Evaluation of the Effect of Acute and Chronic Restraint Stress on Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Levels in Wound Healing Process in Rat

Pari Tamri[1], Fatemeh Zeraati[2], Rasool Haddadi[3], Maryam Karamali[4]

1. Assistant Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran Tel: 08138381673, Email: ptamri@gmail.com. ORCID ID: 0000-0001-9553-415X
2. Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran ORCID ID: 0000-0002-0970-697X
3. Assistant Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, ran ORCID ID: 0000-0001-9642-4665
4. Pharm D Student, Department of Pharmacology & Toxicology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran ORCID: 0000-0002-7662-1300

ABSTRACT

Background and Aim: Considering that stress slows down wound healing, the main purpose of this study was to investigate the effects of acute and chronic restraint stress on inducible Nitric Oxide synthase (iNOS) and Nitric Oxide (NO) concentrations in wound tissue in rat.

Materials and Methods: 48 male and female rats in 6 groups (n=8) including male control, male animals exposed to acute stress, male animals exposed to chronic stress, female control, female animals exposed to acute stress and female animals exposed to chronic stress were used in this study. Tissue samples were collected on the 3rd and 7th days after wound creation. iNOS concentration were measured by ELISA method and the concentration of NO was measured by determining nitrite concentrations in the samples using Griess reagent**.**

Results: Acute ($P< 0.001$) and chronic ($P< 0.05$) stress caused a significant increase in iNOS concentrations on the 3rd and 7th days post wounding in male animals comparing to the control group. The concentration of iNOS was significantly increased in female animals only in the group exposed to the acute stress and on the 3rd day compared to the control group ($P< 0.05$). Acute and chronic stress caused a significant ($P < 0.001$) increase in NO concentrations in male animals when compared with the control group. NO concentrations was increased significantly in female animals exposed to acute stress comparing to the control group on 3rd day post wounding ($P< 0.001$).

Conclusion: Stress induced elevations in iNOS and NO concentrations could be one of the mechanisms underlying delayed wound healing by stress.

Keywords: Nitric Oxide; Restraint stress; Wound healing; Inducible Nitric Oxide Synthase
Received: July 28, 2021 **Accepted:** Oct 20, 2021

How to cite the article: Pari Tamri, Fatemeh Zeraati, Rasool Haddadi, Maryam Karamali , Evaluation of the Effect of Acute and Chronic Restraint Stress on Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Levels in Wound Healing Process in Rat. SJKU 2023;28(3):24-36.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هشت / مرداد و شهریور ۱۴۰۲/۳۶-۲۴

بررسی اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر سطح نیتریک اکسید سنتاز قابل القا و نیتریک اکسید در فرآیند ترمیم زخم در موش صحرایی

پری تمری[۱]، فاطمه زراعتی[۲]، رسول حدادی[۳]، مریم کرمعلی[۴]

۱. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (نویسنده مسئول). تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۱۶۷۳ ایمیل:ptamri@gmail.com کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۵۵۳-۴۱۵X

۲. استاد، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.: کد ارکید:۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۹۷۰-۶۹۷X

۳. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۶۴۲-۴۶۶۵

۴. دانشجوی داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۷۶۶۲-۱۳۰۰

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اینکه استرس باعث کاهش سرعت ترمیم زخم می‌شود، هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اسید سنتاز قابل القا (iNOS) و نیتریک اکسید (NO) در بافت زخم در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر و ماده در قالب ۶ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل نر، حیوانات نر تحت استرس حاد، حیوانات نر تحت استرس مزمن، کنترل ماده، حیوانات ماده تحت استرس حاد و حیوانات ماده تحت استرس مزمن در این مطالعه استفاده شد. نمونه‌های بافتی در روز سوم و هفتم بعد از ایجاد زخم، جمع‌آوری شد. غلظت iNOS به روش الایزا و غلظت NO با استفاده از اندازه‌گیری غلظت نتیریت به وسیله معرف گریس اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: استرس بی‌حرکتی حاد ($P < ۰/۰۰۱$) و مزمن ($P< ۰/۰۵$) باعث افزایش معنادار غلظت iNOS در روزهای سوم و هفتم بعد از ایجاد زخم در حیوانات نر در مقایسه با گروه کنترل شد. غلظت iNOS در حیوانات ماده فقط در گروه تحت استرس حاد و در روز سوم نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ($P < ۰/۰۵$). استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن باعث افزایش معنادار ($P< ۰/۰۰۱$) غلظتNO در حیوانات نر در مقایسه با گروه کنترل شد. غلظت NO در حیوانات ماده تحت استرس حاد در روز سوم بعد از ایجاد زخم به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: افزایش میزان iNOS وNO در اثر استرس می‌تواند یکی از مکانیسم‌های اصلی تأخیر در ترمیم زخم به وسیله استرس باشد.

کلمات کلیدی: نیتریک اکسید، استرس بی‌حرکتی، ترمیم زخم، نیتریک اکسید سنتاز قابل القا

وصول مقاله :۱۴۰۰/۵/۶ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۰/۷/۱۸ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۲۸

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

مقدمه

استرس سال‌هاست که کانون توجه علم، پژوهش و پزشکی است. استرس به عنوان یک مفهوم، اثر عوامل روانی – اجتماعی و محیطی را بر سلامت جسمی یا روحی توصیف می‌کند (۱)؛ بنابراین، استرس یک چالش یا محرک است که نیازمند تغییرات روانشناختی، رفتاری و فیزیولوژیکی است که بتواند به طور موفقیت آمیزی باعث ایجاد یک حالت بیش فعالی برای واکنش‌های ضروری در مقابل عامل استرس‌زا شود (۲).

بیش از دو دهه است که به روشنی مشخص شده است که استرس می تواند سرعت ترمیم زخم را به طور قابل توجهی کاهش دهد (۳-۵). عوامل استرس زا با منشأ، قدرت و دوره متفاوت می‌توانند ترمیم زخم را در انسان و حیوانات مختل کنند (۳).

ترمیم زخم فرآیندی منظم است که در زمان آسیب بافتی با یک الگوی قابل پیش بینی آغاز می‌شود. در افراد سالم، ترمیم زخم در سه فاز متوالی دارای همپوشانی به پیش می‌رود که شامل ۱- فاز التهاب است که در این فاز هموستاز و لخته شدن خون انجام شده و سلول‌های التهابی به محل زخم مهاجرت می‌کنند. ۲- فاز تکثیر شامل مهاجرت و تکثیر کراتینوسیت ها، فیبروبلاست ها و سلول‌های اندوتلیال است که باعث اپیتلیالیزاسیون مجدد، تشکیل عروق جدید و بافت گرنوله می‌شود و ۳- فاز طولانی بازسازی که شامل بلوغ ماتریکس خارج سلولی با هدف بازگرداندن ساختار و اعمال بافتی به حالت طبیعی است (۳). اگرچه ترمیم زخم یک روند ثابت و تنظیم شده است؛ اما استرس می تواند از طریق چندین مسیر ایمنی، عصبی و غدد درون ریز بر پیشرفت آن تأثیر بگذارد (۶).

التهاب یک بخش طبیعی از فرآیند ترمیم زخم است؛ ولی اگر التهاب طولانی شود، فرآیند ترمیم نیز طولانی خواهد شد. نیتریک اکسید (Nitric oxide, NO) هم در التهاب و هم در ترمیم زخم دخالت دارد. نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد است که دائماً به وسیله بافت‌های مختلف مانند اندوتلیوم در بدن تولید و ریلیز می‌شود و بدین ترتیب احتمالاً در فرآیندها و مسیرهای پاتوفیزیولوژیک مختلفی حضور دارد (۷). با این حال، نقش مشخص نیتریک اکسید در بیماری‌های مرتبط با استرس یک زمینه جالب برای پژوهش است؛ زیرا نیتریک اکسید در فیزیولوژی استرس و ظاهراً در فرآیندهای پاتولوژیک مرتبط با استرس نیز نقش دارد (۷ ,۸).

نیتریک اکسید به وسیله دو مکانیسم مختلف تولید می‌شود. تولید فوری نیتریک اکسید به وسیله نیتریک اکسید سنتاز ساختاری (Constitutive nitric oxide synthase, cNOS) انجام می‌شود که یک آنزیم وابسته به کلسیم است که به طور دائم در سلول‌های ایمنی، عصبی و اندوتلیال بیان شده و نیتریک اکسید را در مقادیر کم تولید می‌کند (۸). ریلیز نیتریک اکسید مشتق از نیتریک اکسید سنتاز ساختاری بخشی از مکانیسم‌های پاسخ حاد است که در بسیاری از شرایط بیولوژیک اتفاق می‌افتد. در مقابل نیتریک اکسید سنتاز قابل القا (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) یک آنزیم مستقل از کلسیم است که در بافت‌های مختلفی وجود دارد، با این حال بر اساس نیاز، در شرایط خاص و تحت تأثیر مولکول‌های پیام‌رسان مختلف مانند سیتوکین های پیش التهابی بیان می‌شود. به دنبال القا، نیتریک اکسید قابل القا بعد از یک دوره نهفتگی، تولید نیتریک اکسید در غلظت‌های بالاتر می‌کند که برای چند روز ادامه دارد (۹). نیتریک اکسید مانند یک شمشیر دولبه عمل می‌کند مقادیر بسیار کم نیتریک اسید که به وسیله نتیریک اکسید سنتاز ساختاری تولید می‌شود، واسطه اعمال فیزیولوژیک است درحالی‌که بیان نیتریک اکسید قابل القا باعث تولید مقادیر بیشتر نیتریک اکسید می‌شود که با اثرات سیتوتوکسیک و مخرب نیتریک اکسید در اختلالات مختلف مرتبط است (۱۰).

با توجه به اینکه استرس باعث اختلال در فرآیند ترمیم زخم می‌شود و سرعت ترمیم زخم را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد، مسیر نیتریک اکسید ممکن است در این اختلال

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

نقش داشته باشد؛ زیرا نیتریک اکسید سنتاز قابل القا با پاتوژنز التهاب مزمن مرتبط است (۱۱)؛ لذا هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید سنتاز قابل القا و نیتریک اکسید در طول ترمیم زخم در موش صحرایی بود.

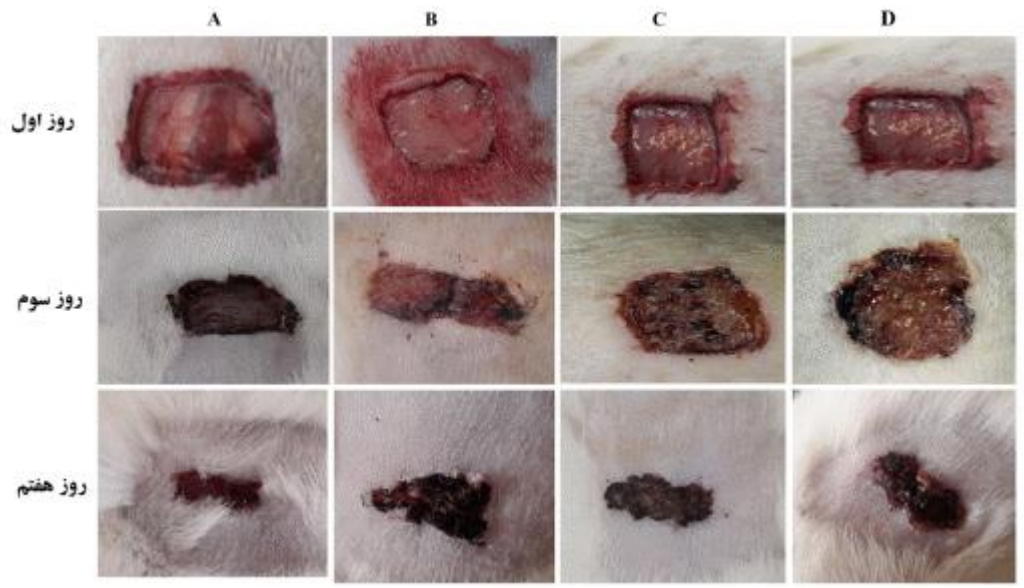
مواد و روش‌ها

گروه‌های حیوانی:

در این مطالعه از ۴۸ سر موش صحرایی نر و ماده‌ی بالغ در محدوده‌ی وزنی ۲۵±۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در قفس‌های مخصوص و در شرایط یکسان نگهداری شدند و آب و غذای استاندارد در اختیار آن‌ها قرار گرفت. درجه حرارت اتاق حیوانات ۲ ±۲۲ درجه سلسیوس و مدت روشنایی _ تاریکی ۱۲: ۱۲ ساعت بود. کلیه ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق دستورالعمل ابلاغ شده توسط دانشگاه علوم پزشکی همدان (کد کمیته اخلاق: IR.UMSHA.REC.1398.596) در این پژوهش لحاظ گردید.

ایجاد زخم :

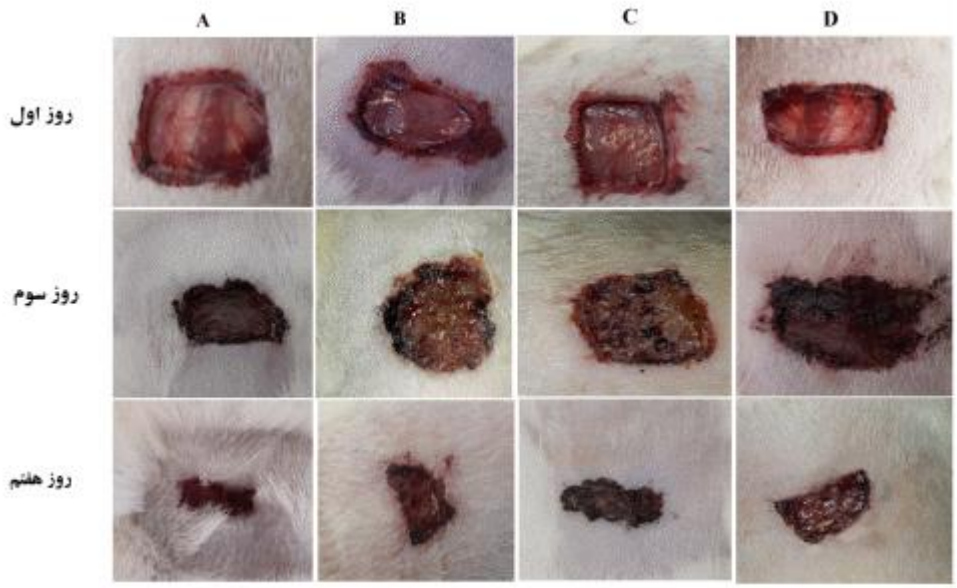
بعد از بیهوش کردن حیوان توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم)، موهای ناحیه پشت حیوان کاملاً تراشیده و تمیز شد و محل مورد نظر جهت ایجاد زخم با اتانول۷۰٪ ضد عفونی گردید. پس از قرار دادن حیوان در وضعیت مناسب با استفاده از یک شابلون و یک ماژیک، مربعی با ابعاد ۱۰ میلی متر×۱۰ میلی متر بر روی ناحیه‌ی تراشیده شده، ترسیم گردید. در مرحله‌ی بعد با استفاده از یک تیغ جراحی یک زخم با ضخامت کامل که شامل برداشتن لایه‌های اپیدرم و درم بود در پوست حیوان ایجاد شد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- تصویر زخم‌های ایجاد شده در گروه‌های مختلف حیوانی در روز اول، سوم و هفتم. A. گروه کنترل ماده B. حیوانات ماده تحت استرس حاد C. گروه کنترل نر D. حیوانات نر تحت استرس حاد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]



شکل۲- تصویر زخم‌های ایجاد شده در گروه‌های مختلف حیوانی در روز اول، سوم و هفتم. A. گروه کنترل ماده، B. حیوانات ماده تحت استرس مزمن، C. گروه کنترل نر، D. حیوانات نر تحت استرس مزمن

مدل استر س بی‌حرکتی حاد و مزمن:

جهت ایجاد استرس بی‌حرکتی از دستگاه محدودکننده (Restrainer) استفاده شد. این دستگاه از جنس پلی وینیل کلراید (Polyvinyl chloride, PVC) شفاف به ابعاد ۲۰×۵ سانتی متر با درب لولایی و قابلیت تنظیم طولی برای اندازه و وزن های مختلف موش و همچنین دارای روزنه-هایی برای ورود هوا و یک محفظه برای قرارگیری دم حیوان است. گروه های تحت استرس حاد روز اول و روز هفتم بعد از ایجاد زخم به مدت ۶ ساعت در restrainer قرار گرفتند. گروه‌های تحت استرس مزمن روزانه ۳ ساعت به مدت ۱۴ روز بی حرکتی را تجربه کردند، در روز چهاردهم، زخم ایجاد شد و پس از آن نیز حیوانات روزانه ۳ ساعت و به مدت ۷ روز بی حرکتی را تجربه کردند (۱۲).

روش نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌های بافتی:

در روز اول و هفتم بعد از ایجاد زخم، در شرایط آسپتیک و با استفاده از تیغ بیستوری از بافت زخم نمونه برداری شد. نمونه‌ها در بافر لیز کننده (حاوی ۱۰ میلی مول بافر فسفات سالین(Phosphate buffer saline، PBS) ، ۰/۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate, SDS)، ۱درصد Nonidet P-40 و۵ میلی‌مول EDTA و مهار کننده پروتئاز) جهت استخراج پروتئین هموژنیزه شدند. هموژن بافتی در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ (Eppendorf, Germany) شد (۱۳). سوپرناتانت جهت اندازه‌گیری میزان نیتریک اکسید سنتاز مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری میزان نیتریک اکسید، نمونه ها در بافر تریس هموژنیزه شده و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت برای سنجش غلظت نیتریک اکسید مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). میزان پروتیئن تام بافتی با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد (۱۵).

اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا:

غلظت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز قابل القا با استفاده از کیت الایزا (NOVUSBIOLOGICALS, USA) و طبق دستورالعمل کارخانه سازنده اندازه‌گیری شد. به صورت خلاصه، نمونه ها و استانداردها به چاهک‌های

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

میکروپلیت الایزا که به وسیله یک آنتی بادی اختصاصی برای نیتریک اکسید قابل القا موش صحرایی پوشش داده شده بودند، اضافه شده و با آنتی بادی اختصاصی ترکیب شدند. سپس یک آنتی بادی آشکارگر اختصاصی برایiNOS موش صحرایی با برچسب بیوتین و کونژوگه آویدین- پراکسیداز به چاهک‌ها اضافه شده و انکوبه شدند. پس از شستشوی کامل پلیت، سوبسترا به چاهک‌ها اضافه شد. فقط چاهک‌هایی که حاوی آنتی‌بادی iNOS موش صحرایی و آنتی‌بادی آشکارگر با برچسب بیوتین و کونژوگه آویدین- پراکسیداز بودند به رنگ آبی ظاهر شدند. با افزودن محلول متوقف کننده به چاهک‌ها واکنش آنزیم- سوبسترا خاتمه یافته و رنگ زرد ظاهر شد. میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر(Biotek microplate reader, USA) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با مقایسه میزان جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد، غلظت iNOS در نمونه‌ها محاسبه شد.

اندازه گیری غلظت نیتریک اکسید:

غلظت نیتریت، به عنوان شاخص تولید نیتریک اکسید در نمونه‌های بافتی با استفاده از معرف گریس (Griess reagent) اندازه‌گیری شد (۱۶). حجم‌های مساوی از معرف گریس و نمونه‌های بافتی هموژنیزه با هم مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. میزان جذب نوری نمونه‌ها به وسیله دستگاه پلیت ریدر(Biotek microplate reader, USA) در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت غلظت نیتریت با استفاده از منحنی کالیبراسیون نیتریت سدیم اندازه گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها:

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 8تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به صورت Mean± SEM نشان داده شدند. جهت بررسی تفاوت آماری بین مقادیر آزمایشی و کنترل، از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه (ANOVA) استفاده شد و جهت شناسایی تفاوت بین گروه‌ها از تست Tukey استفاده شد. مقادیر $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

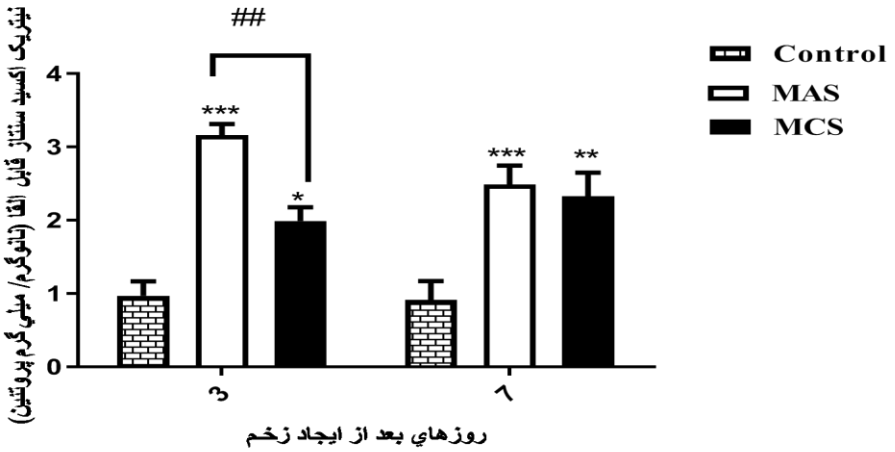
یافته‌ها

اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در حیوانات نر:

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود استرس بی‌حرکتی حاد ($P<۰/۰۰۱$) و مزمن ($P<۰/۰۵$) غلظت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز قابل القا را در روزهای سوم بعد از ایجاد زخم، به طور معناداری نسبت به گروه کنترل (بدون استرس) افزایش داده‌اند. در روز هفتم نیز غلظت iNOS در حیوانات تحت استرس حاد ($P<۰/۰۰۱$) و مزمن ($P<۰/۰۱$) به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود. علاوه بر این نتایج این مطالعه نشان می‌دهد در روز سوم بعد از ایجاد زخم، غلظت iNOS در حیواناتی که تحت استرس حاد بوده‌اند به طور معناداری ($P<۰/۰۱$) بیشتر از حیوانات تحت استرس مزمن بوده است؛ اما در روز هفتم تفاوت معناداری بین غلظت این آنزیم در گروه‌های تحت استرس حاد و مزمن وجود نداشت.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

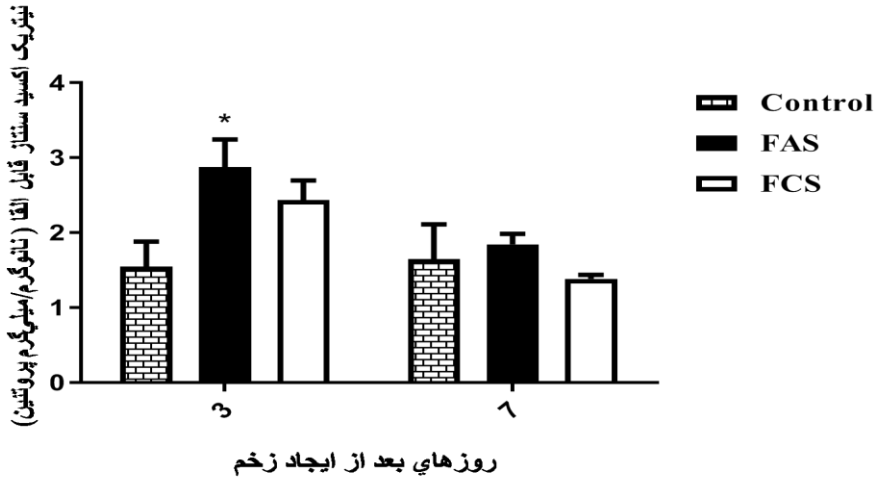
[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]



نمودار ۱. اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در بافت زخم در موش صحرایی نر. داده‌ها به‌صورت Mean ± SEM نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. * (P<۰/۰۵)، ** (P<۰/۰۱) و *** (P<۰/۰۰۱) نشان دهنده تفاوت معنادار با گروه کنترل است. ## (P<۰/۰۱) نشان دهنده تفاوت معنادار بین دو گروه تحت استرس حاد و مزمن است. MCS = حیوانات نر تحت استرس مزمن، MAS= حیوانات نر تحت استرس حاد

اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در حیوانات ماده:

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود غلظت iNOS در نمونه‌های بافتی به دست آمده از حیوانات ماده‌ای که تحت استرس حاد بی‌حرکتی بوده‌اند در روز سوم بعد از ایجاد زخم به طور معناداری (P<۰/۰۵) بیشتر از گروه کنترل است؛ ولی در حیوانات تحت استرس مزمن غلظت iNOS تفاوت معناداری با گروه کنترل ندارد. در روز هفتم بعد از ایجاد زخم تفاوت معناداری در غلظت این آنزیم در گروه‌های تحت استرس حاد و مزمن و گروه کنترل وجود ندارد.



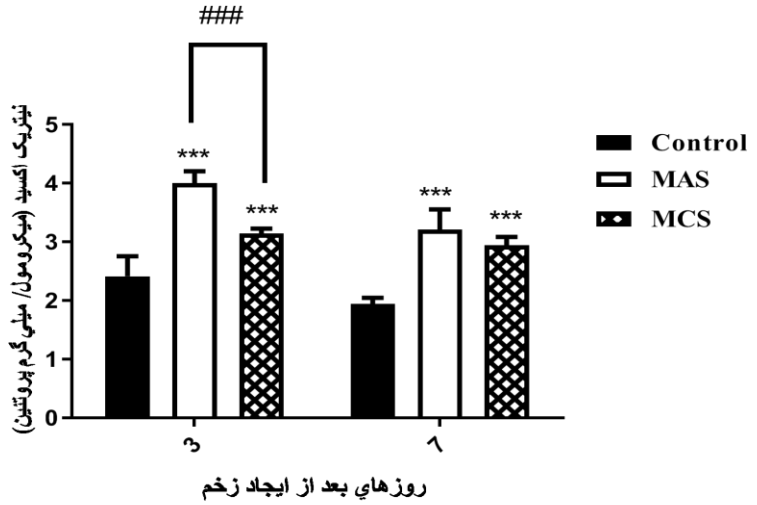
نمودار ۲. اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در بافت زخم در موش صحرایی ماده. داده‌ها به‌صورت Mean ± SEM نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. *(P<۰/۰۵) نشان دهنده تفاوت معنادار با گروه کنترل است. FCS- حیوانات ماده تحت استرس مزمن، FAS- حیوانات ماده تحت استرس حاد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم حیوانات نر:

اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکسید در نمونه های به دست آمده از گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان نیتریک اکسید در بافت زخم حیوانات نری که تحت استرس حاد و مزمن بودند در روز سوم بعد از ایجاد زخم نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری ($P <$ ۰/۰۰۱) پیدا کرده است. در روز هفتم بعد از ایجاد زخم نیز میزان نیتریک اکسید در نمونه‌های به دست آمده از گروه‌های تحت استرس حاد و مزمن به طور معناداری (P<۰/۰۰۱) بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین میزان نیتریک اکسید در نمونه‌های به دست آمده از حیواناتی که تحت استرس حاد بودند در روز سوم بعد از ایجاد زخم به طور معناداری (P<۰/۰۰۱) بیشتر از حیوانات تحت استرس مزمن بود؛ ولی این تفاوت در روز هفتم معنادار نبود (نمودار ۳).



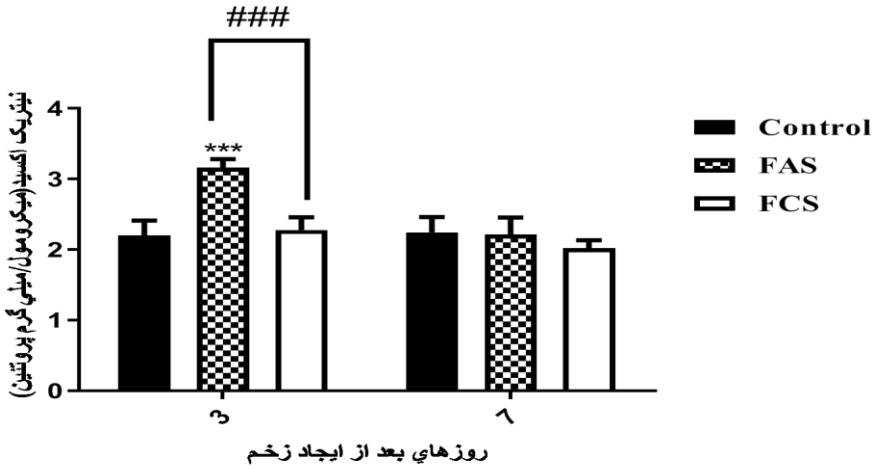
نمودار ۳– اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. *** (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنادار با گروه کنترل و ### (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنادار بین گروه تحت استرس حاد و مزمن را نشان می‌دهد. MCS- حیوانات نر تحت استرس مزمن، MAS- حیوانات نر تحت استرس حاد

اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم حیوانات ماده:

در روز سوم بعد از ایجاد زخم میزان نیتریک اکسید در نمونه‌های به دست آمده از حیوانات ماده تحت استرس حاد به طور معناداری (P<۰/۰۰۱) بیشتر از گروه کنترل و حیوانات تحت استرس مزمن بود. در این روز بین غلظت نیتریک اکسید در حیوانات تحت استرس مزمن و گروه کنترل تفاوت معناداری وجود نداشت. در روز هفتم بعد از ایجاد زخم تفاوت معناداری در میزان نیتریک اکسید در گروه‌های تحت استرس و گروه کنترل وجود نداشت (نمودار ۴).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]



نمودار ۴. اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم در موش صحرایی ماده. داده‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شده اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. *** (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهد و ### (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنادار بین گروه تحت استرس حاد با گروه تحت استرس مزمن را نشان می‌دهد. FCS- حیوانات ماده تحت استرس مزمن، FAS - حیوانات ماده تحت استرس حاد

بحث

در چند دهه گذشته مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که استرس باعث کند شدن سرعت ترمیم زخم در انسان و حیوانات می‌شود. مکانیسم‌های مختلفی برای اختلال ناشی از استرس در ترمیم زخم، پیشنهاد شده است. استرس از مسیرهای بیولوژیک مختلفی از جمله مسیرهای گلوکوکورتیکوئید و سیتوکین های پیش التهابی ترمیم زخم را تحت تأثیر قرار می دهد (۳).

مسیر نیتریک اکسید سنتاز از جمله مسیرهای احتمالی است که استرس از طریق آن فرآیند ترمیم را تحت تأثیر قرار می-دهد. در این مطالعه اثر استرس بر میزان نیتریک اکسید سنتاز قابل القا و نیتریک اکسید در فرآیند ترمیم زخم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مطالعه نشان داد که استرس حاد و مزمن باعث افزایش میزان iNOS و NO در بافت زخم حیوانات نر و استرس حاد باعث افزایش غلظت این دو ترکیب در بافت زخم حیوانات ماده می شود.

برای ایجاد استرس از مدل استرس بی‌حرکتی استفاده شد که یکی از متداول‌ترین روش‌های به کار رفته برای القا تغییرات رفتاری، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرتبط با استرس در حیوانات آزمایشگاهی است (۱۷).

ترمیم زخم مستلزم تعاملات پیچیده بین فاکتورهای رشد و سیتوکین هاست (۱۸). التهاب یک بخش طبیعی و ضروری از فرآیند ترمیم زخم است؛ اما التهاب طولانی مدت و بیش از اندازه باعث طولانی شدن فرآیند ترمیم زخم می‌شود (۱۹). فعالیت نیتریک اکسید عمدتاً مرتبط با اثرات ضدالتهابی و سرکوبگر سیستم ایمنی است در عین حال نیتریک اکسید ممکن است بخشی از مسیر پیش التهابی باشد. افزایش بیان iNOS و تولید بیش از اندازه NO در پاتوژنز التهاب مزمن نقش دارد (۲۰).Saidian و همکاران در سال ۲۰۱۹ در یک مطالعه نشان دادندکه iNOS در درم موش‌های دیابتی بیشتر از موش‌های غیر دیابتی است و اینکه iNOS باعث افزایش التهاب و طولانی شدن فرآیند ترمیم زخم می شود (۲۱). نتایج این مطالعه نشان می دهد که افزایش iNOS با تأخیر در ترمیم زخم مرتبط است.

Gajendrareddy و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که استرس بی‌حرکتی باعث تأخیر در ترمیم زخم در مدل حیوانی می‌شود همچنین میزان بیان ژن iNOS در روز اول

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

و پنجم بعد از ایجاد زخم در حیوانات تحت استرس افزایش یافت که در راستای نتایج مطالعه حاضر است. آن‌ها از این مطالعه نتیجه گرفتند مختل شدن ترمیم زخم به وسیله استرس، نتیجه کاهش میزان اکسیژن بافتی و تغییر ژن القا کننده هیپوکسی است (۲۲).

نتایج مطالعه‌ای که به وسیله Karamercan و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد نشان داد که مهار بیوسنتز NO باعث بهبود استحکام کششی زخم می‌شود که نشان دهنده نقش احتمالی مهارکننده‌های iNOS در بهبود زخم در صورت وجود اندوتوکسمی است (۱۸). نتایج این مطالعه نیز مؤید این مطلب است که iNOS می‌تواند باعث تأخیر در ترمیم زخم شود.

نتیجه دیگر این مطالعه پاسخ متفاوت حیوانات نر و ماده به استرس است. نتایج این مطالعه نشان دادند که استرس حاد و مزمن هردو باعث افزایش معنادار غلظت iNOS و NO در حیوانات نر در روز سوم و هفتم بعد از ایجاد زخم می‌شوند در حالی که در حیوانات ماده فقط استرس حاد باعث افزایش معنادار غلظت این دو ترکیب نسبت به گروه کنترل در روز سوم شد. مطالعات مختلفی تأثیر جنسیت در واکنش به استرس را تائید کرده‌اند؛ اما نتایج تحقیقات مختلف در این زمینه متفاوت بوده است (۱۵). درحالکیه نتایج بعضی از مطالعات نشان می‌دهد که حیوانات ماده و زنان در برابر استرس مزمن حساس تر از حیوانات نر و مردان هستند (۲۳, ۲۴)، مطالعات دیگری برعکس نشان داده‌اند که پاسخ جنس مؤنث در برابر استرس حاد برابر و یا حتی شدیدتر از جنس نر بوده و حیوانات ماده مقاومت بیشتری از جنس مذکر در برابر استرس مزمن نشان می‌دهند (۲۵, ۲۶). در واقع مکانیسم‌هایی که جنس مؤنث برای پاسخ دهی به استرس استفاده می‌کند دارای تفاوت اساسی با جنس نر است (۲۷).

هورمون‌های گلوکوکورتیکوئید نقش اساسی در سازگاری یک ارگانیسم با رویدادهای استرس زا در طول زندگی آن دارند. یکی از دلایل متفاوت بودن پاسخ دو جنس نر و ماده تفاوت در گیرنده های کورتیکواستروئیدی (مینرال کورتیکوئیدی و گلوکوکورتیکوئیدی) است. گیرنده های مینرال کورتیکوئیدی در جنس نر دارای تمایل اتصال سه برابری جنس ماده هستند؛ ولی تفاوتی بین تمایل اتصال گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی بین دو جنس وجود ندارد. علاوه بر این نتایج مطالعات نشان دهنده بیان کمتر گیرنده های مینرال کورتیکوئیدی در جنس ماده است. در شرایط استرس مزمن الگوی گیرنده های مینرال کورتیکوئیدی و گلوکوکورتیکوئیدی تغییر می‌کند. اتصال به گیرنده‌های گلوکورتیکوئیدی در هیپوکامپ حیوانات نر دچار تنظیم کاهشی می‌شود و برعکس اتصال به این گیرنده ها در هیپوکامپ حیوانات ماده دچار تنظیم افزایشی می‌شود. همزمان میزان اتصال به گیرنده‌های مینرال کورتیکوئیدی در حیوانات ماده افزایش پیدا می‌کند؛ ولی در جنس نر تغییری در میزان اتصال به این گیرنده ها ایجاد نمی‌شود. این یافته ها نشان می دهد که تنظیم پاسخ به استرس در جنس نر و ماده در مناطق مختلف مغز متفاوت است (۲۸). در واقع گلکوکورتیکوئیدها فیزیولوژی تمام بافتها را تنظیم کرده و میانجی‌گر پاسخ به استرس هستند. از جمله پروتئین‌هایی که به وسیله گلوکوکورتیکوئیدها تنظیم می‌شود iNOS است (۲۹) و این احتمال وجود دارد که با افزایش سطح کورتیکواستروئیدها به دنبال فعال شدن محور هیپوفیز- هیپوتالاموس- آدرنال در اثر استرس (در هردو جنس) میزان اتصال گلوکوکورتیکوئیدها به گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی در بافت زخم حیوانات ماده تحت استرس حاد (در روز هفتم) و مزمن افزایش یافته و باعث کاهش تولید iNOS و متعاقب آن کاهش تولید NO شود؛ البته تائید این هیپوتز نیاز به انجام مطالعات بیشتر دارد.

یکی دیگر از دلایل احتمال اثر کمتر استرس بر غلظت iNOS و NO در حیوانات ماده هورمون استروژن است که از قدیم‌الایام نقش آن در کاهش بیان فاکتورهای پیش التهابی شناخته شده است (۳۰). استروژن احتمالاً مانع

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

افزایش iNOS در شرایط استرس‌زا در حیوانات ماده می‌شود و مسیر iNOS نقش مهمی در تأخیر در ترمیم زخم در حیوانات ماده ندارد. بهر حال، شناخت مکانیسم دقیق اثرات استرس بر فرآیند ترمیم زخم و نیز نقش مسیر نیتریک اکسید سنتاز در تأخیر ناشی از استرس در ترمیم زخم نیاز به مطالعات گسترده‌تر و دقیق‌تر دارد. از جمله محدودیت‌های این مطالعه عدم تعیین فازهای سیکل استرس در حیوانات ماده در حین مطالعه بود. همچنین تفاوت مکانیسم‌های پاسخ به استرس در حیوانات و انسان مانع از تعمیم نتایج این مطالعه به انسان می‌شود.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن باعث افزایش غلظت iNOS و NO در فاز التهاب و ابتدای فاز تکثیر فرآیند ترمیم زخم در موش صحرایی نر می شود و احتمالاً یکی از دلایل طولانی شدن فرآیند ترمیم زخم در حیوانات نر است. همچنین استرس حاد باعث افزایش غلظت iNOS و NO در فاز التهاب فرآیند ترمیم زخم (روز سوم بعد از ایجاد زخم) در موش صحرایی ماده شد، در حالی که در روز هفتم بعد از ایجاد زخم یعنی در فاز تکثیر میزان iNOS و NO در بافت زخم حیوانات ماده تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت. علاوه بر این استرس بی‌حرکتی مزمن اثری بر میزان iNOS و NO در بافت زخم حیوانات ماده نداشت. با توجه به این نتایج مسیر iNOS احتمالاً نقش زیادی در اختلال در ترمیم زخم در حیوانات ماده ندارد که یکی از دلایل آن می‌تواند نقش هورمون استروژن در کاهش بیان iNOS باشد.

تشکر و قدردانی

بودجه این مطالعه توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان در قالب طرح شماره ۹۸۰۲۱۰۷۷۴ تأمین گردیده است. کد کمیته اخلاق: IR.UMSHA.REC.1398.596 است و در نهایت به استحضار می‌رساند که هیچ‌کدام از نویسندگان، افراد و دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1.Salleh MR. Life event, stress and illness. Malays J Med Sci. 2008;15(4):9-18.
2.Esch T. [Health in stress: change in the stress concept and its significance for prevention, health and life style]. Gesundheitswesen. 2002; (2)64: 73-81.
3.Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cultured Keratinocytes.: IMPLICATIONS FOR NORMAL AND IMPAIRED WOUND HEALING. J Biol Chem. 1995; 21(270)12607-13
4.Gouin J-P, Kiecolt-Glaser JK. The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms. Immunol Allergy Clin North Am. 2011;31(1):81-93.
5.Shah R, Domah F, Shah N, Domah J. Surgical Wound Healing in the Oral Cavity: a Review. Dent Update. 2020;47(2):135-43.
6.Vileikyte L. Stress and wound healing. Clin Dermatol. 2007;25(1):49-55.
7.Stefano GB, Fricchione GL, Slingsby BT, Benson H. The placebo effect and relaxation response: neural processes and their coupling to constitutive nitric oxide. Brain Res Rev. 2001;35(1):1-19.
8.Gümüşel B, Orhan D, Tolunay Ö, Uma S. The Role of Nitric Oxide in Mediating Nonadrenergic, Noncholinergic Relaxation in Rat Pulmonary Artery. Nitric Oxide. 2001; 4(5)296-301.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]
[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

9.Stefano GB, Goumon Y, Bilfinger TV, Welters ID, Cadet P. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. Prog Neurobiol. 2000;60(6):513-30.
10.Shinde UA, Mehta AA, Goyal RK. Nitric oxide: a molecule of the millennium. Indian J Exp Biol. 2000;38(3):201-10.
11.Tobias Esch GBS, Gregory L Fricchione, Herbert Benson. Stress-related diseases a potential role for nitric oxide. Med Sci Monit.2002; (6)8:103-18.
12.Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair and Regen. 2008;16(5):585-601.
13.Mori R, Kondo T, Nishie T, Ohshima T, Asano M. Impairment of skin wound healing in beta-1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. Am J Pathol. 2004;164(4):1303-14.
14.Nili-Ahmadabadi A, Ali-Heidar F, Ranjbar A, Mousavi L, Ahmadimoghaddam D, Larki-Harchegani A, et al .Protective effect of amlodipine on diazinon-induced changes on oxidative/antioxidant balance in rat hippocampus. Res Pharm Sci. 2018;13(4):368-76.
15.Verma R, Balhara YPS, Gupta CS. Gender differences in stress response: Role of developmental and biological determinants. Ind Psychiatry J. 2011; 20(1):4-10.
16.Moloudi R, Nabavizadeh F, Nahrevanian H, Hassanzadeh G. Effect of different doses of GLP-2 (Teduglutide) on acute esophageal lesion due to acid-pepsin perfusion in male rats. Peptides. 2011;(10)32: 2086-90
17.Kvetnansky R, McCarty R. Immobilization Stress. In: Fink G, editor. Encyclopedia of Stress. 2nd ed. New York: Academic Press, 2007: 445-9.
18.Karamercan A, Ercan S, Bozkurt S. Nitric oxide synthase inhibitors appear to improve wound healing in endotoxemic rats: An investigator-blinded, controlled, experimental study. Curr Ther Res Clin Exp. 2006;67(6):378-85.
19.Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. Int J Mol Sci. 2016;17(12):2085.
20.McCartney-Francis NL, Song X-y, Mizel DE, Wahl SM. Selective Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Exacerbates Erosive Joint Disease. J Immunol Res. 2001; 166(4):2734-40
21.Saidian M, Lakey JRT, Ponticorvo A, Rowland R, Baldado M, Williams J, et al. Characterisation of impaired wound healing in a preclinical model of induced diabetes using wide-field imaging and conventional immunohistochemistry assays. Int Wound J. 2019;16(1):144-52.
22.Gajendrareddy P, Ilangovan G, Kuppusamy P, Horan M, Eijkelkamp N, Marucha P. 053 Psychological Stress Impairs Healing and Oxygenation in Cutaneous Wounds. Wound Repair and Regen. 2004;12(2):A15-A.
23.Hodes GE, Pfau ML, Purushothaman I, Ahn HF, Golden SA, Christoffel DJ, et al. Sex Differences in Nucleus Accumbens Transcriptome Profiles Associated with Susceptibility versus Resilience to Subchronic Variable Stress. J Neurosci Res. 2015;35(50):16362-76.
24.Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OFX. Ontogeny of Gender-Specific Responsiveness to Stress and Glucocorticoids in the Rat and its Determination by the Neonatal Gonadal Steroid Environment. Stress. 1999;3(1):41-54.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]

25.Klinger K, Gomes FV, Rincón-Cortés M, Grace AA. Female rats are resistant to the long-lasting neurobehavioral changes induced by adolescent stress exposure. Eur Neuropsychopharmacol. 2019;29(10):1127-37.
26.Zavala JK, Fernandez AA, Gosselink KL. Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. Physiol Behav. 2011;104(2):215-21.
27.Bourke CH, Harrell CS, Neigh GN. Stress-induced sex differences: adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. Horm Behav. 2012;62(3):210-8.
28.ter Horst JP, de Kloet ER, Schächinger H, Oitzl MS. Relevance of Stress and Female Sex Hormones for Emotion and Cognition. Cell Mol Neurobiol. 2012;32(5):725-35.
29.Marchetti B, Serra PA, Tirolo C, L'Episcopo F, Caniglia S, Gennuso F, et al. Glucocorticoid receptor-nitric oxide crosstalk and vulnerability to experimental parkinsonism: pivotal role for glia-neuron interactions. Brain Res Brain Res Rev. 2005;48(2):302-21.
30.Park EM, Cho S, Fry KA, Glicstein SB, al ZPe. Inducible Nitric Oxide Synthase Contribute to Gender Differences in Ischemic Brain Injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2006;26(3):392-401.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.24]