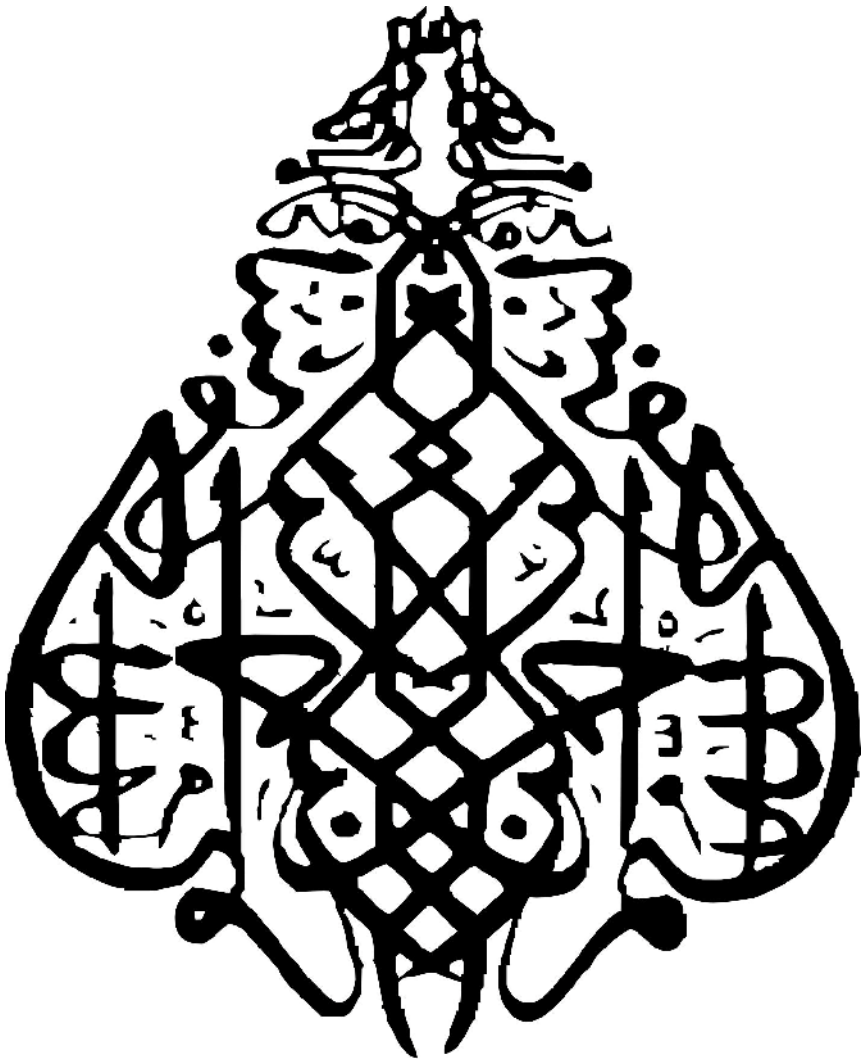


دانشکده علوم پایه

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

عنوان پایان نامه:

تاثیر نانوذرات نقره بر عملکرد کبد وکاهش بار میکروبی زخم در موش سفید آزمایشگاهی (*Mus musculus*).

استاد راهنما:

دکتر محمد سعید حیدرنژاد

استاد مشاور:

دکتر محسن مبینی دهکردی

توسط:

پریسا یارمحمدی سامانی

مهرماه۱۳۹۱

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

پریسا یارمحمدی

عنوان: « تأثیر نانو ذرات نقره بر عملکرد کبد و کاهش بار میکروبی زخم در موش سفید آزمایشگاهی **Mus musculus** »

در تاریخ ۹۱/۷/۱۷ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- راهنمای پایان نامه دکتر محمد سعید حیدرنژاد با مرتبه علمی استادیار امضاء

۲- مشاور پایان نامه دکتر محسن مبینی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۳- داور پایان نامه دکتر ولی اله خلجی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۵- داور پایان نامه دکتر جهانگیر کبوتری با مرتبه علمی استادیار امضاء

۶- نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم پایه دکتر راضیه پوراحمد با مرتبه علمی استادیار امضاء

دکتر ابوالفضل سعدانی
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده علوم پایه

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

چکیده:

نانوذرات نقره برای ترمیم زخم های مختلف استفاده می شوند، بنابراین بررسی سمیت این ماده در سیستم های زنده اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق، تاثیرات نانوذرات نقره، روی ترمیم زخم و تغییرات بار میکروبی زخم بررسی شد و نیزاثر این ذرات بر روی فعالیت آنزیم های کبدی و برخی پارامترهای هماتولوژیک موش های آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش Balb/c ماده در دو گروه ۲۵ تایی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بیهوشی عمومی و تراشیدن قسمت پشت حیوان، در شرایط استریل، زخمی مساوی و سطحی در همه حیوانات ایجاد شد. روز جراحی روز صفر محسوب شد و گروه تیمار و کنترل به ترتیب با ۵۰ میکرولیترمحلول ppm۱۰ نانوذرات نقره و ۵۰ میکرولیترآب مقطر، روزی یکبار، به مدت ۱۴ روز، تحت درمان موضعی قرار گرفتند. برای مقایسه درصد بهبودی زخم، در روزهای ۰، ۷ و۱۴ مساحت زخم اندازه گیری شد. برای مقایسه درصد رشد باکتری، در روزهای دوم و هفتم تعداد کل باکتری های هوازی شمارش شد. پس از ۲، ۷ و ۱۴ روز، از هر گروه پنج حیوان به طور تصادفی انتخاب شد و فعالیت آنزیم های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) در نمونه های خون موش ها موردانداره گیری قرار گرفتند و در روز چهاردهم، هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد سلول های خونی اندازه گیری شدند و در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفتند.در این مطالعه، آنالیز آماری توسط آزمون های ANOVA و t مستقل انجام شد.

نتایج نشان داد که درصد ترمیم در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری بیشتر است ($p<۰/۰۵$). در گروه کنترل، افزایش معنی داری در رشد باکتری ها مشاهده شد ($p<۰/۰۱$). سطح AST و ALT تفاوت معنی داری بین دو گروه نشان نداد ($p>۰/۰۵$). در شمارش گلبول های سفید خون، افزایش در تعداد این سلول ها در گروه تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). شمارش گلبول های قرمز خون و اندازه گیری هموگلوبین و هماتوکریت تغییر معنی دار و محسوسی را نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

نتایج این مطالعه نشان داد که محلول ۱۰ ppm نانوذرات نقره بدون آسیب کبدی و سمیت خونی باعث تسریع در روند التیام زخم در موش Balb/c می شود.

کلمات کلیدی: ترمیم زخم، نانوذرات نقره، بارمیکروبی، ALT، AST، هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول سفید، گلبول قرمز.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

مقدمه ۱

۱- پوست ۱

۱-۱- ساختمان پوست ۱

۱-۲-فلور میکروبی سطح پوست ۳

۱-۳- زخم ۵

۱-۳-۱- انواع زخم ۵

۱-۳-۲- فرآیند بهبود زخم ۵

۱-۳-۲-۱- مرحله آماس ۶

۱-۳-۲-۲ - مرحله تکثیر ۷

۱-۳-۲-۳- مرحله بلوغ ۸

۱-۳-۳- فاکتورهای موثر بر بهبود زخم ۸

۱-۳-۳-۱- فاکتور های موثر بر پیشرفت بهبود زخم ۸

۱-۳-۳-۱-۱- فاکتور های رشد ۸

۱-۳-۳-۲- فاکتور های موثر بر تاخیر در بهبود زخم ۸

۱-۳-۴- میکروب های زخم ۱۰

۱-۳-۴-۱- منابع آلودگی زخم ۱۰

۱-۳-۴-۲- تشکیل بیوفیلم ۱۰

۱-۳-۴-۳- اثر عفونت بر بهبود زخم ۱۲

۲- نقره ۱۳

۲-۱- کاربرد نقره و ترکیبات دارای نقره در بهبود زخم ۱۳
۳- نانوذرات نقره ۱۴
۳-۱-اثر اندازه و شکل روی فعالیت نانو ذرات نقره ۱۵
۳-۲- سازو کار عمل نانوذرات نقره در فعالیت ضد میکروبی ۱۶
۳-۳- نقش نانوذرات نقره بر روی عوامل دیگر موثر بر بهبود زخم ۱۸
۳-۴- سمیت سلولی نانوذرات نقره ۲۰
۴- کبد ۲۱
۴-۱- ساختمان کبد ۲۱
۴-۲- عملکرد کبد ۲۲
۴-۳- ارزیابی نارسایی های کبدی ۲۳
۴-۳-۱- سنجش آنزیم های آمینوترانسفراز ۲۳
۵- پیشینه تحقیق ۲۴

فصل دوم ۲۶

۲- مواد ۲۶
۲-۱- تهیه و آماده سازی محلول نانونقره ۲۶
۲-۲- مواد و وسایل بکار رفته جهت کشت و شناسایی میکروب ها ۲۶
۲-۳- تهیه ی موش به عنوان مدل جانوری ۲۷
۲-۳-۱- نحوه ی ایجاد زخم ۲۸
۲-۳-۲- گروه بندی حیوانات ۲۹
۲-۳-۳- دوره تیمار ۳۰

۲-۳-۴- خون گیری ۳۰
۲-۳-۵- مطالعه ماکروسکوپی (بررسی میزان تغییرات سطح زخم)..... ۳۰
۲-۴- بررسی میکروب های سطح پوست سالم ۳۱
۲-۴-۱- تهیه ی محیط های کشت..... ۳۱
۲-۴-۲- نمونه برداری میکروبی..... ۳۲
۲-۴-۳- کشت میکروب ها..... ۳۲
۲-۴-۴- شمارش و شناسایی میکروب های سطح پوست ۳۲
۲-۴-۵- تعیین درصد هر باکتری و درصد فراوانی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت ۳۳
۲-۴-۶- تعیین بار میکروبی زخم..... ۳۴
۲-۴-۷- تعیین درصد افزایش باکتری در روز هفتم نسبت به روز دوم ۳۴
۲-۵- تجزیه و تحلیل داده ها..... ۳۵

فصل سوم ۳۶

۳- نتایج..... ۳۶
۳-۱- نتایج مربوط به تعیین نوع میکروب موجود بر روی پوست موش ماده..... ۳۶
۳-۲- بررسی میزان تغییرات تعداد میکروب های موجود بر سطح زخم در گروه کنترل و تیمار..... ۴۰
۳-۳- بررسی درصد کاهش هفتگی مساحت زخم در گروه کنترل و تیمار ۴۱
۳-۴- بررسی میزان آنزیم های ALT و AST کبدی..... ۴۲
۳-۵- بررسی میزان سلول های خونی ، هموگلوبین و هماتوکریت ۴۳

فصل چهارم ۴۴

۴- بحث ۴۴

۴-۱- فلور میکروبی سطح پوست سالم موش ۴۴

۴-۲- اثر نانوذرات نقره بر روی بار میکروبی زخم ۴۵

۴-۳- اثر نانوذرات نقره بر روی بهبود زخم ۴۷

۴-۴- اثر نانوذرات نقره بر کبد ۴۸

۴-۵- اثر نانوذرات نقره بر سلول های خونی، هموگلوبین و هماتوکریت ۵۰

جمع بندی ۵۲

پیشنهادات ۵۲

مراجع ۵۲

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- فاکتورهای رشد دخیل در بهبود زخم ۹

جدول ۲-۱- مواد و وسایل بکار رفته جهت کشت و شناسایی میکروب ها ۲۷

جدول ۳-۱- شناسایی باکتری ها ۳۷

جدول ۳-۲- تعداد باکتری های هوازی زخم در روز دوم و هفتم (CFU/cm^2) و درصد افزایش باکتری ها در گروه کنترل و تیمار ۴۰

جدول۳-۳- تعداد سلول های خونی و مقدار هموگلوبین و درصد هماتوکریت در گروه کنترل و تیمار ۴۳

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱ دیاگرامی از ساختمان پوست ۲

شکل ۱-۲ شماتیکی از بهبود زخم..... ۶

شکل ۲-۱ نمایی از موش های آزمایشگاهی و محل نگهداری آنها ۲۸

شکل ۲-۲ نحوه ی تزریق ماده بی هوشی ۲۸

شکل ۲-۳ نحوه ی ایجاد زخم ۲۹

شکل۲-۴ نمونه ای از زخم ایجاد شده در موش..... ۲۹

شکل۲-۵ نحوه ی خونگیری از موش ۳۰

شکل ۲-۶ زخم بهبود یافته ۳۱

شکل ۲-۷ آزمون های بیوشیمیایی..... ۳۳

شکل ۲-۸ باکتری های گرم منفی و گرم مثبت..... ۳۳

شکل ۳-۱ درصد باکتری های موجود بر روی پوست موش ماده..... ۳۸

شکل ۳-۲ فراوانی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت موجود در سطح پوست موش ماده ۳۸

شکل ۳-۳ برخی از باکتری های شناسایی شده در سطح پوست موش ماده..... ۳۹

شکل ۳-۴ درصد افزایش باکتری ها در گروه کنترل و تیمار..... ۴۰

شکل ۳-۵ کاهش هفتگی مساحت زخم در گروه کنترل و تیمار در هفته اول و دوم ۴۱

شکل ۳-۶ وضعیت بهبود زخم در گروه تیمار و کنترل..... ۴۲

شکل ۳-۷ تغییرات آنزیم های کبدی در گروه کنترل و تیمار ۴۳

فصل اول

مقدمه

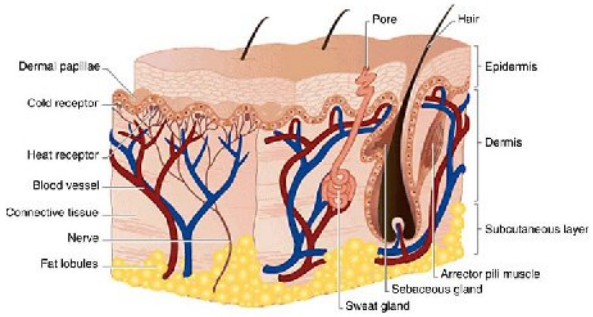
۱- پوست

پوست بزرگترین اندام بدن، با چندین عملکرد است که مهمترین آنها ایجاد مانعی فیزیکی در برابر محیط می باشد این مانع عبور آب، الکترولیتها و مواد مختلف به داخل و خارج را محدود می کند و نیز بدن را در برابر میکروارگانیسم ها، تابش اشعه ماورای بنفش، عوامل سمی و مکانیکی محافظت می نماید (Bensouilah and Buck, 2006).

۱-۱- ساختمان پوست

ساختمان پوست از لحاظ بافت شناسی از خارج به داخل شامل سه طبقه روپوست یا اپی درم[1]، میان پوست یا درم[2] و زیر پوست یا هیپودرم[3] می باشد (شکل ۱-۱).

[1] Epidermis
[2] Dermis
[3] Hypodermis



شکل ۱-۱ دیاگرامی از ساختمان پوست (Charbonneau et al, 2010).

الف) روپوست:

از اپی تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی شده تشکیل شده است که پوشش رطوبت ناپذیری برای بدن ایجاد می کند و در زیر روپوست غشاء پایه چین داری قرار گرفته است. سلول های زیرین از عمق به سطح به ترتیب زیر می باشند:

۱- طبقه پایه ای[1]: یک ردیف سلول های منشوری با حدود نامشخص و هسته دوکی واضح، عمود بر قاعده است (رجحان، ۱۳۷۶) که در محل اتصال درم و اپی درم قرار دارد. ویژگی این طبقه (که دارای سلول های بنیادی است)، فعالیت میتوزی شدید آن است و به همراه قسمت ابتدایی لایه بعدی، مسئول جایگزینی پیوسته سلول های اپی درمی می باشد (جان کوئیرا، ۱۹۲۰).

۲- طبقه خاردار[2]: طبقه ای است به ضخامت تعدادی سلول چند سطحی، که از هم فاصله دارند. در حد فاصل بین سلول ها زائده های سیتوپلاسمی آنها به وسیله دسموزوم به یکدیگر متصل شده اند که منظره هاشور و خاری شکل دارد. در میان این سلول ها، سلول های لانگرهانس قرار دارند که در پاسخ ایمنی پوست و کنترل تقسیم سلول های پایه ای دخالت دارند (رجحان، ۱۳۷۶).

۳- طبقه دانه دار[3]: این لایه از ۳ تا ۵ ردیف سلول های مسطح چندضلعی تشکیل شده (جان کوئیرا، ۱۹۲۰) که سیتوپلاسمشان دارای دانه های بنفش و بدون روپوش کراتوهیالن و دانه های روپوش دار می باشد. از این به بعد لایه های سلولی مرده شروع می شود.

۴- طبقه شفاف[4]: لایه نازکی مرکب از سیتوپلاسم سلول های مرده محتوی الئیدین[5] است که به رنگ قرمز شفاف دیده می شود و هسته ندارد.

۵- طبقه شاخی[6]: این طبقه با ۱۵ تا ۲۰ ردیف خارجی ترین لایه اپیدرم است. سلول های طبقه قبلی به آهستگی به طرف سطح آمده به یکدیگر متصل می شوند و در سیتوپلاسمشان الئیدین به ماده کراتین[7] تبدیل می شود. این لایه ۳/۴ ضخامت اپیدرم را تشکیل می دهد و سلول های سطحی به تدریج ریخته می شوند. به مجموعه سلول هایی که از عمق تا سطح به طرف شاخی شدن حرکت می کنند کراتینوسیت می گویند (رجحان، ۱۳۷۶).

---

[1] Stratum basal
[2] Stratum spinusum
[3] Stratum granulosum
[4] Stratum Iucidum
[5] Eleidin
[6] Stratum corneum
[7] Keratin

ب) میان پوست:

بافت همبندی است که اپی درم را حمایت کرده و آن را به بافت زیر پوست متصل می کند. که ضخامت آن بر حسب مناطق بدن متفاوت است (جان کوئیرا، ۱۹۲۰).

میان پوست دارای دو قسمت می باشد.

طبقه پاپیلر[1]: از بافت همبندی با رگ های خونی فراوان تشکیل شده است و در زیر غشاء پایه اپیدرم به صورت انگشتان دست برجستگی هایی به نام پاپیلا دارد. در بین این برجستگی ها فرورفتگی هایی از اپیدرم ایجاد می شود.

طبقه شبکه ای[2]: بافت همبند متراکمی با رشته های متقاطع و درهم است که بلافاصله در زیر طبقه پاپیلر قرار می گیرد. در لابه لای اجزای همبند آن رگها و جسمک های عصبی و به علاوه ضمائم پوستی یعنی غده ها چربی، غده ها عرق، مو و ماهیچه راست کننده مو قرار دارد. فیبروبلاست های درمیس، تراوش فاکتور رشد اپی درمیس[3]، تحلیل کلاژن در عمل جراحی، ساخت الاستین و اکسی تالان و دخالت در جوش خوردن زخم با عمل بهبودی و انقباض خود از جمله وظایف این سلول ها می باشند.

ج) زیر پوست:

بافت همبند چربی است که رگ ها از آن گذشته به درم وارد می شود به علت چربی زیاد این طبقه، پوست به راحتی می تواند بر روی بافت ها زیرین خود بلغزد (رجحان، ۱۳۷۶).

۱-۲- فلور میکروبی سطح پوست

پوست هم به عنوان مانعی برای عفونت و هم زیستگاه پیچیده برای جمعیت متنوع میکروب ها (باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها) می باشد (Scharschmidt et al., 2009). در واقع پوست مانعی را در برابر مواد شیمیایی مضر و تاثیر فیزیکی محیط زیست فراهم می کند و جاندار را از عفونت توسط بیماری زا ها، انگل ها، قارچ ها، باکتری ها و ویروس ها محافظت می کند (Elsner, 2006). کنام های چندگانه ای درون اکوسیستم پوست وجود دارد. مناطق مختلف پوست دارای جمعیت های مختلفی از جمعیت میکروبی هستند که کنام های متفاوتی دارند. به علاوه ساختارهای درونی پوست در محل خاصی، ممکن است زیستگاه میکروب های منحصر به فردی باشند.

لایه ی شاخی شده، لایه ی سلولی، محور و فولیکول مو، غده های چربی، آپوکرین و اککرین[4] ممکن است هر کدام با فلور میکروبی همراه باشند. پوست مواد غذایی را برای میکروب های کلونیزه شده ی انتخابی به صورت چربی و پروتئین (کراتین) فراهم می کند. این محیط خشک و کمی اسیدی ممکن است سبب محدود شدن انواع میکروب هایی شود که می توانند روی پوست طبیعی زنده بمانند. برای کلونیزه شدن ، یک میکروب باید با میکروب های دیگر فلور طبیعی برای مولکول های آلی و فضا رقابت نماید (Fredricks, 2001).

[1] Papillary layer
[2] Reticular layer
[3] EGF
[4] Eccrine

تعـداد زیـادی از میکروارگانیسـم هـا، بـی ضـرر هسـتند و در برخـی از مـوارد عملکردهـای حیـاتی را که در انسان تکامـل یافتـه نیسـتند، فـراهم مـی کننـد. میکروارگانیسـم هـای همزیسـت، طیـف وسـیعی از فرورفتگـی پوسـت را اشـغال مـی کننـد و پوسـت را در برابـر تهـاجم تعـداد زیـادی از ارگانیسـم هـای آسیب رسان یا بیماری زا محافظت می نمایند (Grice and Segre, 2011).

در اکوسیستم هـای پایـدار، میکـروب هـا تمایـل بـه حفـظ حالـت تعـادل و مقاومـت در برابـر تغییـرات سـاختار جامعـه را دارنـد. ایـن فراینـد ممکـن اسـت میزبـان را از میکـروب هـای بیمـاری زا، بـدون جلوگیری آنها از اکوسیستم پوستی، محافظت کند.

تعداد زیادی از باکتری های کشت داده شده از پوست سـالم شـامل گونـه هـای *staphylococci*، *micrococci*، *corynebacteria*، *brevibacteria*، *propionibacteria* و *acinetobacter* مـی باشـند. میکـروب هـایی ماننـد *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pyogenes* و *Psuedomonas aeruginosa* ممکـن اسـت کلونیزه کننده های انتقالی در شرایط غیر طبیعی باشند (Fredricks, 2001).

سـه نـوع اصـلی فلـور پوسـت عبارتنـد از: فلـور سـاکن[1] و گـذرا[2]، کـه در سـال ۱۹۳۸ تشـخیص داده شـده انـد بـه همـراه، فلـور عفـونی بـا گونـه هـای ماننـد *استافیلوکوکوس اورئـوس*[3] و *اسـترپتوکوکوس بتا همولیتیک*[4] که غالباً از آبسه و غیره جدا شده اند (Eksi et al., 2010).

موجوداتی کـه بـر روی پوسـت رشـد مـی کننـد و تعـداد و ترکیـب بـه نسـبت پایـداری دارنـد، را فلـور سـاکن مـی نامنـد (Roth and James, 1988) کـه از تعـداد زیـادی از موجـودات متعلـق بـه تعـداد کمـی از گونـه هـا تشـکیل شـده انـد (Moosavi and Lotfi, 2009). تصـور مـی شـود کـه فلـور سـاکن متشـکل از ارگانیسم هایی باشند که به پوست متصـل شـده انـد و سـختی شـان ممکـن اسـت بـه ایـن اتصـال مـرتبط باشد و همچنین معتقدنـد کـه افـزایش در تعـداد فلـورای سـاکن از طریـق محـیط خـارجی صـورت نمـی گیـرد. این ارگانیسـم هـا بـه عنـوان میکروکلنـی هـای کـوچکی هسـتند کـه روی سـطح لایـه ی شـاخی شـده و درون لایه های خـارجی تـر اپـی درم زنـدگی مـی کننـد (Roth and James, 1988). بـه عنـوان مثـال فلـور سـاکن از سـویه هـایی ماننـد Coagulase-negative *staphylococci* و *Diphtheroids* تشـکیل شـده انـد (Eksi et al., 2010). گـروه دوم ارگانیسـم هـایی هسـتند کـه موقتـاً بـر روی سـطح پوسـت قـرار دارنـد و آنهـا را فلور گذرا می نامند. معتقدنـد کـه ایـن ارگانیسـم هـا، از منـابع خـارجی منشـا مـی گیرنـد و در ابتـدا، روی پوسـت در معـرض محـیط قـرار مـی گیرنـد (Roth and James, 1988). در واقـع مـی تـوان گفـت میکروارگانیسم هایی که بر روی پوست قـرار دارنـد امـا تشـکیل کلنـی نمـی دهنـد را فلـور گـذرای پوسـت می نامند که به این صورت از فلورای ساکن متمایز می شوند (Lillye and Lowbury, 1978).

میکروارگانیسـم هـایی ماننـد *کورینـه بـاکتریوم*[5]، *میکروکوکـوس*[6] و *باسـیلوس*[7] بـه عنـوان فلـور گـذرا در نظـر گرفته شده اند و بنابراین این میکروارگانیسم ها، پتانسیل بیماری زایی دارند (Eksi et al., 2010).

---

[1] Resident flora
[2] Transient flora
[3] *Staphylococcus aureus*
[4] Hemolytic *streptococci* β
[5] *Corynebacterium* spp.
[6] *Micrococcus* spp
[7] *Bacillus* spp

در واقـع فلـور پوسـت شـامل هـر دو بـاکتری هـای هـوازی کـه عمـدتاً جـنس هـای *Staphylococcus* و *Corynebacterium* و بـــاکتری هـــای بـــی هـــوازی شـــامل *Propionibacteriurn acnes* مـــی باشـــد (Tancrède, 1992).

۱-۳- زخم

زخـم بـه عنـوان جـدا شـدن سـاختار و عملکـرد آنـاتومیکی طبیعـی تعریـف شـده اسـت (Lazarus et al, 1994). در حقیقـت زخـم بـه از هـم گسـیختگی سـاختمان یکپارچـه بـدنی در اثـر آسـیب ایجـاد شـده توسـط عوامـل فیزیکـی – شـیمیایی و زیسـت شـناختی گفتـه مـی شـود (Johnston, 1990). پـس بـه هرگونـه بریـدگی یا پارگی پوست که باعث خارج شدن خـون از بـدن مـی شـود و بـه طـور دقیـق تـر، هـر گونـه صـدمه بـه بافـت نرم مانند پوست، عضلات، عروق خونی و اعصاب زخم اطلاق می گردد (Harding et al., 2002).

۱-۳-۱- انواع زخم

الف) زخـم هـای حـاد[1]: ایـن زخـم هـا در اثـر آسـیب خـارجی بـه پوسـت سـالم ایجـاد مـی شـود و شـامل زخم های جراحی، نیش هـا، سـوختگی هـا، بریـدگی هـای جزئـی و خـراش هـا، بیشـتر زخـم هـای شـدید پـس از سـانحه از جملـه پـارگی و غیـره مـی باشـد (Davis et al., 1992). صـرف نظـر از آسـیب پوسـتی، انتظـار مـی رود کـه زخـم هـای حـاد در مـدت زمـان پـیش بینـی شـده ای بهبـود یابنـد، اگـر چـه درمان مورد نیاز، بـا توجـه بـه نـوع، محـل و عمـق متفـاوت زخـم، بهبـود زخـم را آسـان مـی سـازد (Bowler et al., 2001). در واقـع ایـن زخـم هـا دارای مجموعـه هـایی از پاسـخ هـای فیزیولـوژیکی هماهنگ، منظم و پیوسته می باشند که سبب بهبود زخم می شوند (Wild et al., 2010).

ب) زخـم هـای مـزمن[2]: ایـن زخـم هـا بیشـتر ناشـی از سـازوکارهای درون زا و در ارتبـاط بـا شـرایط مسـتعد مـی باشـند کـه در نهایـت یکپـارچگی پوسـتی و بافـت اپیـدرم را بـه خطـر مـی اندازنـد (Davis et al, 1992). پـاتوفیزیولوژی غیـر طبیعـی کـه ممکـن اسـت زمینـه ی تشـکیل زخـم هـای مـزمن ماننـد زخـم هـای پـا و زخـم هـای فشـار را فـراهم کنـد شـامل بـه خطـر افتـادن خونرسـانی بافـت در نتیجـه نارسـایی در غـذا رسـانی شریانی (بیمـاری هـای رگ هـای خـونی پیرامـون) و یـا فشـار خـون سـیاهرگی و بیمـاری هـای متـابولیکی ماننـد دیابـت شـیرین مـی باشـد (Bowler et al., 2001). در واقـع ایـن زخـم هـا بـه علـت وقفـه در فراینـد مـنظم، کـه ناشی از عفونت یا بیماری های زمینه ای می باشند، بهبود نمی یابند (Wild et al., 2010).

۱-۳-۲- فرآیند بهبود زخم

فرایند بهبود زخم یک سـری پیچیـده ای از رخدادهاسـت کـه بـا یـک آسـیب شـروع مـی شـود و مـی توانـد بـرای ماه ها تا سالها ادامه پیدا کند (شکل ۱-۲). تمـام فراینـد پویـا مـی توانـد بـه سـه مرحلـه تقسـیم شـود. رونـد بهبـود زخـم خطـی نیسـت و مـی توانـد از طریـق مراحـل وابسـته بـه عوامـل مختلـف بیرونـی و درونـی بـه جلـو و عقـب پیشروی نماید (Wild et al., 2010).

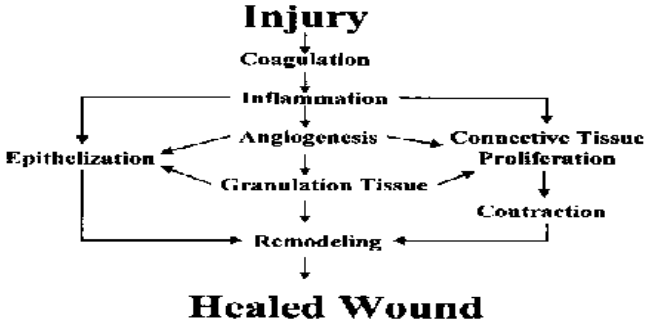
[1] Acute wounds
[2] Chronic wounds

۱-۳-۲-۱- مرحله آماس[1]

آماس یک پیش نیاز برای ترمیم زخم بوده، در این مرحله تنظیم کننده های شیمیایی از ماست سل ها، پلاکت ها و بازوفیل ها، باعث پاسخ رگی و پاسخ سلولی می شود. پاسخ رگی در نهایت باعث گشاد شدن رگ ها و در نتیجه افزایش جریان خون و حجم ترشحات و تورم بافتی می شود. پاسخ سلولی نیز باعث افزایش فاگوسیتوز می گردد. در همین مرحله ماکروفاژ های بافت های آسیب دیده تنظیم کننده هایی را ترشح می کنند که باعث تحریک مرحله بعدی (تکثیر) می شود (Watson, 2006).

مرحله آماس توسط نشانه های اصلی، قرمزی، گرما، تورم، درد و فقدان عملکرد مشخص می شود. بلافاصله پس از آسیب حاد پوست، سازوکارها و مسیر های انعقاد آغاز می شوند.

در ابتدا آبشار بیرونی انعقاد به علت صدمه به عروق بافتی با رفلکس انقباض عروق شروع می شود. عوامل بافتی و فاکتور فعال کننده کلسیم VII و پس از آن تمام آبشار انعقاد، با لخته شدن خون و انقباض عروق پایان می پذیرد که این از اتلاف بیشتر خون جلوگیری می کند. با این حال، بسیاری از میانجی ها که با فرایند انعقاد در تماس اند، فرآیندهای آماس موضعی را آغاز می کنند. پس از انقباض اولیه عروق، نشانه های کلاسیک آماس با افزایش نفوذپذیری عروق آشکار می شود. قرمزی در نتیجه ی گشاد شدن رگها به واسطه ی پروستاسیکلین[2]، پروستاگلندین[3] A، پروستاگلندین D و پروستاگلندین E ایجاد می شود. تورم به علت افزایش نفوذ پذیری رگها با گسترش شکاف های اندوتلیال عروقی می باشد که سبب خروج پروتئین های پلاسما و مایع به داخل فضای بین سلولی می شود. این تغییرات توسط پروستاگلندین E2 و پروستاگلندین F2α (Wild et al., 2010) و نیتریک اکساید و سایر تنظیم کننده های آماسی ایجاد می شود. علاوه بر این آزاد شدن برادی کینین، هیستامین و رادیکال های آزاد از گلبول های سفید نیز سبب افزایش نفوذیذیری رگی می شوند (Molnar,2006) و از ورود سلولهای آماسی به منطقه آسیب دیده حمایت می کنند. همچنین منجر به افزایش درجه حرارت های موضعی می شوند که محیطی نامناسب، برای میکروارگانیسم ها فراهم می کنند. درد به علت عمل کردن پروستاسیکلین، پروستاگلندین E و پروستاگلندین E2، بر گیرنده های محیطی درد ایجاد می شود (Wild et al., 2010).



شکل ۱-۲ شماتیکی از بهبود زخم، فرآیندهای مرتبط و دینامیکی مختلفی که در لحظه ی زخمی شدن شروع می شود و تا کامل شدن بهبود ادامه دارد را نشان می دهد (Robson et al., 2001).

[1] Inflammatory phase
[2] Prostacyclin
[3] Prostaglandin A

در این مرحله، به علت دخالت همه ی انواع گلبول های سفید خون و ماکروفاژها، مانعی در برابر یورش میکروبی ایجاد می شود. حتی درد نقش مهمی ایفا می کند زیرا فعالیت بخش آسیب دیده بدن را کاهش می دهد.

پس آماس فرایند بهبودی زخم را شروع می کند. به طرف پایان چرخه های آماسی، اجتماع در حال تکامل ایکوزانوئید ها[1] در زخم با انواع سلول های موجود واکنش می دهندکه سبب ساخت کلاژن و ماده زمینه ای توسط فیبروبلاست ها می شوند. علاوه بر این، عوامل رشد برگرفته از ماکروفاژ در سطح مطلوب، به شدت بر نفوذ اولین فیبروبلاست ها، کراتینوسیت ها و سپس سلول های اندوتلیال به داخل زخم تاثیر می گذارند. همچنین سلول های تک هسته ای به جایگزینی گلبول های سفید خون و ماکروفاژها ادامه می دهند و سپس مرحله تکثیر[2] آغاز می شود (Wild et al., 2010).

۱-۳-۲-۲- مرحله تکثیر [3]

فیبروبلاست ها از حاشیه زخم روی ماتریکس فیبری[4] شروع به مهاجرت به سمت داخل می کنند. همچنین آنها توسط فاکتور رشد فیبروبلاست پایه[5] و فاکتور رشد تومورβ[6] (ترشح شده از ماکروفاژها) و فاکتور رشد برگرفته از پلاکت ها[7] (ترشح شده از پلاکت ها) تحریک می شوند.

در هفته اول، فیبروبلاستها، گلیکوزآمینوگلیکانها (هیالورونیک اسید)، پروستاگلیکان ها[8] و کلاژن را تولید می کنند. این محصولات مواد اصلی خارج سلولی بافت گرانوله[9] هستند.

بنابراین فیبروبلاست ها سلول غالب در بافت زخمی می شوند و علاوه بر گلیکوزآمینوگلیکان ها، پروستاگلیکان ها و کلاژن، سیتوکین هایی مانند فاکتور رشد برگرفته از پلاکت ها، فاکتور رشد تومور- β، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه، فاکتور رشد کراتینوسیت و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ [10] را تولید می کنند. فیبروبلاست ها نیز مولکول های کلاژن را داخل فیبرها انباشته می کنند. از این رو تولید خالص کلاژن (ترکیب عمده بافت پیوندی زخم حاد) تا ۶ هفته بعدی ادامه می یابد. افزایش پیوسته کلاژن زخم سبب افزایش قدرت کششی می شود.

افزایش کراتینوسیت ها و سلول های اندوتلیال نیز در این مرحله بارز است، این سلول ها فاکتورهای رشد اندوکرین را تولید می کنند که رشد آنها را حفظ می کنند. به طور همزمان گسترش اندوتلیال به رگزایی کمک می کند، به عنوان مثال رگ های سالم جوانه ها را در بافت گرانوله تولید می کنند. رگ زایی جدید[11]، با فراهم کردن مواد مغذی لازم و سیتوکین ها در زخم، رشد رو به پیشرفت فیبروبلاست ها را آسان می نماید.

تخریب لخته فیبرینی و ماتریکس موقتی همراه با رسوب بافت گرانوله (ماده زمینه ای، رسوب تصادفی کلاژن ، مویرگ ها، فیبروبلاست ها) همچنان ادامه می یابد تا زمانی که زخم پوشش داده شود.

---

[1] Eicosanoids
[2] Proliferative
[3] Proliferative phase
[4] Fibrinous
[5] Basic fibroblas t growth factor (bFGF)
[6] Tumor growth factor- β
[7] Platelet derived growth factor(PDGF)
[8] Proteoglycans
[9] Granulation
[10] Insulin-like growth factor-1
[11] Neovascularization

به طور همزمان، سلول های اپیتلیال از حاشیه زخم به مهاجرت به داخل زخم ادامه می دهند تا زمانی که محل آسیب دیده بهبود یابد. در این مرحله، مهار تماسی باعث تبدیل فیبروبلاست ها به میوفیبروبلاست ها می شود. میوفیبروبلاست ها دارای الیاف اکتین انقباضی می باشند. انقباض زخم با جایگزینی حجم بافت آسیب دیده با بافت جدید ادامه می یابد، هر چند نقش دقیق میوفیبروبلاست ها به طور کامل روشن نیست. بنابراین کاهش اسید هیالورونیک و افزایش سطح کندروتین سولفات در ماده زمینه ای یا ماتریکس خارج سلولی، مهاجرت و افزایش فیبروبلاست را کند می کند و تمایز فیبروبلاست را القاء می کند. این آغاز «بلوغ» فاز بهبود زخم است (Wild et al., 2010).

۱-۳-۲-۳- مرحله بلوغ [1]

کلاژن تازه ساخته شده،که به صورت تصادفی در بافت گرانوله ته نشین شده، برای تشکیل بافت گرانوله جدید استفاده می شود. پس از آن، کلاژن درون ساختار سازمان دهی شده تر با افزایش قدرت کششی تغییر وضعیت می دهد به تدریج، کلاژن نوع I جایگزین کلاژن نوع III می شود تا نسبت پوست نرمال ۱:۴ به دست آید. همانطور که بازسازی ادامه می یابد، تجزیه کلاژن [2] متالوپروتئینازهای ماتریکس به یک حالت پایدار با ساخت کلاژن می رسند (Wild et al., 2010).

۱-۳-۳- فاکتور های موثر بر بهبود زخم

۱-۳-۳- ۱- فاکتور های موثر بر پیشرفت بهبود زخم

بهبود زخم فرآیند پیچیده تعمیر بافت پس از آسیب است (Singer and Clark, 1999). عوامل زیادی بهبود زخم را تحت تاثیر قرار می دهند که از آن جمله می توان به فاکتورهای رشد، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMP_S)، فیبرونکتین، فاکتورمهار کننده مهاجرت ماکروفاژ (MIF) و هورمون ها اشاره کرد (Lobmann et al., 2005). سیتوکین ها و واسطه های آماسی آزاد شده در محل زخم نقش کلیدی در تنظیم این فرآیندها از طریق کنترل رشد ، مهاجرت ، تمایز و افزایش سلول دارند (Slavin, 1996).

۱-۳-۳- ۱- ۱- فاکتورهای رشد

برای درک بهتر نقش سیتوکین ها و فاکتورهای رشد بر روی فرایندهای بهبود زخم می توان اثر کاهش یا افزایش فاکتورهای رشد را بر روی فرایندهای بهبود زخم مشاهده کرد (جدول ۱-۱) (Bryan et al., 2005).

۱-۳-۳-۲- فاکتور های موثر بر تاخیر در بهبود زخم

فاکتورهای متعددی می توانند منجر به آسیب دیدن بهبود زخم شوند. به طور کلی فاکتورهای موثر بر بهبود زخم به دو گروه تقسیم می شوند:

۱- فاکتورهای موضعی: این فاکتورها به طور مستقیم بر روی خصوصیات خود زخم اثر می گذارند. مانند اکسیژن و عفونت.

[1] Maturation phase
[2] Collagenolysis

جدول ۱-۱ فاکتورهای رشد دخیل در بهبود زخم (Leaper et al., 1998).

عملکرد وابسته به بهبود زخم	منشا عمده	فاکتور رشد
• تحریک رگزایی در بافت گرانوله • تحریک تشکیل رگ های خونی کلاترال[1] در بیماری عروق محیطی	پلاکت ها، نوتروفیل ها	VEGF[2]
• افزایش فیبروبلاست ها و سلول های اپیتلیال، رسوب ماتریکس؛ انقباض زخم، رگزایی • تسریع تشکیل بافت گرانوله	فیبروبلاست ها، سلول های اندوتلیال، سلولهای ماهیچه صاف ، ماکروفاژها، مغز، غده هیپوفیز	FGFs[3]
• افزایش و مهاجرت کراتینوسیت ها	فیبروبلاست ها	KGFs[4]
• تمایز، افزایش، مهاجرت و چسبندگی کراتینوسیت ها • تشکیل بافت گرانوله	پلاکت ها، ماکروفاژها، کراتینوسیت؛ بزاق، ادرار، شیر، پلاسما	EGF[5]
•میتوژنیک برای سلول های ماهیچه صاف، سلول های اندوتلیال و فیبروبلاست ها •جاذب شیمیایی برای نوتروفیل ها و فیبروبلاستها • افزایش فیبروبلاست و متابولیسم کلاژن	پلاکت ها، فیبروبلاست ها، ماکروفاژها، سلول های اندوتلیال	PDGF[6]
• تحریک تولید نوتروفیل ها • افزایش عملکرد نوتروفیل ها و مونوسیت ها • توسعه افزایش سلول های کراتینوسیت	مونوسیت ها، فیبروبلاست ها، لنفوسیت ها	G-CSF[7]
• واسطه های افزایش سلول های اپیدرمی	کراتینوسیت ها، ماکروفاژها، لنفوسیتها، فیبروبلاست ها	GM-CSF[8]
• تحریک افزایش سلولهای اپیتلیال و فیبروبلاست • تشکیل بافت گرانوله	ماکروفاژهای فعال شده، پلاکت ها، سلول های اپیتلیال	TGF-α[9]
• افزایش فیبروبلاست	ماکروفاژها، ماستوسیت ها، لنفوسیتT	TNF[10]
• کیموتاکسیک نوتروفیل و افزایش فیبروبلاست	ماکروفاژها، لنفوسیتها، بسیاری از بافت ها و سلولهای دیگر	IL-1
• میتوژنیک برای فیبروبلاست و سلول ماهیچه صاف • کیموتاکتیک برای ماکروفاژها • تحریک رگزایی (غیر مستقیم) و متابولیسم کلاژن	پلاکت ها ، ماکروفاژها، فیبروبلاست ها، نوتروفیل ها، کراتینوسیت ها	TGF-β[11]
• افزایش فیبروبلاست • تحریک ساخت پروتئوگلیکان های سولفاته و کلاژن	فیبروبلاست ها، پلاسما، کبد	IGF-1[12]
• اپیتلیزاسیون مجدد • نئو وزکولاریاسیون[13] و تشکیل بافت گرانوله	فیبروبلاست ها، کراتینوسیت ها، سلول های اندوتلیال، سلولهای تومور	HGF[14]

[1] Collateral
[2] Vascular endothelial growth factor
[3] Fibroblast growth factors
[4] Keratinocyte growth factors
[5] Epidermal growth factor
[6] Platelet-derived growth factor
[7] Granulocyte-colony stimulating factor
[8] Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
[9] Transforming growth factor-α
[10] Tumour necrosis factor
[11] Transforming growth factor-β
[12] Insulin-like growth factor-1
[13] Neovascularization
[14] Hepatocyte growth factor