نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۱؛ ۱۶(۱): ۷۱-۸۰.
https://doi.org/10.22034/ijvcs.2022.13205.0

بررسی اثرات درمانی اُزُن‌تراپی به روش تزریق داخل صفاقی بر ترمیم زخم پوست در مدل تجربی خرگوش

احسان فرقانی[۱]، سیاوش شریفی[۲*]، ایرج کریمی[۳]، امین بیغم صادق[۲]، موسی جاودانی[۲]

۱. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۸ آذرماه ۱۴۰۰ **پذیرش:** ۲۲ فروردین‌ماه ۱۴۰۱

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تجویز داخل صفاقی ازن بر بهبود زخم آزمایشگاهی در یک مدل حیوانی خرگوش بود. در این مطالعه۴۰ خرگوش نیوزلندی برای جراحی انتخاب شدند. برای عمل جراحی، در سمت راست مهره های قفسه سینه هر خرگوش، با پانچ جراحی پوست، یک زخم گرد به ضخامت کامل و ۱۰ میلی متر ایجاد شد. خرگوش‌ها به طور تصادفی به دو گروه مساوی کنترل و ازن تقسیم شدند. در گروه دریافت کننده اُزُن تا سه روز بعد از عمل جراحی، روزانه یک دوز اُزُن و بعد از روز سوم به صورت یک روز درمیان تا روز چهاردهم، اُزُن به روش تزریق داخل صفاقی تجویز شد. در گروه کنترل نیز به میزان گروه دریافت کننده اُزُن، محلول نرمال سالین به صورت تزریق داخل صفاقی در روزهای ذکرشده تجویز شد. مساحت زخم‌ها از نظر ماکروسکوپی در روزهای ۲، ۵، ۹و ۱۴ بررسی شد. از نظر هیستوپاتولوژی در روزهای یاد شده از هر گروه تعداد ۵ زخم بررسی شد. نتایج ماکروسکوپی نشانگر تفاوت میان دو گروه بود. در گروه دریافت‌کننده اُزُن، در تمامی روزها، مساحت زخم به صورت معنی‌دار ($P>0/05$) از گروه شاهد کمتر بود. در ارزیابی هیستوپاتولوژی به روش(Abramov) میزان التهاب به صورت معنی‌دار در گروه دریافت‌کننده‌ی اُزُن کمتر بود. در روز ۱۴ میزان عروق‌زایی گروه شاهد به صورت معنی‌دار از گروه دریافت کننده‌ی اُزُن بیشتر بود. از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که اُزُن‌تراپی به صورت سیستمی، موجب افزایش کیفیت روند ترمیم زخم می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پوست، ترمیم زخم، اُزُن، خرگوش، تزریق داخل صفاقی.

مقدمه

ترمیم زخم یکی از مباحث مهم علم پزشکی است که همواره موضوع پژوهش و بررسی پژوهشگران قرار گرفته است تا به نحوی روند ترمیم زخم، سرعت و کیفیت بالاتری پیدا کند.

پوست ارگانی که سطح خارجی بدن را پوشانده است، پیچیده است و به عنوان سدی عمل می‌کند که جلوی نفوذ میکروارگانسیم‌ها و مواد شیمیایی را می‌گیرد و علاوه بر آن مانع از دست رفتن آب و الکترولیت‌ها می‌شود؛ از این رو عامل مهمی در حفظ هموستاز بدن محسوب می‌شود (۱۴).

زخم را می‌توان نوعی شکافتگی یا نقصان در پوست تعریف‌کرد که ممکن‌است ناشی‌از صدمات‌فیزیکی،شیمیایی و بیولوژیک باشد (۱۶).

فرایند ترمیم زخم به طور کلی به چهار فاز تقسیم می‌شود؛ مرحله هموستاز شامل انقباض عروقی، اجتماع پلاک‌ها و ترومبوز است؛ مرحله التهابی شامل نفوذ نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژ است. مرحله تکثیر شامل ساخت بافت پوششی، عروق‌زایی و ساخت کلاژن است. مرحله بازسازی شامل ساخت ماتریکس خارج سلولی و بازآرایی کلاژن و عروق است. عوامل مختلفی در روند ترمیم زخم دخیل هستند که به دو دسته عوامل موضعی و عمومی تقسیم می‌شوند؛ موضعی شامل عفونت، نوع بخیه، ضربه و.. است. فاکتورهای سیستمیک شامل سن، جنسیت، استرس، دیابت، فاکتورهای تغذیه‌ای، داروهای شیمیایی مانند ضدالتهاب‌های استروئیدی و... است؛ از این

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: drsharifisiavash94@gmail.com

رو می‌توان نتیجه گرفت که مطالعات ترمیم زخم نیز به دو دسته مطالعه بر تاثیر عوامل عمومی و تاثیر عوامل موضعی تقسیم می‌شود (۹).

اُزُن گازی بی رنگ و ناپایدار است که از سه اتم اکسیژن تشکیل شده است و دلیل ناپایداری آن ساختار مزومریک آن است (۱۰ و ۱۲).

به تازگی مطالعات روی اثرات درمانی اُزُن افزایش یافته و پژوهشگران به تاثیرات متعدد درمانی در این زمینه دست یافته‌اند که شامل: خاصیت ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس، اثرات ضد تک یاخته مخصوصاً تک یاخته ژیاردیا و کیست آن، خواص ضد التهابی و ضد درد است. خواص ضد انعقادی که موجب افزایش خاصیت ترومبوتیک در خون می شود، خواص آنتی اکسیدان و ضد سم است. تقویت سیستم ایمنی، درمان آرتریت‌هایی نظیر آرتریت روماتوئید، افزایش اکسیژن خون و بهبود سیستم خون‌رسانی نیز از خواص درمانی ازن است(۵ ، ۲۱ و ۲۶).

روش‌های مختلفی برای استفاده از اُزُن وجود دارد که شامل: اتوهموتراپی ماژور، اتوهموتراپی مینور، تزریقات زیر جلدی، داخل جلدی، داخل صفاقی، داخل عضله، داخل مفصلی، انمای رکتال، انمای واژینال، استفاده از کیسه پلاستیکی حاوی گاز اُزُن به منظور استفاده موضعی، آب ازونه، روغن گیاهی ازونه و سالین اُزُنه است(۲، ۶ ۱۰، ۱۳، ۲۱، ۲۴، ۲۶، ۲۷ و ۲۹). دراین مطالعه سعی بر این است که با تزریق داخل صفاقی اُزُن که روش مناسبی برای تزریقات در مدل حیوانی خرگوش است به بررسی تاثیرات سیستمیک اُزُن بر روند ترمیم زخم بپردازیم. این نتایج، بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی شده‌اند.

مواد و روش کار

به منظور انجام این پژوهش از سالین اُزُنه استفاده شد. این محصول به تازگی، به صورت تجاری قابل عرضه است؛ بدین صورت که سالین استریل با گاز اُزُن با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیب می‌شود. این محصول به صورت تجاری در بطری‌هایی به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر به فروش می‌رسد، که داخل آن به میزان ۵ میلی‌گرم گاز اُزُن وجود دارد. سالین اُزُنه محصولی حساس است که دور از تابش مستقیم نور و در دمای یخچال نگه‌داری می‌شود، علاوه بر آن بعد از هر بار استفاده، در بطری به صورت محکم باید بسته شود. حداکثر مدت استفاده از سالین اُزُنه، به شرط رعایت اصول نگه‌داری آن، حداکثر ۴۸ ساعت است. در این مطالعه سالین اُزُنه به صورت محصول تجاری، از (مرکز اُزُن نجف آباد اصفهان) خریداری گردید.

برای این مطالعه تعداد ۴۰ خرگوش نژاد نیوزلندی، به وزن تقریبی یک کیلوگرم و با سن تقریبی ۶ ماه، به منظور عمل جراحی انتخاب شدند. برای عادت خرگوش‌ها به شرایط جدید، آن‌ها به مدت ۱۵ روز در قفس مخصوص قرارگرفتند و با خوراک مخصوص خرگوش، تغذیه شدند. تمامی شرایط نگه‌داری و تغذیه برای کلیه‌ی خرگوش‌ها یکسان بود و به خرگوش‌ها داروی ضد انگل ایور مکتین(ساخت موسسه رویان، کشور ایران با غلظت ۱ درصد) با دوز 200µg/kg به روش زیر جلدی تجویز گردید.

برای ایجاد بی‌هوشی از ترکیب کتامین(ساخت شرکت دارویی برمرفارما، کشور المان غلظت ۱۰ درصد) با دوز ۳۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، آسپرومازین (ساخت موسسه پاستور کشور ایران غلظت ۱ درصد) با دوز ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و میدازولام (ساخت شرکت دارویی اکسیر کشور ایران غلظت۰/۵ درصد) با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، استفاده و به روش عضلانی تزریق شد (۱۱ و ۱۸). بعد از ایجاد عمق مناسب بی‌هوشی محل‌های زخم علامت‌گذاری شدند. این محل‌ها در سمت راست ستون مهره سینه‌ای هر خرگوش قرار داشتند. به منظور ایجاد شرایط آسپتیک پس از تراشیدن موها ابتدا از محلول بتادین اسکراب و سپس از محلول بتادین ۱۰ درصد استفاده شد. برای ایجاد زخم از پانچ پوستی جراحی به قطر ۱۰ میلی‌متر استفاده شد، بدین صورت که پوست سمت راست ستون مهره سینه‌ای هر خرگوش به صورت تمام ضخامت، کاملاً گرد شد و به قطر ۱۰ میلی‌متر، برداشته شد.

پس از ایجاد زخم به منظور جلوگیری از عفونت، نواحی زخم به مدت ۱۲ ساعت با پانسمان استریل، پوشش داده شدند. خرگوش‌ها تا پایان بهبود کامل، تحت پایش تیم جراحی بودند و بعد از به هوش آمدن داخل قفس مخصوص، به صورت جداگانه قرار گرفتند.

در این مطالعه، خرگوش‌ها به صورت تصادفی به دو گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند و وزن تمامی خرگوش‌ها محاسبه شد. گروه اول گروه دریافت‌کننده اُزُن و گروه دوم

گروه شاهد نامیده شدند. روز ایجاد زخم روز صفر در نظر گرفته شد، سپس در گروه دریافت‌کننده اُزُن در روزهای ۰، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰و ۱۲ سالین اُزُنه با دوز ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تجویز شد(۱۵ و۲۳). در گروه شاهد نیز به مشابه گروه دریافت‌کننده اُزُن از لحاظ روزهای تزریق و حجم تزریق، نرمال سالین تجویز شد. زخم‌های ایجاد شده به مدت ۱۴ روز تیمار شدند.

برای اطلاع از وضعیت بالینی خرگوش‌ها، موضع عمل به طور کامل بررسی و وضعیت التهاب، عفونت بررسی شد.

تصاویری از زخم‌ها با دوربین عکاسی دیجیتال بلافاصله بعد از عمل جراحی (۰) و در روزهای ۲، ۵، ۹ و ۱۴ از فاصله ۱۰ سانتی‌متری زخم تهیه شد. در این تصاویر، زخم‌ها از نظر التهاب و روند ترمیم به صورت ماکروسکوپی بررسی شد (شکل۱). علاوه بر آن زخم‌ها از نظر مساحت، با ثبت سطح زخم روی طلق مخصوص، بررسی شدند. برای ارزیابی و درجه بندی تصاویر تهیه شده از نرم افزار Digimizer استفاده شد.

برای ارزیابی میکروسکوپی، در روزهای ۲، ۵، ۹ و ۱۴ در هر مرحله پنج خرگوش از گروه شاهد و پنج خرگوش از گروه دریافت‌کننده اُزُن، به روش انسانی با تزریق داروی بی‌هوشی تیوپنتال سدیم(ساخت شرکت داروسازی اکسیر، کشور ایران ویال ۱ گرمی) بادوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن زنده، آسان‌کشی شدند، سپس زخم و قسمتی از بافت سالم اطراف آن به‌صورت تمام ضخامت، در هر خرگوش جدا گردید و برای ارزیابی هیستوپاتولوژی در داخل فرمالین ۱۰٪ قرار داده و به آزمایشگاه فرستاده شد. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت داخل فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند، سپس نمونه‌ها با آب شسته شدند و در دستگاه (Tissue processor) به منظور آب‌گیری و شفاف سازی، قرار گرفتند. سرانجام نمونه‌ها با پارافین قالب‌گیری و در ادامه وارد دستگاه میکروتوم شدند. در این دستگاه نمونه‌ها در مقاطع پنج میکرونی برش داده شدند و در ادامه نمونه‌های تهیه شده، رنگ آمیزی هماتوکسین_ائوزین شدند. اسلایدهای میکروسکوپی برای ارزیابی بر اساس سیستم (Abramov) ارزیابی هیستوپاتولوژیک گردیدند (۱). در این ارزیابی روند ترمیم از نظر التهاب، تشکیل بافت گرانوله، آرایش رشته‌های کلاژن، عروق‌زایی و بازآرایی بافت پوششی، بررسی شد.(جدول‌های۲ تا۶ و شکل های ۲و۳)

برای انجام تست‌های آماری از نرم افزار SPSS نسخه۲۲ استفاده شد. نتایج به دست امده از داده nonparametricحاصل از درجه بندی ترمیم زخم با آزمون آماریKruskal-Wallis تجزیه و تحلیل آماری شدند و هنگامی که ارزش P کمتر از۰۵/. بود، مجددا تجزیه و تحلیل اماری با آزمون Mann-whitney انجام شد.

نتایج

مساحت زخم‌های مد نظر در گروه شاهد و درمان، در روزهای ۲، ۵، ۹ و ۱۴ با افزار Digimizer اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری در جدول۱ درج شده است.

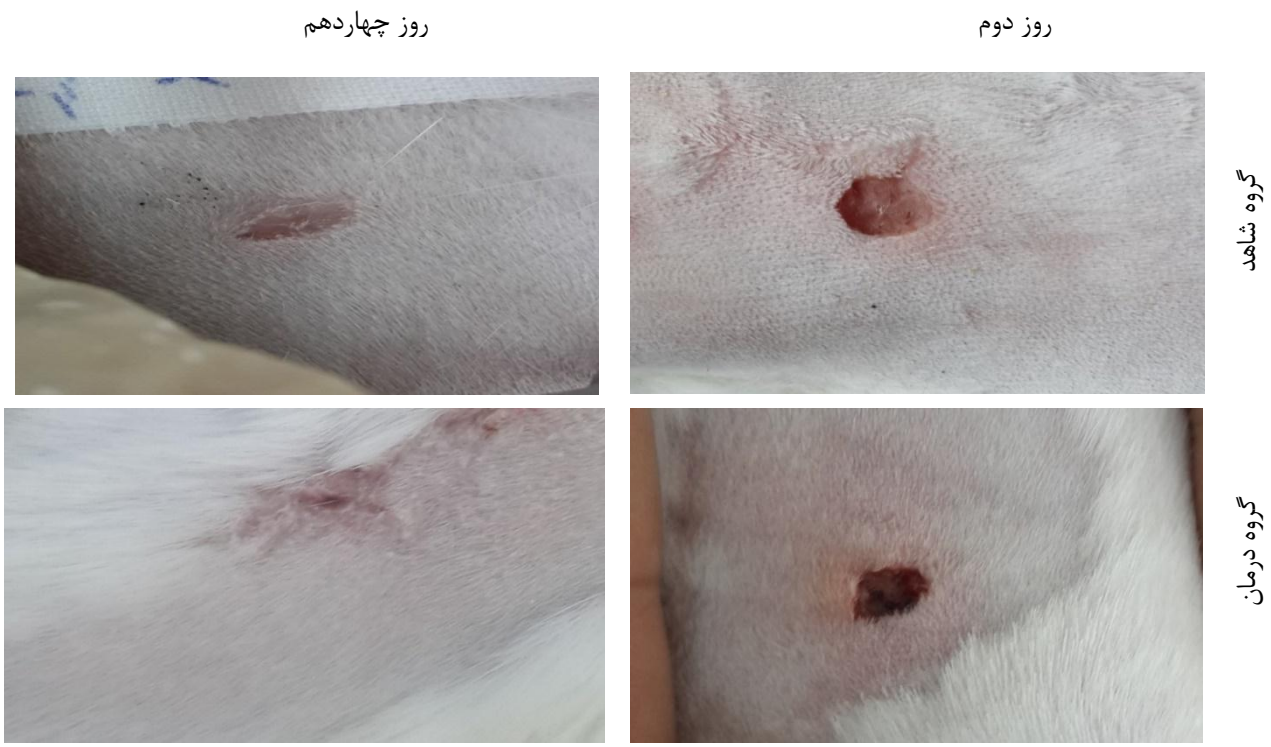
جدول ۱- میانگین ± (انحراف معیار) مساحت زخم‌ها بر اساس میلی‌متر مربع در گروه‌های شاهد و درمان در روزهای مختلف (تعداد زخم=۵)

گروه ها	روزهای ارزیابی			
	۲	۵	۹	۱۴
شاهد	۳۶/۳۹ ± ۱/۸ [a]	۲۳/۶۹ ± ۲/۳۰ [a]	۱۵/۴۶ ± ۱/۹۵ [a]	۳/۶۴ ± ۰/۴۰ [a]
درمان	۲۳/۳۷ ± ۱/۲۲ [b]	۱۸/۰۵ ± ۰/۸۹ [b]	۱۰/۵۵ ± ۰/۸۹ [b]	۲/۸۷ ± ۰/۲۵ [b]
P value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	۰/۰۰۳	۰/۰۱

[a,b] حروف نامتشابه اختلاف معنی‌دار را در روز دوم ، پنجم ، نهم و چهاردهم در گروه شاهد و درمان را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

در تمامی روزهای نمونه‌برداری، میانگین مساحت زخم در گروه شاهد بیشتر است و این اختلاف در تمامی روزها معنی‌دار است (P<۰/۰۵). بیشترین اختلاف مساحت زخم میان دو گروه در روز ۲ مشاهده گردید و

ایـن اخـتلاف در روز پـنج کـاهش و مجـدداً در روز ۹ و چهارده افزایش پیدا کرد.



شکل ۱- روند ترمیم زخم در دو گروه شاهد و درمان در روزهای ۲ و ۱۴

جدول ۲- میانه (حداقل-حداکثر) شاخص التهاب در گروه های مورد مطالعه در روزهای مختلف

	روز۲	روز۵	روز ۹	روز۱۴
شاهد	۲(۳-۲)[a]	۱(۲-۱)	۰(۰-۰)	۰(۰-۰)
درمان	۱(۲-۱)[b]	۱(۲-۱)	۰(۱-۰)	۰(۰-۰)
P value	۰/ ۰۴۸	۱	۰/ ۲۹۲	۱

[a,b] حروف نامتشابه اختلاف معنی‌دار را در روز دوم در گروه شاهد و درمان را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

جدول۳- میانه (حداقل-حداکثر) شاخص شاخص تشکیل بافت گرانوله در گروه های مطالعه شده، در روزهای مختلف

	روز۲	روز۵	روز ۹	روز۱۴
شاهد	۰(۰-۰)	۳(۳-۲)	۴(۴-۳)	۴(۴-۳)
درمان	۰(۰-۰)	۲(۳-۲)	۴(۴-۴)	۴(۴-۴)
P value	۱	۰/۲۹۴	۰/۲۷۴	۰/۲۵۲

اختلاف معنی دار در گروه شاهد و درمان مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول۴- میانه (حداقل-حداکثر) شاخص آرایش رشته‌های کلاژن در گروه‌های مطالعه شده، در روزهای مختلف

	روز۲	روز۵	روز ۹	روز۱۴
شاهد	۰(۰-۰)	۱(۱-۱)	۲(۳-۲)	۴(۴-۳)
درمان	۰(۰-۰)	۱(۱-۱)	۳(۴-۳)	۴(۴-۴)
P value	۱	۱	۰/۰۷۴	۰/۲۹۲

اختلاف معنی دار در گروه شاهد و درمان مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۵- میانه (حداقل- حداکثر) شاخص عروق‌زایی در گروه‌های مطالعه شده، در روزهای مختلف

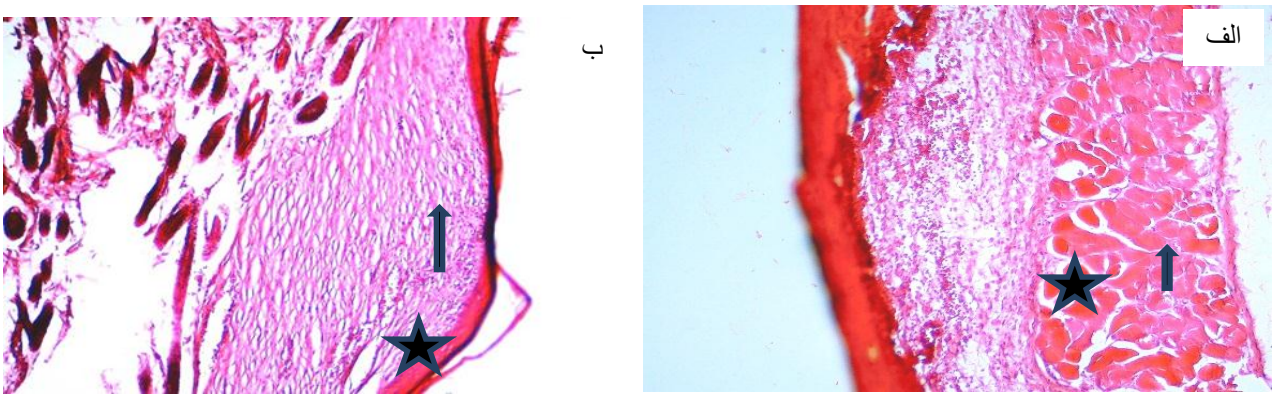
	روز۲	روز۵	روز ۹	روز۱۴
شاهد	۰(۰-۰)	۲(۳-۱)	۱(۲-۱)	۱(۱-۱)[a]
درمان	۰(۰-۰)	۱(۳-۱)	۱(۱-۱)	۰(۰-۰)[b]
P value	۱	۰/۴۳۵	۰/۱۱۴	۰/۰۰۲

[a,b] حروف نامتشابه اختلاف معنی‌دار را در روز دوم در گروه شاهد ودرمان را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

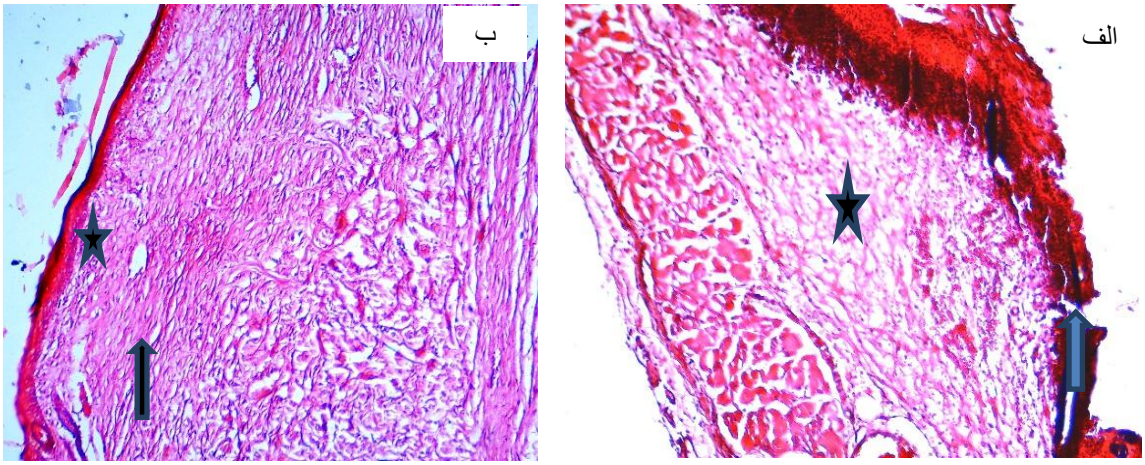
جدول ۶- میانه (حداقل- حداکثر) شاخص بازآرایی بافت پوششی در گروه های مطالعه شده، در روزهای مختلف

	روز۲	روز۵	روز ۹	روز۱۴
شاهد	۰(۰-۰)	۲(۳-۱)	۲(۳-۲)	۳(۳-۳)
درمان	۰(۰-۰)	۱(۲-۱)	۳(۳-۲)	۳(۳-۳)
P value	۱	۰/۳۶۸	۰/۵۲۷	۱

اختلاف معنی دار در گروه شاهد و درمان مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل۲- مقطع هیستوپاتولوژی در روزهای ۲و۱۴ در گروه شاهد. الف: تشکیل لخته سطحی همراه با مقدار کم بافت جوانه‌ای(ستاره) و وجود تعداد اندک سلول‌های التهابی در فضای زخم(فلش) در روز ۲ گروه شاهد (H&E, X10). ب: پرشدن کامل فضای زخم با بافت جوانه-ای دارای رشته‌های ضخیم و منظم کلاژن(فلش) پوشیده شده توسط اپیدرم کراتینیزه(ستاره) در روز ۱۴ گروه شاهد (H&E, X10).



شکل ۳- مقطع هیستوپاتولوژی در روزهای ۲و ۱۴ در گروه درمان. الف: تشکیل لخته سطحی(فلش) همراه با بافت جوانه‌ای اِدماتوز(ستاره) در فضای زخم در روز ۲ گروه درمان (H&E, X10). ب: پرشدن کامل فضای زخم با بافت جوانه‌ای دارای رشته‌های ضخیم و منظم کلاژن(فلش) پوشیده شده توسط اپیدرم کراتینیزه(ستاره) در روز ۱۴ گروه درمان (H&E, X10).

بر ترمیم زخم‌های جلدی پرداختند و این اثرات را بین موش‌های جوان و موش‌های مسن مقایسه کردند. گروه اُزُن روزانه به مدت ۶ ساعت در معرض گاز اُزُن قرار گرفتند و گروه شاهد در معرض هوای آزاد بودند. این مطالعه به مدت ۹ روز انجام گرفت. نتایج نشان داد که در بین موش‌های جوان، گروهی که در معرض اُزُن قرار گرفتند، روند بهبود بهتری داشتند، ولی این روند مشهود نبود، اما در بین موش‌های مسن گروهی که در معرض هوای آزاد بودند، روند بهتری نسبت به گروه اُزُن هم‌سن خود داشتند که این اختلاف مشهود بود (۱۷). علت تفاوت نتیجه‌ی این مطالعه با مطالعه‌ی حاضر، تفاوت در انتخاب دوز مصرفی و مدت زمان استفاده از اُزُن بود.

اُزُن ماده‌ای اکسیداتیو است و دوز استفاده و مدت زمان استفاده از آن اهمیت بالایی دارد. در چند سال گذشته چگونگی تأثیر این گاز در فرایندهای درمانی تقریباً مشخص شده و غلظت مؤثر این گاز به منظور به‌کارگیری آن در اهداف درمانی به دقت مشخص شده است. ازاین رو خطر مسمومیت آن به حداقل رسیده و فنون استفاده از آن در بافت‌های مختلف پیشرفت چشم‌گیری داشته‌است . اُزُن به‌طور ویژه و بسیار رقیق‌شده در ترکیب با اکسیژن به کار می‌رود (غلظت بین ۱ تا ۱۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). به‌کارگیری اُزُن در محدوده غلظتی با در نظر گرفتن موارد ایمنی و نیز راه‌کارهای مشخص‌شده در این زمینه، راه درمانی بی‌خطری به‌حساب می‌آید(۴، ۶ و۲۵). در مطالعه-

بحث

بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد، سومین اختلال پر هزینه بعد از سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی، زخم‌ها هستند(۲۰).

هدف از بهبود روند ترمیم زخم، التیام زخم در زمانی کوتاه، با کمترین درد، ناراحتی و اسکار است و باید در یک شرایط فیزیولوژیک انجام شود. از این‌رو داروها و مواد زیادی برای بهبود روند ترمیم زخم بررسی شده که راه‌های استفاده از آن‌ها می‌تواند موضعی یا سیستمیک باشد(۲۵). اکثر مطالعات انجام شده بر اثرات ترمیم زخم اُزُن، مربوط به تاثیرات موضعی آن است، از این‌رو مطالعات کمی بر اثرات سیستمیک اُزُن بر ترمیم زخم انجام شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات اُزُن‌تراپی به صورت سیستمیک بر ترمیم زخم در مدل حیوانی خرگوش بود، که نتایج ان تسریع در روند ترمیم زخم را نشان می‌دهد.

اُزُن گازی است که از سه اتم اکسیژن تشکیل شده است(۲۶). این گاز در گذشته بیشتر به عنوان حفاظت کننده کره زمین در برابر اشعه ماورای بنفش در لایه استراتوسفر شناخته و در لایه تروپوسفر مضر و سمی شمرده می‌شد. کاربرد درمانی این مولکول تا مدت‌ها مورد توجه قرار نمی‌گرفت، اما اثرات درمانی آن در ترکیب با اکسیژن در چند سال اخیر مورد توجه قرارگرفته است(۳، ۱۹ و۲۲).

در سال ۲۰۰۵ Lim و همکاران به بررسی اثرات اُزُن

شاهد، درروز ۱۴ عروق‌زایی در گروه اُزُن زودتر به پایان رسیده است، ولی در گروه شاهد همچنان عروق‌زایی ادامه دارد.

Borges و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثرات ترمیم زخم و ضد میکروبی اُزُن، در محیط آزمایشگاهی را بررسی کردند. به منظور شبیه سازی محیط زخم، آن‌ها یک محیط سلولی شامل کراتینوسیت انسانی و فیبروبلاست موش، تهیه کردند و اثرات آنتی‌میکروبیال اُزُن را بر کاندیدیا آلبیکنس (Candidia albicans) و استافیلوکوس‌اورئوس (Staphylococcus aureus) را بررسی کردند. در پژوهش آن‌ها میزان MIC (minimum of inhibitory concentration) برای کاندیدیا آلبیکنس و استافیلوکوس‌اورئوس در مواجه با اُزُن ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که اُزُن نه تنها هیچ‌گونه سمیّتی برای خطوط سلولی ایجاد نکرد؛ بلکه مهاجرت فیبروبلاست‌ها را افزایش داد. آزمایش‌های ضد میکروبی، تاثیرات ضد باکتری و ضد قارچ اُزُن را نیز نشان داد(۷).

عفونت یکی از مهم‌ترین عواملی است که سبب التهاب و به تاخیر انداختن روند التیام ترمیم زخم می‌شود(۲۵). در مطالعه‌ی حاضر با توجه به تسریع در روند ترمیم زخم در گروه اُزُن و همچنین کاهش التهاب معنی‌دار در گروه اُزُن می‌توان استنباط کرد یکی از عواملی که موجب تسریع در روند ترمیم و کاهش التهاب می‌شود، خاصیت ضد میکروبی اُزُن است.

در سال ۲۰۱۶ Sahin و همکاران اثرات اینفیوژن داخل رکتال اُزُن بر ترمیم زخم‌های حاصل از جراحی در خرگوش را بررسی کردند. در گروه اُزُن هر خرگوش ۷۰ میکروگرم اُزُن حل شده در ۱۲ سی‌سی نرمال سالین را به صورت یک روز درمیان دریافت کرد، سپس پژوهشگران به بررسی فاکتورهای IL-6 و TNF-alpha پرداختند. این فاکتورها در لحظه برش, ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از جراحی بررسی شدند. نتایج به دست آمده از این قرار بود که IL-6 و TNF-alpha در گروه اُزُن بسیار کمتر از سایر گروه‌ها بود(۲۳). IL-6 و TNF-alpha دو فاکتور التهابی هستند که افزایش آن‌ها تاثیرات منفی بر ترمیم زخم دارد. کاهش این دو سبب کاهش التهاب زخم و افزایش کیفیت ترمیم زخم می‌شود(۲۸). در مطالعه‌ی حاضر کاهش التهاب در گروه اُزُن به صورت مشهود کمتر از گروه شاهد بود و می‌ی حاضر دوز انتخابی برای تزریق، در محدودی ایمن انتخاب شده است از این رو اُزُن نه تنها روند ترمیم را کاهش نداده بلکه سبب بهبود روند کیفیت ترمیم زخم شده است.

Kim و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات موضعی روغن زیتون اُزُنه روی ترمیم زخم خوک را بررسی کردند. مساحت زخم در گروه روغن زیتون اُزُنه به طور معنی‌دار در روزهای ۵ و۷ کمتر از سایر گروه‌ها بود. میزان استحکام کلاژن و تعداد فیبروبلاست‌ها در گروه روغن اُزُنه بالاتر بود. آن‌ها از لحاظ بررسی ملوکولی شاهد افزایش بیان فاکتورهای VEGF(Vascular endothelial growth) و TGF (Transforming growth factor) بودند، ولی فاکتور رشد فیبروبلاست در گروه اُزُن تفاوتی نکرده بود(۱۵). در مطالعه‌ی حاضر نیز مساحت زخم خرگوش در گروه دریافت کننده‌ی اُزُن، در تمامی روزها به طور معنی‌دار از گروه شاهد کمتر است.

در سال ۲۰۱۴ ژانگ و همکاران میزان فاکتورهای رشد موثر بر بهبود زخم در زمان استفاده از اکسیژن- اُزُن-تراپی به روش گازدهی با کیسه‌های مخصوص در درمان زخم‌های بیماران دیابتی را اندازه‌گیری کردند. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده بدین صورت بود که میزان درمان در گروه اکسیژن- اُزُن‌تراپی ۹۲٪ و میزان درمان در گروه شاهد ۶۴٪ بود، همچنین بیان فاکتورهای VEGF، TGF- β و PDGF در روز یازدهم در گروه اکسیژن- اُزُن به نسبت گروه شاهد بیشتر بود؛ به عبارت دیگر می‌توان گفت اکسیژن- اُزُن‌تراپی با القای بالقوه فاکتورهای VEGF، TGF- β وPDG در مراحل اولیه ترمیم، موجب افزایش روند بهبود زخم شده است(۳۱).

عروق‌زایی در زخم به عواملی متعددی وابسته است که یکی از آن‌ها VEGF(Vascular endothelial growth factor) یا فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است که فاکتوری مهم در ترمیم زخم محسوب می‌شود. این عامل سبب رشد و عروق‌زایی می‌شود(۲۸). با توجه به مطالعات انجام شده بر اُزُن، می‌توان نتیجه گرفت که اُزُن سبب ترشح زودتر فاکتورVEGF می‌شود(۲۸و ۳۱). در مطالعه‌ی حاضر در روز ۱۴ میزان عروق‌زایی به طور معنی‌دار در گروه شاهد بیشتر بود؛ از این رو می‌توان استنباط کرد به دلیل تاثیر اُزُن بر فاکتور VEGF و ترشح زودتر آن نسبت به گروه

توان اثر ضدالتهابی اُزُن را یکی از عوامل کاهش التهاب زخم‌ها بیان کرد.

Weirong و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر استفاده موضعی از روغن اُزُنه بر ترمیم زخم را در موش بررسی کردند. نتایج نشان داد که در گروه دریافت‌کننده روغن اُزُنه مساحت زخم کمتر از گروه شاهد بود. میزان کلاژن سازی، TGF- β و تعداد فیبروبلاست‌ها افزایش یافته بود؛ علاوه بر آن مطالعات روی زخم نشان داد که التهاب در گروه اُزُن کاهش و در گروه شاهد افزایش یافته بود. فاکتورهای نظیر MMP-2، MMP-9 (ماتریکس متالو پروتئیناز) و پروتیئن EMT (Epithelial–mesenchymal transition) در استفاده از روغن اُزُنه نیز افزایش افزایش یافته بودند. فاکتور شبه انسولینی، فاکتورهای رشد نظیر IGFBP3، IGFBP5 و IGFBP6 در مطالعه ویرونگ و همکاران در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود که تمام فاکتورهای یاد شده باعث افزایش سرعت EMT شده و ترمیم زخم سریعتر انجام می‌گیرد(۳۰).

استفاده از روغن اُزُنه به دلیل افزایش واکنش ایمنی به طور معنی‌داری باعث کاهش فاکتورهایی مانند TNF-α (فاکتور نکروز دهنده تومر-الفا) و IL-6 (اینتر لوکین۶) شده که نهایتا باعث کاهش التهاب در زخم می‌شود(۳۰).

در مطالعه‌ی حاضر تفاوت‌هایی در میزان کلاژن-سازی در مقاطع هیستوپاتولوژی مشاهده گردید که ناشی از ضخامت بیشتر و منظم بودن رشته‌های کلاژن در گروه درمان بود، ولی این تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند، ولی التهاب در گروه درمان به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود که با مطالعه ویرونگ وهمکاران تطابق دارد.

از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که اُزُن‌تراپی به صورت سیستمیک موجب افزایش کیفیت روند ترمیم زخم می‌شود

منابع

1- Abramov ,Y; Golden, B and Sullivan, M; Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound repair and regeneration* 2007;15:80-86
2- Al-Aziz, A; Eweda, S and Kholosy, H; Effect of ozone therapy dressing technique on the healing process of recent 2nd-degree burns. *IOSR-JNHS* 2015;4:26-49.
3- Andreula, C; Ozone therapy. Neuroradiology 2011;53:207.
4- Bocci, V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation: Springer Science & Business Media, 2013;pp332-336.
5- Bocci, V; Zanardi, I; Travagli, V; Ozonation of human HIV-infected plasmas for producing a global vaccine: How HIV-patients may help fight the HIV pandemia. Virulence 2010;1:215-217.
6- Bocci, V; Zanardi, I and Travagli V; Ozone: a new medical drug in vascular diseases. Am J Cardiovasc Drugs 2011;11:73-82.
7- Borges, GÁ; Elias, ST and Silva, SMM; In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2017;45:364-370.
8- Ehhalt, D; Prather, M and Dentener, F;Atmospheric chemistry and greenhouse gases: Pacific Northwest National Lab.(PNNL), Richland, WA (United States), 2001;pp518-525.
9- Guo, Sa; DiPietro, LA; Factors affecting wound healing. Journal of dental research 2010;89:219-229.
10- Seydim, A; Use of ozone in the food industry. LWT-Food Science and Technology 2004;37:453-460.
11- Harcourt-Brown, F; Textbook of rabbit medicine: Butterworth-Heinemann-2002 Oxford, 2003;pp111-115.
12- Hoigné, J; Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. Quality and treatment of drinking water II: Springer, 1998;pp: 83-141.
13- Holmes, J and Lynch, E; Equipment available to deliver ozone in dentistry. 1 15 How ozone acts and exerts therapeutic effects 2004;pp72-75.
14- Khavkin, J and Ellis, DA; Aging skin: histology, physiology, and pathology. Facial Plastic Surgery Clinics 2011;19:229-234.
15- Kim, HS; Noh, SU and Han, YW; Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. Journal of Korean medical science 2009;24:368-374.

16- Lazarus, GS; Cooper, DM and Knighton, DR; Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. Wound Repair and Regeneration 1994;2:165-170.

17- Lim, Y; Phung, AD and Corbacho AM; Modulation of cutaneous wound healing by ozone: differences between young and aged mice. Toxicology letters 2006;160:127-134.

18- Meredith, A and Lord, B;BSAVA manual of rabbit medicine: British Small Animal Veterinary Association, 2014;pp21-24.

19- Monte, AD; Der Zee, HVand Bocci, V; Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. Journal of Alternative & Complementary Medicine 2005;11:363-367.

20- Perry, AG and Potter, P; Fundamentals of nursing: Mosby St. Louis, MO, 2001;pp25-29.

21- Roy, D; Englebrecht, R and Chian, E; Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone. Journal- American Water Works Association 1982;74:660-664.

22- Sagai, M and Bocci, V; Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? Medical gas research 2011;1:29

23- Sahin, H; Simsek, T and Turkon, H; The acute effects of preoperative ozone theraphy on surgical wound healing. Acta cirurgica brasileira 2016;31:472-478.

24- Schwartz, A; Ozone therapy in the treatment of recurrent vulvo-vaginitis by Candida albicans. Ozone Therapy Global Journal 2015;5:99-107.

25- Silver, I; Some Factors Affecting Wound Healing. Equine veterinary journal 1973;5:47-51.

26- Travagli, V; Zanardi, I and Valacchi, G; Ozone and ozonated oils in skin diseases a review. Mediators of inflammation 2010;2010;pp125-128.

27- Varro, J; Die krebsbehandlung mit ozon. Erfahr hk 1974;23:178-181.

28- Werner, S and Grose, R; Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological reviews 2003;83:835-870.

29- Wolff, A; Eine medizinische verwendbarkeit des ozons. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift 1915;41:311-312.

30- Xiao, W; Tang, H and Wu, M; Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Bioscience reports 2017;37;pp37-45.

31- Zhang, J; Guan, M and Xie, C;Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2014;20(14) ;pp132-135

Vol.16/No.1
Spring-Summer 2022

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2022; 16(1): 71-80.
https://doi.org/10.22034/ijvcs.2022.13205.0

Evaluation of Therapeutic Effects of Ozonotherapy in the Experimental Rabbit Mode on the Skin Wound Healing by Intraperitoneal Injection

Ehsan Forghani[1], Siavash Sharifi[2*], Iraj Karimi[3], Amin Bigham Sadegh[2], Moosa Javdani[2]

1. DVM Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 29 November 2021 ***Accepted:*** 11 April 2022

Summary

The aim of this study was to investigate the effects of intraperitoneal administration of ozone on experimental wound healing in an animal model of rabbits. In this study, 40 Newzealandian rabbits, were selected for surgery. Full-thickness wound by 10 mm biopsy punch was create on the right side of thoracic vertebra. The rabbits randomly were divided into two equal groups of control and ozone. In the ozone group, up to three days after surgery, one dose of ozone was administered daily and after the third day, one day in between until the fourteenth day, ozone was administered by intraperitoneal injection. In the control group, normal saline solution was administered by intraperitoneal injection on the mentioned days, same as the ozone group. The macroscopic surface area of the wounds on days 2, 5, 9 and 14 were evaluated. From each group, 5 wounds on the mentioned days were examined histopathologically. Macroscopic results showed differences between the two groups. In the Ozone group, the area of wound was significantly ($P<0.05$) lower than the control group. Level of inflammation was significantly lower in the ozone group. On day 14, the control group had a significantly higher vascularization rate than the ozone group. It was concluded that systemic ozone therapy increases the quality of wound healing process.

***Keywords*:** Skin, Wound Healing, Ozone, Rabbit, Intraperitoneal Injection

***Corresponding Author:** drsharifisiavash94@gmail.com