



پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی  
گرایش سلولی تکوینی

عنوان

**بررسی هیستولوژیکی اثرات التیام بخش مخلوط روغن کره گاو  
(ghee) و مورفین بر زخم‌های پوستی موش صحرایی نر**

استادان راهنما :

دکتر ناصر مهدوی شهری

دکتر مسعود فریدونی

استاد مشاور:

دکتر مجید فرهودی

نگارش:

اعظم وفایی

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تقدیم بہ:

دو خوشید تابان زندگی ام، پدر و مادر عزیزم

کہ کرمای وجودشان سخط سخط شور زندگی راد وجودم جاری می نماید.

پاس‌گزاری میکنم از

استاد ارجمندم جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شهری به پاس راهنمایی‌های ارزنده‌شان در کلیه مراحل

انجام این رساله

قدر دانی میکنم از

حضور سبز و زحمات بی‌دریغ معلم دانا و بی‌مثالم جناب آقای دکتر مسعود فریدونی

و ارج می‌نم‌زحمات استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر مجید فرهودی

و به خود می‌بالم که در این عصر نحی

دوستانی دارم چون آب زلال

دلشان آینه خورشید است و دریای مجتشان را پاس می‌گویم

## چکیده

بهبود زخم در برخی بیماریها و اختلالات مزمن به یکی از چالش‌های علم پزشکی تبدیل شده است به همین دلیل ترکیبات جدیدی که به منظور تسریع التیام زخم معرفی و تهیه می‌گردند مورد استقبال واقع می‌شوند. لذا در پژوهش تجربی حاضر و براساس مطالعات قبلی تلاش گردیده است از مخلوط روغن کره گاو و مورفین بعنوان اجزاء سازنده پوشش دهنده زخم استفاده نمائیم. که به این منظور با اجرای روش ذیل این پژوهش تجربی ادامه یافت.

پس از بیهوشی ۱۵ راس موش صحرایی نر، با استفاده از پانچ بیوپسی ۴ میلیمتری ۸ زخم دایره ای شکل در پشت هر موش به طوریکه ۴ زخم در هر طرف ستون مهره‌ها، ایجاد شد و روند التیامی مربوط به ۴ تیمار مختلف شامل روغن، مخلوط روغن و مورفین از روز سوم، مخلوط روغن و مورفین از روز اول و مورفین به ترتیب از بالا به پایین در هر زخم طرف چپ موش در نظر گرفته شد و زخم‌های طرف مقابل به عنوان کنترل با سرم فیزیولوژی تیمار شد سپس بررسی‌های ماکروسکوپی (تعیین درصد بهبودی براساس اندازه گیری قطر زخم‌ها) و مطالعات میکروسکوپی شامل بررسی تغییر ضخامت اپیتلیوم، تراکم رگهای خونی، تراکم سلول‌های آماسی و تراکم سلول‌های فیبروبلاستی در طی روزهای ۱، ۳، ۵، ۸، ۱۸ پس از ایجاد زخم انجام شد.

با تکیه بر یافته‌های کلینیکی ماکروسکوپی و هیستولوژیکی و نتایج آماری، گروه تیمار مخلوط روغن کره و مورفین از روز اول نسبت به سایر گروه‌ها روند بهبودی سریع تری را نشان داد به طوریکه در روز هشتم پس از ایجاد زخم نسج ترمیمی سازمان یافتگی بهتری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ( $p < 0.001$ ). در روز هیجدهم نیز این گروه نسبت به سایر گروه‌ها التیام بهتری را نشان داد بطوریکه در این گروه ضمایم پوستی مانند فولیکول مو ایجاد شده بود و التیام زخم سریع تر انجام شده بود. با توجه به اثرات ضد التهابی و ضد دردی مورفین و اثرات التیام بخشی روغن کره گاو به دلیل وجود ترکیبات التیام بخش مانند ویتامین A و اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع که در طب سنتی هم مورد استفاده بوده است، به نظرمی رسد مخلوط روغن کره و مورفین نسبت به سایر گروه‌ها عامل موثرتری در التیام زخم‌های پوستی است.

واژه‌های کلیدی: روغن کره گاو (ghee)، مورفین، التیام زخم، پوست، موش صحرایی

## فهرست مطالب

چکیده

۱	مقدمه
فصل اول : کلیات	
۳	۱-۱) زخم و مراحل التیام زخم
۳	۱-۱-۱) تقسیم بندی زخم
۴	۱-۱-۲) مراحل التیام زخم
۵	۱-۲-۱) انعقاد و هموستاز
۷	۱-۲-۲) مرحله التهابی
۹	۱-۲-۳) مرحله تکثیری
۱۳	۱-۲-۴) مرحله بازسازی
۱۴	۱-۳) نقش مواد طبیعی در التیام زخم و ترمیم
۱۵	۱-۲) پوشش زخم
۱۵	۱-۲-۱) تعریف پوشش زخم
۱۵	۱-۲-۲) اهداف اصلی پوشش های زخم
۱۶	۱-۲-۳) انواع پوشش های زخم
۱۹	۱-۳) پوست
۲۰	۱-۳-۱) روپوست
۲۲	۱-۳-۲) میان پوست
۲۳	۱-۳-۳) زیر پوست
۲۴	۱-۴) اپیوئیدها
۲۴	۱-۴-۱) تاریخچه
۲۵	۱-۴-۲) انواع گیرنده های اپیوئیدی
۲۷	۱-۴-۳) ساختار گیرنده های اپیوئیدی
۲۸	۱-۴-۴) گیرنده اپیوئیدی پیرامونی و آسیب بافتی
۳۰	۱-۴-۵) مشخصات فیزیکی و شیمیایی مورفین
۳۱	۱-۴-۶) اثرات اپیوئیدها بر سیستم عصبی مرکزی ( CNS )
۳۲	۱-۵) کره حیوانی (ghee)

۳۶ ..... ۱-۶) موش صحرایی به عنوان مدلی مناسب در مطالعه ترمیم زخم پوست

### فصل دوم: مواد و روش کار

- ۴۱ ..... ۲-۱) فهرست مواد و وسایل مورد استفاده
- ۴۲ ..... ۲-۲) روش و مراحل طرح
- ۴۲ ..... ۲-۳) حیوان، محل و شرایط نگهداری آن
- ۴۳ ..... ۲-۴) روش کار به منظور پانچ کردن پوست موش صحرایی
- ۴۴ ..... ۲-۵) روش تهیه تیمارها
- ۴۵ ..... ۲-۶) تیمار پوست پانچ شده موش صحرایی
- ۴۵ ..... ۲-۷) روش اندازه گیری مساحت سوراخهای پوست حیوان
- ۴۵ ..... ۲-۸) نمونه برداری مجدد از پوست موش صحرایی و تهیه مقاطع میکروسکوپی
- ۴۷ ..... ۲-۹) معیارها و روش ارزیابی مطالعه زخم
- ۴۹ ..... ۲-۱۰) روش تجزیه و تحلیل آماری

### فصل سوم: نتایج

- ۵۱ ..... الف) نتایج کمی داده‌های ماکروسکوپی
- ۵۵ ..... ب) نتایج کمی داده‌های میکروسکوپی
- ۷۲ ..... تصاویر بافتی

### فصل چهارم: بحث

- ۷۸ ..... بحث
- ۸۸ ..... پیشنهادات
- ۹۰ ..... منابع

چکیده انگلیسی

## مقدمه

تسریع ترمیم زخم در دوران ما به عنوان یک اصل در علم درمان مورد توجه می‌باشد که هدف از آن علاوه بر هماهنگی سرعت بهبودی با سرعت زندگی، بهبود زخم‌های بد درمان و مزمن در بیماری‌های نظیر دیابت، فشار خون بالا و چاقی است. افزایش کیفیت درمان زخم نیز همیشه مورد تاکید دانشمندان بوده است. در این راستا رویکرد به مواد طبیعی برای تولید داروهای جدید که موثرتر، قویتر و سازگارتر با بدن موجودات زنده باشد در دستور کار محققین علوم دارویی و طب انسانی و حیوانی قرار گرفته است که با توجه به اقبال عمومی به داروهای طبیعی انجام چنین تحقیقاتی ضروری به نظر می‌رسد.

التیام زخم یک پاسخ دینامیک به آسیب است که به ایجاد تعادل میان سلول‌ها، پروتئین‌های ساختاری، فاکتورهای رشد و پروتئازها نیاز دارد. مراحل التیام شامل ۳ مرحله است: التهاب، تکثیر و بازسازی است که وابسته به یکدیگرند. مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از مواد طبیعی و داروهای سنتی مانند روغن کره گاو (ghee) باعث تسریع روند بهبود زخم می‌شود. روغن کره گاو به دلیل داشتن اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع و ویتامین‌های A و D به عنوان یک بیواستیمولاتور در التیام زخم شناخته شده است.

زخم‌های پوستی بسیار دردناک می‌باشد، برای کاهش درد در زخم‌های پوستی، کاربرد موضعی اپیوئیدها می‌تواند یک ایده جدید باشد تا علاوه بر اثر ضد دردی از تاثیرات جانبی استفاده سیستمیک اپیوئیدها مانند کاهش تنفس، حالت تهوع، استفراغ و بیوست جلوگیری شود. علاوه بر این مطالعات نشان داده که مورفین به عنوان شناخته‌ترین اپیوئید علاوه بر اثر ضد دردی خاصیت ضد التهابی و ضد میکروبی نیز دارد و موجب افزایش بهبود زخم می‌شود. بنابراین این فرض مطرح می‌شود که مورفین به تنهایی یا همراه روغن کره گاو می‌تواند در تسریع بهبودی زخم نقش موثری داشته باشد.

لذا هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر التیام بخشی مورفین و روغن به تنهایی و مخلوط روغن کره و مورفین در زخم‌های پوستی موش صحرائی به عنوان مدل آزمایشگاهی است.



# فصل اول

## کلیات

## ۱-۱) زخم و مراحل التیام زخم

زخم به عنوان آسیب یا شکستگی ساختارهای آناتومیکی نرمال و عملکردشان، معین شده است. زخم می‌تواند یک شکستگی ساده در یکپارچگی اپیتلیال پوست یا می‌تواند عمیق تر و گسترده تر باشد و بافت زیرپوستی را نیز شامل شود و یا با آسیب ساختارهای دیگر مثل تاندون، عضله، رگ‌ها، اعصاب، ارگان پارانشیمال و حتی استخوان همراه باشد. زخم‌ها می‌تواند علت پاتولوژیکی خارجی و داخلی که از ارگان‌های دیگر برمی‌خیزد را داشته باشد (۱).

زخم می‌تواند یک علت عمدی یا تصادفی داشته باشد یا می‌تواند نتیجه مراحل یک بیماری باشد. التیام زخم نرمال یک مراحل پویا و پیچیده شامل یک سری وقایع هم ارز شامل: خونریزی، انعقاد، آغاز یک پاسخ التهابی حاد به آغاز آسیب، ترمیم، مهاجرت، تکثیر بافت پیوندی و سلول‌های پارانشیمال، سنتز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، دوباره بازسازی پارانشیم جدید و بافت همبند و رسوب کلاژن است. التیام زخم در لحظه آسیب آغاز می‌شود و شامل هردو جمعیت سلولی مهاجر و ساکن، ماتریکس خارج سلولی و فعالیت مدیاتورهای قابل حل می‌شود. زمان التیام می‌تواند متغییر و بعضی زخم‌ها تا یک سال یا بیشتر تا التیام کامل طول می‌کشد (۲-۴).

### ۱-۱-۱) تقسیم بندی زخم

زخم‌ها مطابق معیارهای متفاوت طبقه بندی می‌شوند زمان یک فاکتور مهم در اداره آسیب و التیام زخم است. بنابراین، زخم‌ها می‌تواند بطور کلینیکی به عنوان زخم حاد و مزمن مطابق قالب زمانی التیام طبقه بندی شود (۵, ۶).

### ۱-۱-۱-۱ زخم حاد

زخم هایی که خودشان را ترمیم می کنند و روند التیام بطور نرمال در یک زمان و مسیر التیامی منظم با نتیجه نهایی هر دو ترمیم عملکردی و آناتومیکی به عنوان زخم حاد تقسیم می شود (۴, ۵).

### ۱-۱-۱-۲ زخم های مزمن

زخم های مزمن آنهایی هستند که مراحل التیام به طور نرمال پیش نمی رود و نمی تواند در زمان نرمال و منظم ترمیم شود، مراحل التیام کامل نیست و توسط فاکتورهای گوناگون موجب افزایش زمان در فازهای هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی می شود این فاکتورها شامل عفونت، هیپوکسی بافتی، نکروز، تراوش و اضافه شدن سطح سیتوکینزهای التهابی است (۴, ۷, ۸).

### ۱-۱-۱-۳ زخم های پیچیده

زخم پیچیده به عنوان یک نهاد به خصوص عفونی و یک بافت آسیب دیده مشخص شده است. عفونت به عنوان یک خطر ثابت در زخم وجود دارد (۶).

مطابق با درجه آلودگی زخم ها به سه گروه تقسیم می شوند (۲, ۹)

۱- زخم های استریل<sup>۱</sup> ۲- زخم های آلوده<sup>۲</sup> ۳- زخم های چرکی<sup>۳</sup>

### ۱-۱-۲ ( ۲-۱-۱) مراحل التیام زخم

زخم ها و التیام زخم ها در همه بافت ها و ارگان های بدن اتفاق می افتد. تعدادی از این مراحل التیام در همه بافت ها معمول است، اگرچه مراحل التیام پیوسته است آن به طور قراردادی به مراحل متفاوت به منظور کمک به فهم مراحل فیزیولوژیکی که در زخم و بافت های اطراف اتفاق می افتد تقسیم می کنند، تصویر (۱-۱) (۱۰).

<sup>۱</sup> aseptic wounds

<sup>۲</sup> contaminated wounds

<sup>۳</sup> septic wounds

التیام یک مرحله پیچیده شامل واکنش‌های هم‌ارز بین سیستم‌های بیولوژیکی و ایمونولوژیکال متنوع است و آن شامل یک مسیر آبخاری دقیق که با مراحل و وقایع که با ظهور انواع سلول‌های گوناگون در بستر زخم در طی مراحل مشخص در مراحل التیام همبستگی دارد.

زمان بندی و واکنش‌هایی که بین اجزاء در مراحل التیام برای زخم‌های حاد و مزمن اتفاق می‌افتد متفاوت است اگر چه مراحل اصلی یکسان باقی مانده است (۱۱). که این ۴ مرحله را در زیر توضیح می‌دهیم.

#### ۱-۱-۲-۱) انعقاد و هموستاز ( coagulation and haemostasis phase )

بلافاصله پس از آسیب انعقاد و هموستاز در زخم اتفاق می‌افتد هدف اصلی این مکانیسم‌ها ممانعت از خونریزی است و راهی است برای حمایت سیستم رگی که آن را سالم نگه می‌دارد بنابراین عملکرد ارگان‌های حیاتی بدون آسیب باقی می‌ماند (۲، ۱۲).

هدف دوم که طولانی تر است فراهم آوردن یک ماتریکس برای سلول‌های مورد هجوم که برای فازهای بعدی التیام مورد نیاز است. یک تعادل دینامیک بین سلول‌های اندوتلیال، ترمبوسیت‌های انعقادی و فیبرینولیز که هموستاز را تنظیم می‌کند و مقدار فیبرین رسوبی که در جایگاه زخم وجود دارد (۱۲).

بعلت مکانیسم‌های رفلکس نوروئی و زیکول‌های آسیب دیده به سرعت تنگ می‌شود و سلول‌های عضله صاف عروق در لایه عضلات حلقوی منقبض می‌شوند، این انقباض می‌تواند بطور موقت کاهش یابد و خونریزی متوقف شود (۲، ۱۲).

برای تشکیل یک پلاک فیبرین غیرقابل حل مکانیسم‌های هموستاتیک مورد نیاز است. وقایع هموستاتیک با یگدیگر از طریق مسیرهای داخلی و خارجی فعال می‌شود و منجر به تجمع پلاکت‌ها

و تشکیل لخته به منظور محدود کردن اتلاف خون می‌شود، هنگامی خون در جایگاه زخم ریخته می‌شود اجزاء خونی و پلاکت‌ها در برخورد با کلاژن ظاهر شده و دیگر اجزاء ماتریکس خارج سلولی نیز می‌آیند (۱۳، ۱۴).

این برخورد آزاد شدن فاکتورهای لخته ای از پلاکت‌ها را آغاز می‌کند و تشکیل لخته متشکل از فبرین<sup>۱</sup>، فیبرونکتین<sup>۲</sup> و ترومبواسپوندین<sup>۳</sup> را می‌دهد. لخته خون و پلاکت‌ها در آن به دام می‌افتد که فقط برای هموستاز مهم نیستند بلکه یک ماتریکس موقتی برای مهاجرت سلول در فازهای متعاقب هموستاتیک و فازهای التهابی فراهم می‌آورد. سیتوپلاسم پلاکت‌ها شامل  $\alpha$  - granules با فاکتورهای رشد و سیتوکینز مثل  $EGF^6$ ،  $TGF-\beta^5$ ،  $PDGF^4$  پر می‌شود. این مولکول‌ها به عنوان پروموتور در آبخار التیام زخم توسط فعال کردن و جذب نوتروفیل‌ها و بعد ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست‌ها وارد عمل می‌شوند. پلاکت‌ها، همچنین دارای آمین‌های وازواکتیو مثل سرتونین که در اجسام متراکم ذخیره می‌شود هستند که باعث اتساع عروق و افزایش نفوذپذیری رگی، منجر به جریان سیال در بافت که منجر به ادما و افزایش فعالیت خودشان در طی فاز التهابی می‌شود. ایکوزانوئیدها و دیگر محصولات متابولیسم آراشیدونیک اسید، بعد از آسیب به غشاء سلولی آزاد می‌شود و توانایی عملکرد بیولوژیکی در پاسخ‌های التهابی فوری را دارند (۲، ۱۳، ۱۵).

<sup>۱</sup> fibrin

<sup>۲</sup> fibronectin

<sup>۳</sup> thrombospondin

<sup>۴</sup> Platelet-derived growth factor

<sup>۵</sup> Transforming growth factor-  $\beta$

<sup>۶</sup> Endothelial growth factor

### ۱-۲-۱-۱) مرحله التهابی (Inflammatory phase)

مرحله التهابی با هدف ساختن یک سد ایمنی بر علیه هجوم میکروارگانیسم‌ها است که به ۲ مرحله مجزا تقسیم شده است (۳): (۱) مرحله التهابی اولیه (۲) مرحله التهابی تاخیری

#### ۱-۲-۲-۱-۱) مرحله التهابی اولیه (Early inflammatory)

در طی مرحله تاخیری انعقاد و کمی بعد از آن آغاز می‌شود، پاسخ التهابی اولیه عملکردهای زیادی دارد آن اجزاء آبشار را فعال می‌کند و وقایع مولکولی را آغاز می‌کند که منجر به تراوش نوتروفیل‌ها به جایگاه زخم می‌شود که عملکرد اصلی آن جلوگیری از عفونت است. وظیفه حیاتی نوتروفیل‌ها فاگوسیتوز به منظور نابودی و برداشتن باکتری‌ها، ذرات خارجی و بافت‌های آسیب دیده است. فعالیت فاگوسیتیک برای مراحل بعدی حیاتی است زیرا زخم‌های حاد که یک عدم تعادل باکتریایی دارند التیام نمی‌یابند (۳, ۴).

نوتروفیل‌ها شروع به جذب جایگاه زخم در ۳۶-۲۴ ساعت پس از آسیب توسط عوامل جذب کننده شیمیایی گوناگون شامل  $TGF-\beta$  اجزاء سیستم کمپلمان مثل  $C3a$  و  $C5a$  و پپتیدهای فرمیل متیونیل<sup>۱</sup> که توسط باکتری‌ها و محصولات پلاکت‌ها تولید می‌شود (۴).

به علت تغییر در تنظیم سطح مولکول‌های چسبنده، نوتروفیل‌ها چسبنده می‌شود و از طریق ترک کردن حاشیه شروع به چسبیدن به سلول‌های اندوتلیال در مویرگ‌های اطراف زخم می‌کند. سپس نوتروفیل‌ها در امتداد سطح اندوتلیال وجود دارد توسط جریان خون به جلو هل می‌خورند این مکانیسم‌های چسبیدن و غلتیدن توسط واکنش‌های وابسته به سلکتین میانجی‌گری می‌شود و به عنوان اتصال ضعیف تقسیم بندی می‌شوند. شیموکینز توسط سلول‌های اندوتلیال ترشح می‌شوند که به سرعت یک سیستم چسبنده قوی تر را فعال می‌کند که توسط اینتگرین میانجی‌گری می‌شود.

<sup>۱</sup> formylmethionyl

سلول‌ها غلتیدن را متوقف می‌کند و به خارج رگ‌ها از طریق عمل دی‌پدز مهاجرت می‌کند، مهاجرت متعاقب اکنون وابسته به شیمو‌کیناز و دیگر عوامل شیموتاکتیک است (۱۴، ۱۶). در محیط زخم، نوتروفیل‌ها مواد خارجی فاگوسیت کننده و باکتری‌ها را توسط آنزیم‌های آزادکننده پروتئولیتیک و اکسیژن مشتق از رادیکال آزاد به خصوص نابود می‌کنند. فعالیت نوتروفیل‌ها تغییر می‌کنند در حالیکه همه باکتری‌های آلوده کننده برداشته می‌شوند، به محض کامل شدن وظیفه، نوتروفیل‌ها باید از زخم اولی برای پیشرفت به فاز بعدی التیام حذف شوند. سلول‌های اضافی توسط اخراج به سطح زخم به عنوان پوسته زخم<sup>۱</sup> خارج می‌شود و تحت آپوپتوز قرار می‌گیرند، سلول‌های باقی مانده و اجسام آپوپتیک سپس توسط ماکروفاژها فاگوسیت می‌شوند (۲، ۳، ۱۷).

#### ۱-۱-۲-۲-۲-۱ مرحله تاخیری التهاب (late inflammatory phase)

مرحله تاخیری التهاب ۴۸-۷۲ ساعت بعد از آسیب ماکروفاژها در زخم ظاهر می‌شود و مراحل فاگوسیتوز ادامه می‌یابد این سلول‌ها در اصل مونوسیت‌های خون که تحت تغییرات فنوتیپیک به هنگام ورود به بافت به ماکروفاژهای بافتی تبدیل می‌شوند. جذب شدن به جایگاه زخم توسط هزاران عامل جذب کننده شامل فاکتورهای لخته شدن، اجزاء کمپلمان، سیتوکینزها مثل  $TGF-\beta$ ،  $PDGF$ ، لوکوترین  $B_4$ ، فاکتور  $IV$  پلاکتی، الاستین و محصولات مشتق از کلاژن صورت می‌گیرد. ماکروفاژها طول عمر طولانی تر از نوتروفیل‌ها دارند و در یک  $PH$  پایین کار می‌کنند، این سلول‌ها برای مرحله تاخیری پاسخ‌های التهابی اساسی و ضروری است و به عنوان سلول‌های تنظیم کننده کلیدی عمل می‌کند و یک مخزن فراوان از فاکتورهای رشد بافتی قوی به خصوص  $TGF-\beta$ ، دیگر مدياتورها

<sup>۱</sup> slough

( $TGF-\alpha$ ) ، هپارین متصل به فاکتور رشد اپیدرمی<sup>۱</sup>،  $FGF$  ، کلاژناز ) فراهم می‌آورد که کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال را فعال می‌کند (۲، ۱۸) .

کاهش مونوسیت‌ها و ماکروفاژها از زخم باعث اختلال التیام جدی به علت تاخیر تکثیر و بلوغ فیبروبلاست‌ها بعلاوه تاخیر آنژیوژنز و در نتیجه فیبروز ناقص و ترمیم زخم بسیار ضعیف می‌شود. سلول‌های آخر که در مرحله تاخیری التهابی وارد زخم می‌شوند لنفوسیت‌ها هستند که ۷۲ ساعت پس از آسیب توسط فعالیت اینترکوکین<sup>۱</sup>، اجزاء کمپلمان و محصولات مشتق از ایمونوگلوبین  $G$  جذب می‌شوند، اینترکوکین ۱ یک نقش مهم در تنظیم کلاژناز که بعداً برای بازسازی کلاژن، محصولات و اجزاء ماتریکس خارج سلولی لازم است بازی می‌کند (۳، ۱۷) .

#### ۱-۱-۲-۳) مرحله تکثیری (Proliferative phase)

مرحله تکثیرشونده ۳ روز بعد از زخم ایجاد می‌شود و در حدود ۲ هفته بعد از آن طول می‌کشد و آن توسط مهاجرت فیبروبلاست‌ها و رسوب ماتریکس خارج سلولی سنتز شده جدید مشخص می‌شود که به عنوان یک جایگزین برای شبکه موقتی متشکل از فیبرین و فیبرونکتین عمل می‌کند. در سطح ماکروسکوپی، این مرحله التیام زخم می‌تواند به عنوان تشکیل بافت گرانوله فراوان به نظر آید. مراحل متنوع در مرحله تکثیری اتفاق می‌افتد که به طور خلاصه در زیر توضیح می‌دهیم (۱۰، ۱۷).

#### ۱-۱-۲-۳-۱) مهاجرت فیبروبلاست‌ها (Fibroblast migration)

متعاقب آسیب فیبروبلاست‌ها و میوفیبروبلاست‌ها در بافت اطراف در ۳ روز اولیه شروع به تکثیر می‌کنند آنها سپس به زخم مهاجرت می‌کنند و توسط فاکتورهای مثل  $PDGF$ ،  $TGF-\beta$  که توسط سلول‌های التهابی و پلاکت‌ها آزاد می‌شوند جذب می‌شوند، فیبروبلاست‌ها اول در زخم در ۳ روز

<sup>۱</sup> Fibroblast growth factor

<sup>۲</sup> IL-۱



پس از آسیب ظاهر می‌شوند و تجمع شان مورد نیاز است و در زخم بطور زیاد تکثیر می‌شوند و پروتئین‌های ماتریکس هیالورونان، فیبرونکتین، پروتئوگلیکان‌ها و نوع I و II پروکلاژن را تولید می‌کنند و همه محصولاتشان در محیط موضعی ته نشست می‌شود. در پایان هفته اول ماتریکس خارج سلولی فراوان تجمع می‌یابد که بیشتر مهاجرت سلولی را حمایت می‌کند و برای مراحل ترمیم مورد نیاز است (۱۸، ۱۹).

#### ۱-۱-۲-۳-۲ تولید کلاژن

کلاژن یک جز مهم در همه ی فازهای التیام زخم است که توسط فیروبلاست‌ها سنتز می‌شود آنها در یکپارچگی سهیم اند و در همه ی بافتها استحکام دارند و یک نقش کلیدی به خصوص در مراحل تکثیر شونده<sup>۱</sup> و بازسازی<sup>۲</sup> التیام نقش ایفا می‌کند. کلاژن‌ها به عنوان یک شالوده برای تشکیل ماتریکس خارج سلولی در زخم عمل می‌کند. میان پوست، پوست ساده شامل ۸۰٪ نوع I و ۲۵٪ نوع III کلاژن اند در حالیکه بافت گرانوله زخم ۴۰٪ نوع III کلاژن بیان می‌کند (۲۰، ۲۱).

#### ۱-۱-۲-۳-۱ رگزایی<sup>۳</sup> و تشکیل بافت گرانوله

طرح ریزی و تشکیل ویزیکول‌های خونی جدید در التیام زخم حیاتی است و به طور همزمان در طی همه ی مراحل ترمیمی اتفاق می‌افتد. علاوه بر جذب نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها عوامل رگزایی متعددی در طی مرحله انعقاد ترشح می‌شوند که باعث پیشرفت رگزایی می‌شود (۲۲). سلولهای آندوتلیال ساکن مسئول یک تعداد عوامل رگزایی است که شامل FGF، VEGF<sup>۴</sup>، PDGF، angiogenin، TGF- $\alpha$ ، TGF- $\beta$  است یک تعادل مناسب توسط فعالیت عوامل مهاری مثل steroids، angiostatin نگه داشته شده است. عوامل مهاری و تحریکی و سلولهای آندوتلیال

<sup>۱</sup> Proliferative phase

<sup>۲</sup> Remodeling phase

<sup>۳</sup> Angiogenesis

<sup>۴</sup> Vascular endothelial growth factor

تکثیر شونده به طور مستقیم و غیر مستقیم توسط فعالیت میتوز، افزایش حرکت و تحریک آزاد کردن فاکتورهای آندوتلیال توسط سلولهای میزبان موجب می شود (۲۳).

تحت حالت هیپوکسیک مولکولها از بافتهای اطراف ترشح می شود که تکثیر و رشد سلولهای آندوتلیال را افزایش می دهد. در پاسخ یک پورسه ی ۴ مرحله اتفاق می افتد که شامل:

۱- تولید پروتئاز توسط سلولهای آندوتلیال توسط کاهش بازال لامینا در وزیکول مادری به منظور خزیدن از طریق ماتریکس خارج سلولی ۲- شیموتاکسیس ۳- تکثیر ۴- بازسازی و تمایز FGF و VEGF نقش تنظیم کننده ی مرکزی در همه مراحل بازی می کند. در ابتدا یک ذخیره ی رگی در مرکز زخم وجود ندارد بنابراین بافت زنده ماندنی در حاشیه ی زخم محدود می شود توسط وزیکول های غیر آسیب دیده به طریق انتشار توسط *interstitium* غیر آسیب دیده ترشح می شود. جوانه های مویرگها از لبه های اطراف به لخته زخم هجوم می آورند و در طی چند روز یک شبکه ی میکروواسکولار تشکیل شده از تعدادی مویرگ جدید شکل می گیرد. شیموتاکسیس توانایی سلولها برای حرکت در امتداد گرادیان شیمیایی را فراهم می آورد این مکانیسم های بیوشیمیایی سلولها را برای پاسخ مناسب به تحریک محیط آماده می سازد که تکثیر، تمایز و مهاجرت را تعیین می کند (۲۴, ۲۵).

عوامل شیموتاکسیس در سطح گیرنده های سلول عمل می کند که فرآیند آنژیوژنز در طی التیام زخم درگیر است را هدایت می کند. عوامل شرکت کننده به عنوان مدیاتورها برای نئوواسکولاریزاسیون و ترمیم رگها در جایگاه آسیب عمل می کند آنها همچنین مدیاتور رشد سلول و تمایز هستند که شامل فاکتور رشد سلول آندوتلیال<sup>۱</sup>،  $TGF-\alpha$  و  $angiopoietin-1$ ، فیرین و فاکتورهای رشد لپیدی است (۴, ۱۷). مهاجرت نتیجه ی فعالیت شیموتاکسیس و برای رگزایی ضروری است هنگامی که یک مرحله پیچیده تغییرات هماهنگ در سازماندهی اسکلتی هدایت سیگنالی و چسبندگی

<sup>۱</sup> VEGF

سلول، مهاجرت وابسته غنی از اکتین زیر غشای پلاسمایی است و توسط فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی در سیستم رگی تنظیم می شود (۲۶).

#### ۱-۱-۲-۳-۴) اپیتلیزاسیون

مهاجرت سلول‌های اپیتلیال از لبه‌های زخم چند ساعت پس از ایجاد زخم آغاز می‌شود. یک لایه منفرد سلول در ابتدا بالای زخم تشکیل می‌شود که توسط افزایش مشخص در سلول‌های اپیتلیال با فعالیت میوتیک اطراف لبه‌های زخم همراه است. سلول‌های مهاجرت‌درامداد آنها به ماتریکس موقتی زیر می‌چسبند. هنگامی که به سلول‌های اپیتلیال پیشرفته برخورد می‌کنند مهاجرت متوقف می‌شود و غشاء پایه شروع به تشکیل می‌کنند (۱۷، ۲۰).

#### ۱-۱-۲-۳-۵) جمع شدگی زخم (Contraction)

جمع شدگی زخم تقریباً همزمان با تولید کلاژن شروع می‌شود. جمع شدگی به عنوان "حرکت مرکز گرای لبه‌های زخم که بسته شدن زخم را تسهیل می‌کند" تعریف می‌شود و ۵ تا ۱۵ روز بعد از جراحی به حداکثر می‌رسد. جمع شدگی باعث کاهش اندازه زخم می‌شود. مثلاً یک بریدگی (شکاف) ۲cm بعد از جمع شدگی ممکن است ۱/۸ cm اندازه گیری شود. میزان ماکزیمم جمع شدگی ۰/۷۵ mm/d است و به درجه سستی بافت و شکل زخم بستگی دارد.

بافت‌های سست بیشتر از بافت‌هایی با سستی کم، جمع می‌شوند و زخم‌های چهارگوش بیشتر از زخم‌های دایره‌ای شکل تمایل به جمع شدگی دارند. جمع شدگی زخم وابسته به میوفیبروبلاست‌های پیرامون زخم، اتصالشان به ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و تکثیر آنها می‌باشد (۲۷).

### ۱-۲-۱) مرحله بازسازی Remodelling phase

مرحله نهایی التیام زخم، مرحله بازسازی برای تکوین اپیتلیوم جدید و تشکیل بافت اسکار است. بازسازی یک زخم حاد بطور قوی توسط مکانیسم‌های تنظیمی با هدف حفظ یک تعادل ظریف بین تخریب و سنتز، منجر به التیام نرمال می‌شود.

همراه با بلوغ ماتریکس داخل سلولی، باندهای کلاژن قطرشان افزایش می‌یابد و اسید هیالورونیک و فیبرونکتین تنزل می‌یابد. مقاومت کششی زخم بطور پیشرونده موازی با اجتماع کلاژن افزایش می‌یابد. فیبرهای کلاژن ممکن است ۸۰٪ کشش اصلی در مقایسه با بافت غیرزخمی دوباره بدست آورد. کشش نهایی بدست آمده وابسته به چگونگی ترمیم و مدت زمانش است اما کشش اصلی بافت نمی‌تواند هرگز بدست آید (۱۷, ۱۸, ۲۰). تولید و شکستن کلاژن به خوبی بازسازی ماتریکس خارج سلولی بطور مدام اتفاق می‌افتد و هر دو به یک حالت ثابت و پایدار در حدود ۳ هفته بعد از زخم می‌رسند. آنزیم متالوپروتئیناز توسط نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و در زخم تولید می‌شود که مسئول تخریب کلاژن است و فعالیت شان توسط فاکتورهای مهارتی تنظیم می‌شود (۲۱, ۲۸).

اگرچه در آغاز باندهای کلاژن بهم ریخته است، ماتریکس کلاژن جدید بیش ترجهت دار می‌شوند و زمان بیش تری تداخل دارند و سازماندهی متعاقبشان در طی فاز بازسازی انجام می‌شود که توسط انقباض زخم که قبلا در فاز تکثیر شونده آغاز شده است بدست می‌آید بافت پیوندی زیرین جمع می‌شود و لبه‌های زخم به علت واکنش فیروبلاست‌ها با ماتریکس خارج سلولی بسته می‌شود (۱۵).

این مراحل توسط فاکتورهای مثل  $FGF$ ,  $PDGF$ ,  $TGF-\beta$  تنظیم می‌شود. هنگام التیام زخم دانسیته فیروبلاست‌ها و ماکروفاژها توسط آپوپتوزیز بیش تر کاهش می‌یابد. با گذشت زمان، رشد مویرگ‌ها متوقف می‌شود جریان خون به سطح کاهش می‌یابد و فعالیت متابولیک در جایگاه زخم