

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی

با عنوان:

مطالعه اثرات ترمیمی و ضد میکروبی پوست قورباغه مردابی گونه *Rana ridibunda* بر  
زخم های پوست خوکچه هندی

اساتید راهنما:

دکتر ناصر مهدوی شهری

دکتر منصور مشرقی

اساتید مشاور:

دکتر مرتضی بهنام رسولی

دکتر احمد آسوده

تحقیق و تالیف:

ماهره رضازاده بزاز

تابستان ۱۳۹۰

اول و آخر تویی مادر میان

بچ بیچی که نیاید در میان

اثری کوچک است، خیلی کوچک، ابا رسم ادب تقدیم می شود به پدر و مادر بزرگوار و مهربانم:

به پاسداشت تمامی زحماتی که در دوران پر فراز و نشیب زندگی ام تحمل شدند

و در راه کسب علم و معرفت برای من آنچه در توان داشتند انجام دادند.

با تشکر و سپاس فراوان از همراه مسیر زندگی ام و به کارم در این پیمان نامه، به سر عزیزم جناب آقای محمد مشرفی که از سر لطف از انجام بچ گلکی فروگذاری نمودند.

با سپاس بی پایان از زحمات بی شائبه اساتید را به نام جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شیری و جناب آقای دکتر منصور مشرفی که در دوران تحصیل و در انجام این پیمان نامه مشوق

اینجانب بوده اند و همواره از مساعدت ها و ایده های خوب آنان بهره مند گردیده ام.

و قدردانی خالصانه از اساتید مشاورم جناب آقای دکتر مرتضی بهنام رسولی و جناب آقای دکتر احمد آسوده به خاطر همه کمک های بی دریغ ایشان که در به ثمر رساندن این پایان نامه راه گشایم بوده است.

و از سرکار خانم دکتر رویالاری و جناب آقای دکتر مهدی جلالی که زحمات داورانی این پایان نامه را بر عهده داشتند، صمیمانه سپاس گزاری می نمایم.

بر خود لازم می دانم تا از مسئولین محترم آزمایشگاه های مختلف گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه و کلیه دوستانی که در طول انجام پایان نامه ام مزیاری دادند، قدردانی و تشکر نمایم.

## فهرست مطالب

- چکیده: ..... ۵
- مقدمه و هدف از انجام طرح: ..... ۵
- علائم اختصاری: ..... ۵

## فصل اول: کلیات

- ۱-۱) کلیاتی درباره پوست: ..... ۱
- ۱-۱-۱) اپیدرم: ..... ۲
- ۱-۱-۱-۱) طبقه قاعده ای: ..... ۲
- ۱-۱-۱-۲) طبقه خاردار: ..... ۲
- ۱-۱-۱-۳) طبقه دانه دار: ..... ۳
- ۱-۱-۱-۴) طبقه شفاف: ..... ۳
- ۱-۱-۱-۵) طبقه شاخی: ..... ۳
- ۱-۲) درم: ..... ۳
- ۱-۲-۱) لایه مشبک: ..... ۴
- ۱-۲-۱-۱) لایه پاپیلار: ..... ۴
- ۱-۲) کلیاتی درباره ترمیم زخم: ..... ۵
- ۱-۲-۱) فاز التهابی: ..... ۵
- ۱-۲-۱-۱) هموستاز: ..... ۵
- ۱-۲-۱-۲) التهاب: ..... ۶
- ۱-۲-۱-۳) فاز تکثیر: ..... ۸
- ۱-۲-۱-۴) بافت گرانوله: ..... ۸
- ۱-۲-۱-۵) مهاجرت: ..... ۸
- ۱-۲-۱-۶) تولید ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد: ..... ۹
- ۱-۲-۱-۷) رگ زایی: ..... ۱۰
- ۱-۲-۱-۸) بازسازی اپیتلیوم: ..... ۱۱
- ۱-۲-۱-۹) فاز بلوغ: ..... ۱۲

- ۱۳ ..... کلیاتی درباره انواع زخم ها: (۳-۱)
- ۱۴ ..... کلیاتی درباره پوشش دهنده های بیولوژیکی: (۴-۱)
- ۲۰ ..... کلیاتی درباره دوزیستان: (۵-۱)
- ۲۲ ..... گونه *Rana ridibunda*: (۱-۵-۱)
- ۲۲ ..... کلیاتی درباره پوست دوزیستان: (۲-۵-۱)
- ۲۸ ..... اثرات ضد میکروبی پوست قورباغه: (۳-۵-۱)
- ۳۰ ..... کلیاتی درباره میکروبیولوژی زخم: (۶-۱)
- ۳۲ ..... عفونت زخم: (۷-۱)
- ۳۳ ..... کلیاتی درباره خوکچه هندی به عنوان جانور آزمایشگاهی: (۸-۱)
- ۳۴ ..... تاریخچه استفاده از پوست قورباغه در تحقیقات ترمیم زخم: (۹-۱)

#### فصل دوم: مواد و روش ها

- ۳۶ ..... مواد و محلول ها: (۱-۲)
- ۳۷ ..... وسایل و دستگاه ها: (۲-۲)
- ۳۸ ..... حیوانات و شرایط نگهداری: (۳-۲)
- ۴۰ ..... روش تیمار جانوران: (۵-۲)
- ۴۰ ..... نحوه آماده سازی تیمار زخم های پوست پشت خوکچه هندی: (۱-۵-۲)
- ۴۱ ..... روش انجام تست باکتریایی: (۶-۲)
- ۴۱ ..... روش بررسی تعداد باکتری ها: (۱-۶-۲)
- ۴۲ ..... روش بررسی نوع باکتری ها: (۲-۶-۲)
- ۴۲ ..... روش رنگ آمیزی گرم: (۱-۲-۶-۲)
- ۴۲ ..... روش های کشت اختصاصی باکتری ها: (۲-۲-۶-۲)
- ۴۵ ..... روش انجام تست نفوذ باکتری: (۳-۶-۲)
- ۴۸ ..... روش بررسی زخم ها: (۷-۲)
- ۴۸ ..... روش بررسی ماکروسکوپی: (۱-۷-۲)
- ۴۹ ..... روش بررسی میکروسکوپی: (۲-۷-۲)

۵۷ ..... (۸-۲) بررسی آماری: .....

### فصل سوم: نتایج

۵۸ ..... (۱-۳) نتایج ماکروسکوپی: .....

۶۳ ..... (۲-۳) نتایج میکروسکوپی: .....

۶۴ ..... (۱-۲-۳) تعداد سلول های فیبروبلاستی .....

۶۹ ..... (۲-۲-۳) تعداد سلول های التهابی: .....

۷۳ ..... (۳-۲-۳) ضخامت اپیتلیوم: .....

۷۸ ..... (۴-۲-۳) رگ زایی: .....

۸۲ ..... (۵-۲-۳) تراکم باندل های کلاژن: .....

۸۹ ..... (۳-۳) نتایج میکروبی: .....

۸۹ ..... (۱-۳-۳) نتایج بررسی تعداد باکتری ها: .....

۹۴ ..... (۲-۳-۳) نتایج بررسی نوع باکتری ها: .....

۹۵ ..... (۳-۳-۳) نتایج تست نفوذ باکتری: .....

۹۷ ..... (۴-۳) جمع بندی نتایج: .....

### فصل چهارم: بحث

۹۹ ..... (۱-۴) بحث: .....

۱۱۱ ..... (۲-۴) نتیجه گیری کلی: .....

۱۱۳ ..... (۳-۴) پیشنهادات: .....

۱۱۴ ..... منابع: .....

**چکیده:**

تسریع روند ترمیم زخم و افزایش کیفیت بازسازی زخم یک اصل در مدیریت زخم می باشد. پوست دوزیستان از زمان های گذشته برای پوشش دهی زخم استفاده می شده است و مطالعات جدید نیز دفاع طبیعی پوست دوزیستان، توسط پپتید های ضد میکروبی موجود در پوست آنها و ترکیباتی در پوست قورباغه را نشان داده که در افزایش کارایی پوست قورباغه در ترمیم زخم کاربرد دارند. هدف این مطالعه بررسی پتانسیل پوست قورباغه به عنوان پوشش دهنده بیولوژیکی زخم در ترمیم زخم و کاهش آلودگی باکتریایی در موضع زخم می باشد. ابتدا با استفاده از تزریق درون عضلانی کتامین  $40\text{ mg/kg}$  و زایلین  $5\text{ mg/kg}$  در پشت هر خوکچه هندی ۴ عدد زخم ایجاد شده است، سپس پوست قورباغه گونه *Rana ridibunda* از سمت درمی و از سمت اپیدرمی به عنوان گروه های تست بر روی زخم ها گذاشته شد و زخم های گروه کنترل نیز توسط پانسمان معمولی زخم پوشش دهی گردید. طی روزهای صفر، سه، پنج و هفت بعد از ایجاد زخم، نمونه هایی به صورت استریل از زخم ها گرفته شدند تا کمیت و مشخصات فلور باکتریایی بدست آید. به منظور بررسی بسته شدن زخم، از موضع زخم عکس برداری گردید و سپس ناحیه زخم برای مطالعات میکروسکوپی جدا شد. تعداد فیروبلاست ها، تعداد سلول های التهابی، ضخامت اپیتلیال، میزان رگ زایی و مقدار کلاژن پارامترهای میکروسکوپی می باشند که در موضع زخم میزان ترمیم زخم را نشان می دهند. مطالعه نفوذ باکتریایی نیز در پوست قورباغه پذیرفت تا نفوذ باکتری ها در پوست قورباغه به عنوان پوشش دهنده زخم سنجیده شود و نتایج آن با یک پوشش دهنده استاندارد زخم مقایسه گردید. نتایج آماری کمی و کیفی بدست آمده از این پژوهش، حاکی از این است که زخم هایی که با پوست قورباغه از سطح درمی و اپیدرمی پوشش داده شده اند روند ترمیمی سریع تری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهند. مطالعات میکروبی نیز کاهش باکتری را در زخم های گروه های تست در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهند. به علاوه تست نفوذ باکتریایی نشان داد که پوست قورباغه یک سد نفوذ ناپذیر در برابر باکتری ها می باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق اثرات جالب ترمیمی و مشخصات ضد باکتریایی را در پوست قورباغه نشان می دهد و می توان نتیجه گرفت که پوست قورباغه کارایی لازم را جهت پوشش دهی زخم ها دارا می باشد و می تواند در آینده نوید بخش یک پانسمان بیولوژیکی زخم موثر باشد.

**واژه های کلیدی:** پوشش دهنده زخم، پوست قورباغه، *Rana ridibunda*، ترمیم زخم، اثر ضد میکروبی



## مقدمه و هدف از انجام طرح:

زخم، به عنوان هرگونه تخریب یکپارچگی پوست، غشای موکوسی و یا بافت ارگان شناخته می شود. زخم ها می توانند بوسیله علت های مختلفی از جمله مکانیکی، حرارتی، شیمیایی و یا آسیب تشعشعی ایجاد شوند. ترمیم زخم فرایند پیچیده ای است که برای مدت بیش از ۱۲۰ سال موضوع تحقیقات گسترده قرار گرفته است، فرایند بهبود زخم شامل سه فاز است: فاز التهابی، فاز تکثیر، فاز بلوغ. در بسیاری از زخم ها بسته شدن سریع زخم در بهبود وضعیت بیمار نقش حیاتی بازی می کند. به خصوص در سوختگی های گسترده برای حفظ وضعیت بدن و جلوگیری از تغییر متابولیکی آن، بسته شدن سریع زخم اهمیت فراوانی دارد. جایگزین های پوستی، گروهی از مواد هستند که به صورت موقتی یا دائمی باعث بسته شدن زخم می شوند که می توانند باعث کاهش رگی شدن بستر زخم، افزایش ترکیبات پوستی ترمیم زخم و کاهش یا حذف فاکتورهای بازداستی و کاهش پاسخ التهابی و همینطور ایجاد یک پوشش ایمن می گردند و همینطور بیو اسکفلدی برای مهاجرت و چسبندگی سلول ها و رگ زایی را ایجاد می کنند. پوشش دهنده های بیولوژیک زخم گروهی از جایگزین های پوستی با منشا حیوانی هستند که شامل صفاق، غشای آمیون، اومنوم، پوشش های کلاژنی، محصولات ماده خارج سلولی، لوله ادراری، غضروف حلقی، مری، غشای شکمی، دیافراگم، سخت شامه، تاندون و پوست قورباغه و... می باشند. پوست قورباغه به عنوان یک پوشش دهنده زیستی از دیرباز مورد استفاده بوده است و پوست سوسمار آبی در فرهنگ غربی در دهه ۱۶۰۰مورد استفاده قرار گرفته است و در عصر حاضر هم پوشش دهنده بیولوژیکی از پوست قورباغه در بعضی نقاط جهان از جمله ویتنام و آمریکای جنوبی استفاده می شود. هدف اصلی از انجام این طرح پاسخ گویی به این سوال است که آیا پوست قورباغه گونه *Rana ridibunda* اثرات التیام بخشی و ضد میکروبی مناسب را به عنوان یک پوشش دهنده زخم دارد؟

## علائم اختصاری:

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

Cyr<sup>٦١</sup>: Cysteine-rich <sup>٦١</sup>

EA-<sup>٥٠</sup>: Eosin Azure

ECM: Extra Cellular Matrix

EMB: Eosin-Methylene Blue Agar

FGF: Fibroblast Growth Factor

HGF: Hepatocyte Growth Factor

IL  $\alpha$  and  $\beta$ : Interleukin-Alpha and Beta

IM: Intra Muscular

MMPs: Matrix Metallo Proteinase

NGF: Nerve Growth Factor

PBS: Phosphate Buffered Saline

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PMNs: Poly Morpho Nuclears

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta

TIMPs: Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-Alpha

TSA: Tryptone Soybean Agar

UPA: Urokinase Plasminogen Activator

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

### ۱-۱) کلیاتی درباره پوست:

پوست، سطح یکپارچه بیرونی و بزرگ ترین ارگان بدن می باشد که تقریباً یک ششم وزن بدن را تشکیل می دهد و چهار عملکرد اصلی دارد:

حفاظت: پوست بدن را در برابر اشعه مضر خورشید و آسیب های مکانیکی، شیمیایی و حرارتی حفاظت می کند و یک سطح نسبتاً نفوذ ناپذیر ایجاد می کند که سدی در برابر از دست رفتن آب و ورود میکرو ارگانیسم ها ایجاد می کند.

حس: پوست بزرگ ترین ارگان حسی بدن است و دارای انواع مختلفی از گیرنده ها برای حس لامسه، فشار، درد و دما می باشد.

تنظیم دما: وجود مو و بافت چربی در پوست، بدن را در برابر از دست دادن گرما محافظت می کند و همینطور خنک کردن بدن نیز بوسیله پوست صورت می پذیرد.

عملکرد متابولیکی: بافت چربی زیر جلدی دارای یک نقش ذخیره انرژی اند و ویتامین D در اپیدرم سنتز می شود.

در قسمت های مختلف بدن، پوست از لحاظ ضخامت، رنگ و حضور یا عدم حضور مو، غدد و ناخن متفاوت می باشد. علاوه بر این تغییرات که نشان از عملکرد های مختلف پوست دارد، همه انواع پوست در جانوران مختلف، دارای ویژگی های ساختاری مشابه اند. سطح خارجی پوست دارای یک اپیتلیوم کراتینه فلسی است که روپوست یا اپیدرم نام دارد که بر اساس عملکرد قطر متفاوتی دارد و عمدتاً از کراتینوسیت ها تشکیل شده است و در لایه های پایینی، اپیدرم حاوی ملانوسیت هاست که نقش رنگ دانه دارکننده دارند. اپیدرم هم بوسیله یک لایه ضخیم و متراکم از بافت فیبروالاستیک تغذیه و حمایت می شود که میان پوست یا درم نام دارد. درم هم بوسیله لایه زیر جلدی زیر پوست یا

هیپودرم، که حاوی بافت چربی است به بافت های زیرین متصل می شود. اپیدرم پستانداران و ضمام آن پایداری خود را بوسیله بازیابی پایدار سلول های لایه پایه حفظ می کنند. فولیکول های مو، غدد عرق، غدد چربی و ناخن که همگی ضمام اپیدرم هستند، در دوران جنینی از رشد اپیتلیوم به سمت درم و زیر درم ایجاد می شوند (۱، ۲).

### ۱-۱-۱) اپیدرم<sup>۱</sup>:

اپیدرم عمدتاً از اپیتلیوم سنگفرشی مطابق شاخی تشکیل شده است. سه نوع دیگر سلول نیز در آن دیده می شود، ملانوسیتها، سلول های مرکل و سلول های لانگرهانس. اپیدرم از طرف درم به سمت خارج پنج طبقه سلول مولد کراتین به نام کراتینوسیت دارد.

#### ۱-۱-۱-۱) طبقه قاعده ای<sup>۲</sup>:

یک لایه تک سلولی از سلولهای مکعبی یا استوانه ای بازوفیل است که در لایه قاعده ای در محل اتصال درم و اپیدرم قرار گرفته است. دسموزوم ها و نیمه دسموزوم ها در سلول های این طبقه باعث اتصال سلول های این طبقه به یکدیگر می شود. خصوصیت طبقه قاعده ای فعالیت میتوزی شدید آن است و به همراه قسمت ابتدایی لایه بعدی، مسئول جایگزینی مداوم سلول های اپیدرمی می باشد.

#### ۱-۱-۱-۲) طبقه خاردار<sup>۳</sup>:

در این لایه سلول های مکعبی یا کمی مسطح قرار دارند که هسته ای مرکزی داشته و توسط دسموزوم ها و خارهای سیتوپلاسمی پر از فیلامان که تونو فیبریل خوانده می شوند، محکم به یکدیگر وصل می شوند که به سطوح ظاهری خارمانند به آن می دهند.

<sup>۱</sup> Epidermis

<sup>۲</sup> Stratum basale

<sup>۳</sup> Stratum spinosum

**۱-۱-۱) طبقه دانه دار<sup>۱</sup>:**

این لایه ۳ تا ۵ ردیف سلول مسطح چند ضلعی دارد که در این سلول ها، سیتوپلاسم محتوی گرانول های بازوفیل کراتوهیالین، گرانول های تیغه ای می باشد.

**۱-۱-۱) طبقه شفاف<sup>۲</sup>:**

سلول های این لایه ائوزینوفیل و مسطح هستند که بیشتر در پوست های ضخیم به صورت لایه نازک و شفاف مشخص می باشند. ارگانل ها و هسته ها مشخص نبوده و سیتوپلاسم عمدتاً حاوی فیلامان های متراکم و فشرده است.

**۱-۱-۱) طبقه شاخی<sup>۳</sup>:**

این طبقه دارای ۱۵ تا ۲۰ ردیف سلول شاخی بدون هسته مسطح می باشند که سیتوپلاسم آنها حاوی کراتین است. پس از شاخی شدن سلول ها، فقط پروتئین های بی شکل و رشته ای و غشاهای ضخیم شده در آنها باقی می مانند و در این حالت به آنها سلول های شاخی<sup>۴</sup> می گویند.

**۱-۱-۱) درم<sup>۵</sup>:**

درم بافت همبندی است که اپیدرم را حمایت کرده و آن را به بافت زیر جلدی یا هیپودرم متصل می کند. سطح درم بسیار نامنظم است و زوائد آن یا پاپیل ها ی درمی در بین زوائد اپیدرمی فرو رفته اند.

---

<sup>۱</sup> Stratum granulosum

<sup>۲</sup> Stratum lucidum

<sup>۳</sup> Stratum corneum

<sup>۴</sup> Horny cells

<sup>۵</sup> Dermis

درم یا پوست حقیقی، با دوام، قابل انعطاف و بسیار الاستیک است. در نقاط مختلف بدن دارای ضخامت های مختلف است. درم حاوی، نمدی از بافت پیوندی است با مقدار متغیری از فیبر های الاستیک و رگ های خونی و اعصاب است. فیبر های ماهیچه ای غیر مخطط در لایه های سطحی قرار دارند. بافت پیوندی در دولایه طبقه بندی می شود، یک لایه عمیق تر یا مشبک و یک لایه سطحی یا پاپیلار.

#### ۱-۱-۲-۱) لایه مشبک<sup>۱</sup>:

این لایه حاوی باند های بهم پیچیده ی قوی، شامل بافت سفید فیروز است، ولی برخی فیبرهای الاستیک زرد رنگ هم وجود دارند. اجسام بافت همبندی، فضای میان باند های فیروز سفید را پر می کند.

#### ۱-۱-۲-۲) لایه پاپیلار<sup>۲</sup>:

این لایه حاوی تعداد زیادی برجستگی های کوچک یا پاپیل است که این ساختمان ها محل اتصال درم و اپیدرم را افزایش می دهند و آن را تقویت می کنند (۳).

<sup>۱</sup>Reticular layer

<sup>۲</sup>Papillary layer

**۲-۱) کلیاتی درباره ترمیم زخم:**

زخم به عنوان هرگونه تخریب یکپارچگی پوست، غشای موکوسی و یا بافت اندام ها شناخته می شود. زخم ها می توانند به علت های مختلفی از جمله آسیب مکانیکی، حرارتی، شیمیایی و یا تشعشعی ایجاد شوند. به طور کلی زخم ها می توانند سطحی و ساده و محدود به پوست باشند و یا قسمت های عمقی تر مثل ماهیچه، اعصاب و یا رگ ها را درگیر کنند و پیچیده تر باشند.

نگهداری از زخم ها و به کارگیری پوشش دهنده های زخم بوسیله پزشکان صورت می گیرد، ولی هدف اولیه حفاظت از زخم ها بسته شدن سریع زخم و ایجاد پوشش دهی مناسب و کاربردی برای زخم است. فرایند ترمیم زخم پیچیده است و برای مدت بیش از ۱۲۰ سال موضوع تحقیقات گسترده قرار گرفته است.

یافته های جدید در بیولوژی مولکولی که در سالهای اخیر به دست آمده اند بینش ما را در زمینه ی فرایند ترمیم زخم گسترش داده اند. افزایش دانش ما در رابطه با فیزیولوژی و بیولوژی فرایند ترمیم زخم می تواند کمک شایانی به ایجاد بستری مناسب برای بهبود هرچه سریع تر انواع زخم ها بنماید. (۴).

فرایند بهبود زخم به سه فاز تقسیم می شود: فاز التهابی، فاز تکثیر، فاز بلوغ.

**۱-۲-۱) فاز التهابی:****۱-۲-۱-۱) هموستاز:**

ترمیم زخم با هموستاز آغاز می شود، که نشانه این مرحله تشکیل لخته خونی و قطع خونریزی است. در سطح سلولی، واسطه های پر اهمیت در هموستاز، فیبرین ها، پلاکت ها و رگ های خونی هستند. لخته خونی چیزی بیش از خون خشک شده است و ماتریکسی پروتئینی و سلولی پویا و بادوام است

که نه تنها در هموستاز نقش دارد بلکه شبکه ای موقتی برای سلول های التهابی، فیبروبلاست ها و فاکتورهای رشد ایجاد می کند (۵).

فیبرین ها برای مهاجرت سلولی و تولید ماتریکس خارج سلولی ، مورد نیاز اند. فیبرین ها همچنین مخزن فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها هستند، برای مثال، فاکتور رشد فیبروبلاستی<sup>۱</sup> و فاکتور رشد اندوتلیال رگی<sup>۲</sup> به فیبرین متصل شده و رگ زایی را تحریک می کنند (۶). گرانول های پلاکتی به عنوان منبع ذخیره ای پروتئین های فعال بیولوژیکی مانند انواع فاکتورهای رشد و فاکتورهایی که در تشکیل لخته خونی و ماتریکس نقش دارند و بسیاری دیگر از این پروتئین ها، در فاز های مختلف ترمیم زخم نقش دارند، عمل می کنند (۷). انقباض عروقی از ابتدای ایجاد زخم تا ۱۵ دقیقه بعد از آن، بوسیله آمین های فعال رگی<sup>۳</sup> آزاد شده از سلول های آسیب دیده مانند پروستاگلاندین ها و ترومبوکسان ها، ادامه می یابد (۸).

### ۱-۲-۱-۲) التهاب:

در این فاز در اثر فرایند های تنظیمی سیستم عصبی، سایتوکاین ها و کموکاین ها نفوذ پذیری عروق افزایش می یابد (۵). ماست سل ها، یک تعداد از واسطه های عروقی مانند هیستامین و لوکوترین های C<sub>۴</sub> و D<sub>۴</sub> را تولید می کنند (۹). دیگر عواملی که موجب افزایش نفوذ پذیری عروق می گردد شامل: کینین ها و ترومبین ها هستند که اتساع عروق را موجب می شوند (۱۰).

سلول های چند هسته ای<sup>۴</sup> اولین سلول های التهابی هستند که به ناحیه زخم می رسند (۱۱). چندین فاکتور رشد و سایتوکاین مانند فاکتور رشد مشتق از پلاکت<sup>۵</sup>، اینترلوکین ۸<sup>۶</sup>، آنکوژن وابسته به رشد باعث جذب سلول های چند هسته ای به ناحیه زخم می شوند (۶). سلول های چند هسته ای به

<sup>۱</sup> FGF-۲

<sup>۲</sup> VEGF

<sup>۳</sup> Vasoactive amines

<sup>۴</sup> PMNs

<sup>۵</sup> PDGF

<sup>۶</sup> IL<sup>۸</sup>



عنوان اولین پاک کننده ناحیه زخم، بقایا و ذرات خارجی موجود در ناحیه زخم و باکتری ها را حذف می کند (۱۲) و منبعی برای چندین سایتوکاین پیش التهابی از جمله اینترلوکین ۱ آلفا و بتا<sup>۱</sup>، اینترلوکین ۶<sup>۲</sup> و فاکتور نکروز توموری آلفا<sup>۳</sup> می باشد (۶). مونوسیت ها مدت کوتاهی بعد از سلول های چند هسته ای به بستر زخم وارد می شوند و به ماکروفاژ ها تبدیل می شوند (۱۲). ماکروفاژ ها بقایا و ذرات خارجی موجود در ناحیه زخم و باکتری ها را حذف می کنند. فیبرونکتین، الاستین، فاکتورهای کامپلمان از جمله C<sup>۳</sup>a و C<sup>۵</sup>a، ترومبین و فاکتور رشد تبدیلی<sup>۴</sup> باعث جذب ماکروفاژها به بستر زخم می شوند. ماکروفاژ ها در ماتریکس خارج سلولی<sup>۵</sup> بر پایه فیبرین ساکن می شوند و تعداد زیادی فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها را ترشح می کنند مانند، اینترلوکین ۱ آلفا و بتا، اینترلوکین ۶ و فاکتور نکروز توموری آلفا، ماکروفاژها بوسیله فاکتورهای رشد و سایتوکاین هایی که ترشح می کنند باعث تحریک تولید کلاژن در فیبروبلاست ها، آنژیوژنز و بازسازی اپیتلیوم میگردند (۶).

سلول های T، نقش مهمی در ترمیم زخم دارند. زیر مجموعه های سلول های T شامل انواع CD<sup>۴</sup>+، CD<sup>۸</sup>+ و گامادلتا<sup>۶</sup> می باشند که هر کدام به نوعی در ترمیم زخم شرکت می کنند، از جمله، سلول های T گامادلتای انسانی که فاکتور رشد بافت همبند را تولید می کنند که سلول های فیبروبلاست را برای تولید کلاژن تحریک می کنند (۱۳). نوع دیگری از سلول های T گامادلتا با تولید انواعی از فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، در تکثیر کراتینوسیت ها در ترمیم زخم دخیل هستند (۱۴).

عملکرد فیبروسیت ها در فرایند ترمیم زخم به تولید کلاژن، سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد مربوط می شود و تا حدودی توسط اینترلوکین ۱ بتا و فاکتور نکروز توموری آلفا تنظیم می شود (۱۳).

<sup>۱</sup> IL ۱ α and β

<sup>۲</sup> IL ۶

<sup>۳</sup> TNF-α

<sup>۴</sup> TGF-β

<sup>۵</sup> ECM

<sup>۶</sup> δγ

انوزینوفیل ها بواسطه تولید فاکتور نکروز توموری آلفا نقش مهمی در فرایند ترمیم زخم دارند. این فاکتور رشد در بازسازی اپیتلیال توسط کراتینوسیت ها مشارکت دارد (۶).

### ۱-۲-۲) فاز تکثیر:

#### ۱-۲-۲-۱) بافت گرانوله:

در حدود روز چهارم بعد از ایجاد زخم، ماتریکس خارج سلولی تولید شده در فاز التهابی، کم کم توسط بافت گرانوله جایگزین می شود. این جایگزینی ابتدا با ظهور مویرگ های خونی آغاز می شود و اجزایی برای تعمیر درم به بافت گرانوله وارد می شوند که شامل فیبروبلاست ها و کلاژن (تولید شده توسط فیبروبلاست ها) می باشند. همچنین بافت گرانوله دارای ماکروفاژ نیز می باشد که به علت تولید انواعی از فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها پل ارتباطی بین فاز التهابی و فاز تکثیر هستند (۱۲).

#### ۱-۲-۲-۱) مهاجرت:

مهاجرت فیبروبلاست ها توسط فاکتور رشد مشتق از پلاکت، فاکتور رشد عصبی<sup>۱</sup>، فاکتور رشد تبدیلی، فاکتور رشد بافت همبندی<sup>۲</sup>،  $CyT61$  تحریک می شود (۶).

فیبرونکتین موجود در ماتریکس خارج سلولی اولیه و موقتی، نیز به فیبروبلاست ها متصل شده و باعث تحریک مهاجرت آنها می شود. برای تسهیل مهاجرت فیبروبلاست ها اینتگرین ها سطحی بر روی سطح این سلول ها ایجاد شده تا با ماتریکس خارج سلولی باند شده و چندین جزء ماتریکس را آزاد کنند، مانند، فیبرین، ویترونکتین، فیبرونکتین و هیالورونیک اسید (۱۵). در طول مسیر مهاجرت فیبروبلاست ها با موانعی مانند بقایای سلولی و فیبریل های ماتریکس سلولی مواجه می شوند که برای

<sup>۱</sup>NGF  
<sup>۲</sup>CTGF

فایق آمدن بر این موانع چندین نوع از متالوپروتئیناز های ماتریکس<sup>۱</sup>، در آنها با تحریک فاکتور رشد تبدیلی بتا، بیان می شوند که قادر به تجزیه هر شکلی از ماتریکس می باشند (۱۶).

افزایش جمعیت فیروبلاستی در ماتریکس موقتی، از یک طرف به مهاجرت سلولی وابسته است و از طرف دیگر مدیون تکثیر سلولی آنها می باشد (۶).

سلول های پیش ساز شبه فیروبلاست که درون خون حضور دارند به ناحیه زخم مهاجرت می کنند و در آنجا به سلول های شبه فیروبلاستی تمایز می یابند و ترمیم بافتی را میانجی گری می نمایند. حضور تعداد زیادی سلول های شبه فیروبلاستی با ورود سلول های التهابی نشان می دهد که این جمعیت کثیر سلولی به تنهایی از طریق مهاجرت از بافت های مجاور تامین نمی شود و با کمک خون محیطی افزایش می یابد (۲، ۱۷). در زخم های کوچک فیروبلاست ها می توانند از بافت های سالم اطراف به ناحیه زخم مهاجرت نمایند، اما در زخم های عمیق تر و گسترده تر که فاصله زخم از بافت سالم زیاد می باشد فیبروسیت ها، که مسئول بازسازی زخم هستند، از طریق جریان خون به محل آسیب دیده می رسند (۱۸).

این فرضیه مطرح است که پیش ساز فیبروسیت ها قبل از ورود به محل زخم با سلول های T واکنش می دهند و در محل زخم به دلیل قرار داشتن در معرض فاکتور رشد تبدیلی بتا ۱ به فیبروسیت های بالغ تمایز می یابند (۱۸).

### ۱-۲-۲-۳) تولید ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد:

دو عمل اصلی فیروبلاست ها در ماتریکس موقت شامل، تولید ماتریکس دائمی که حاوی کلاژن، گلیکوزآمین گلیکان ها و پروتئوگلیکان ها و تولید فاکتورهای رشد است که توسط تولید این فاکتور

<sup>۱</sup>MMPs

های رشد، فیبروبلاست ها عملکرد دیگر سلول ها را در ماتریکس کنترل می کنند، مخصوصا تولید اینترلوکین ۱ و فاکتور نکروز توموری آلفا که در فاز اولیه ترمیم زخم تولید فاکتور رشد مشتق از پلاکت را تحریک می کنند که دارای چندین عملکرد در فرایند ترمیم زخم می باشد. تولید Cyr<sup>۶۱</sup> توسط فیبروبلاست ها نیز با تنظیم التهاب، رگ زایی، واکنش متقابل سلول \_ ماتریکس و تغییر وضعیت ماتریکس همراه است (۶).

### ۱-۲-۲-۴) رگ زایی:

رگ زایی فرایندی است که در آن عروق خونی آسیب دیده توسط مویرگ های دست نخورده در محل زخم جایگزین می شوند. افزایش لاکتات، کاهش pH و تراکم پایین اکسیژن باعث تحریک رگ زایی در محل آسیب دیده می شود. همچنین، چندین فاکتور رشد و سایتوکاین که در طول فاز التهابی تولید شده اند، رگ زایی را تحریک و تنظیم می کنند. چهار فاکتور رشد که در رگ زایی نقش مهمی دارند، فاکتور رشد تبدیلی بتا، فاکتور رشد فیبروبلاستی<sup>۱</sup>، فاکتور رشد اندوتلیال رگی<sup>۲</sup> و آنژیوپوپنتین<sup>۳</sup> هستند (۱۹).

از حدود روز دوم بعد از ایجاد زخم، سلول های اندوتلیال رگی از طریق ماتریکس خارج سلولی موقتی، شروع به مهاجرت به سمت ناحیه آسیب دیده می کنند، مهاجرت توسط فاکتور های رشد ذکر شده تحریک می شوند (۲۰). برای مهاجرت سلول های اندوتلیال از طریق ECM، اینتگرین ها و MMPs باید در این سلول ها بیان شوند (۱۶).

<sup>۱</sup>FGF

<sup>۲</sup>VEGF

<sup>۳</sup>Angiopoietin