همکارانش انجام شد اثر درمان موضعی با تره تینوئین در زخم های پای دیابتیک ها بررسی شد و مشاهده گردید که در ۴۸٪ افراد تحت درمان با تره تینوئین و در گروه کنترل در ۱۸٪ زخمها بطور کامل بهبود یافتند. هم چنین بطور قابل توجهی، وسعت زخم و عمق زخم در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. بنابراین مصرف موضعی تره تینوئین به مدت کوتاه، بهبود زخم های دیابتیک را تسریع می کند(۱۲).

در مطالعه دیگری که توسط پاکوتا و همکارانش انجام شد مشاهده گردید که درمان با تره تینوئین به مدت یک هفته، سبب افزایش بافت جوانه ای بخصوص در لبه های زخم شده است. پس از ۴ هفته درمان، تحریک بیشتر بافت جوانه ای، بافت عروقی جدید، و سنتز کلاژن جدید مشاهده شد(۱۳).

در مطالعه حاضر، مصرف موضعی تره تینوئین در روز پنجم پس از ایجاد زخم، به طور معنی داری سبب تسریع ترمیم زخم شده است. هم چنین در روز دهم نیز به طور قابل توجهی در ترمیم زخم و تسریع در کاهش اندازه زخم موثر بوده است اما در روز پانزدهم، گرچه مصرف تره تینوئین سبب تسریع در کاهش اندازه زخم شده ولی این اثر در مراحل آخر ترمیم زخم خیلی قابل توجه نمی باشد. بنابراین در مراحل آخر ترمیم زخم اثر زیادی از تره تینوئین مشاهده نشد که این یافته ها با مطالعات تام و لاتف مطابقت دارد.

هم چنین در مطالعه حاضر در بررسی بافت شناسی در

**منابع:**

- McGrath JA, Breathnach SM. Wound healing. In: Rook's textbook of dermatology. 7th ed. Vol 1. New York: Blackwell, 2004:1-11,25.
- Popp C, Kligman AM, Stoudemayer TJ. Pre-treatment for photoaged skin with topical tretinoin accelerates healing of full-thickness wounds. *Br J Dermatol* 1995;132 : 46-53.
- Kitano Y, Yoshimura K, Uchida G, Sato k , Harii K. Pretreatment of topical all-trans acid is beneficial for wound healing in genetically diabetic mice . *Arch Dermatol Res* 2001; 293:214-215.
- Hung VC, Lee JY , Zitelli JA, Hebda PA. Topical tretinoin and epithelial wound healing . *Arch Dermatol* 1989;125 : 65-9.
- Hein R , Mensin H , Muller PK , Braun-Falco O , Krieg T. Effect of vitamin A and its derivatives on collagen production and chemotactic response of fibroblasts. *Br J Dermatol* 1984;111 : 37-44.
- Meisler NT, Parelli J, Gendimenico GJ, Mezick J A, Cutroneo KR . All trans-retinoic acid inhibition of pro-alpha 1 collagen gene expression in fetal rat skin fibroblasts : identification of a retinoic acid response element in the pro – alpha 1 collagen gene. *J Invest Dermatol* 1997;108: 476-81.
- Baska PY, Eroglu E, Altuntas F, Baska K, Sutcu R. Comparison of the effects of tretinoin , adapalen and collagenase in an experimental model of wound healing . *Eur J Dermatol* 2002; 12 : 145-8.
- Haws M, Brown RE , Suchy H , Roth A. Vitamin A-soaked gelfoam sponges and wound healing in steroid treated animals. *Ann Plast Surg* 1994; 32: 418 – 22.
- Frosch PJ , Gzarnetzi BM. Effect of retinoids on wound healing in diabetic rats. *Arch Dermatol Res* 1989; 281 : 242 – 6.
- Levenson S M , Gruber CA , Rettura G , Demetriou AA , Seiffer E. Supplemental vitamin A prevents the acute . radiation induced defect in wound healing . *Ann Surg* 1984;200: 494-512.
- Lateef H, Abatan OI, Nadeem Aslam M, Stevens MJ, Varani J. Topical pretreatment of diabetic rats with all-trans retinoic acid improves healing of subsequently induced abrasion wounds . *Diabetes* 2005; 54: 855-861.
- Tom WL, Peng DH, Allaei A, Hsu D, Hata TR . The effect of short-contact topical tretinoin therapy for foot ulcers in patients with diabetes. *Arch Dermatol* 2005;141: 1373-1377.
- Paquette D, Badiavas E, Falanga V. Short-contact topical tretinoin therapy to stimulate granulation tissue in chronic wounds. *J Am Acad Dermatol* 2001;45 : 382- 6.

موش های دیابتیک مشاهده شد که در روز پنجم، مصرف موضعی تره تینوئین به طور نسبی با افزایش بافت جوانه ای و افزایش ضخامت اپیدرم و ضخامت کلاژن همراه بوده است. اما این یافته ها در بررسی از نظر آماری قابل توجه نبودند. در روز دهم نیز افزایش بافت جوانه ای و افزایش ضخامت اپیدرم و ضخامت کلاژن به طور نسبی مشاهده شد اما از نظر آماری قابل توجه نبود. این یافته ها نیز با مطالعه پاکوتا مطابقت دارد که افزایش بافت جوانه ای را در زخم های دیابتیک تحت درمان با تره تینوئین مشاهده نمود.

در این مطالعه به دلیل محدودیت در رنگ آمیزی اختصاصی بافت، بررسی بافت شناسی فقط با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین انجام شده پیشنهاد می شود که در مطالعات آینده رنگ آمیزی های اختصاصی شامل رنگ آمیزی ماسون تری کروم جهت بررسی رسوب کلاژن و رنگ آمیزی ایمونوپراکسید از جهت بررسی عروق نیز انجام شود تا بتوان بررسی بافت شناسی کامل تری انجام داد.

همچنین یکی از روش های بررسی زخم، علاوه بر اندازه گیری قطر زخم، بررسی قدرت کششی سطحی زخم توسط دستگاه تانسیومتر می باشد که در مطالعه حاضر، به دلیل عدم دسترسی به این دستگاه این اقدام انجام نشد.

**نتیجه نهایی:**

با توجه به اطلاعات به دست آمده مشاهده گردید که درمان موضعی با تره تینوئین در زخم هایی که اختلال در ترمیم دارند (زخم های دیابتیک) می تواند موجب تسریع در ترمیم زخم شود.

**سپاسگزاری:**

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که هزینه انجام این طرح تحقیقاتی را قبول فرمودند تشکر می نمایم. هم چنین از پرسنل زحمتکش اتاق حیوانات دانشکده و بخش سمعی و بصری دانشکده که در تهیه عکس از حیوانات ما را یاری نمودند قدردانی می نمایم.