

## 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<sup>1</sup>, Fatemeh Zeraati<sup>2</sup>, Rasool Haddadi<sup>3</sup>, Maryam Karamali<sup>4</sup>**

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, Iran  
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 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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

## 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<sup>۱</sup>، فاطمه زراعتی<sup>۲</sup>، رسول حدادی<sup>۳</sup>، مریم کرملی<sup>۴</sup>

۱. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (نویسنده مسئول). تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۱۶۷۳ ایمیل: ptamri@gmail.com

ارکید: ۴۱۵X-۹۵۵۳-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰

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

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

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

#### چکیده

**زمینه و هدف:** با توجه به اینکه استرس باعث کاهش سرعت ترمیم زخم می‌شود، هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر استرس بی حرکتی 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 نیتريت به وسیله معرف گریس اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** استرس بی حرکتی 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 بی حرکتی حاد و مزمن باعث افزایش معنادار غلظت NO 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 و NO در اثر استرس بی حرکتی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های اصلی تأخیر در ترمیم زخم به وسیله استرس باشد.

**کلمات کلیدی:** نیتریک اکسید، استرس بی حرکتی، ترمیم زخم، نیتریک اکسید سنتاز قابل القا

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

## 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 بیش‌فعالی برای واکنش‌های ضروری در مقابل عامل استرس‌زا شود (۲).

بیش از دو دهه است که به روشنی مشخص شده است که استرس می‌تواند سرعت ترمیم زخم را به طور قابل توجهی کاهش دهد (۳-۵). عوامل استرس‌زا 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 پیش‌بینی 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 کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها 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 می‌تواند 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 سیتوکین‌های 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 دبله عمل می‌کند مقادیر بسیار کم نیتریک اکسید که به وسیله نیتریک اکسید سنتاز ساختاری تولید می‌شود، واسطه اعمال فیزیولوژیک است در حالی که 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

شده توسط دانشگاه علوم پزشکی همدان (کد کمیته اخلاق: IR.UMSHA.REC.1398.596) در این پژوهش لحاظ گردید.

ایجاد زخم:

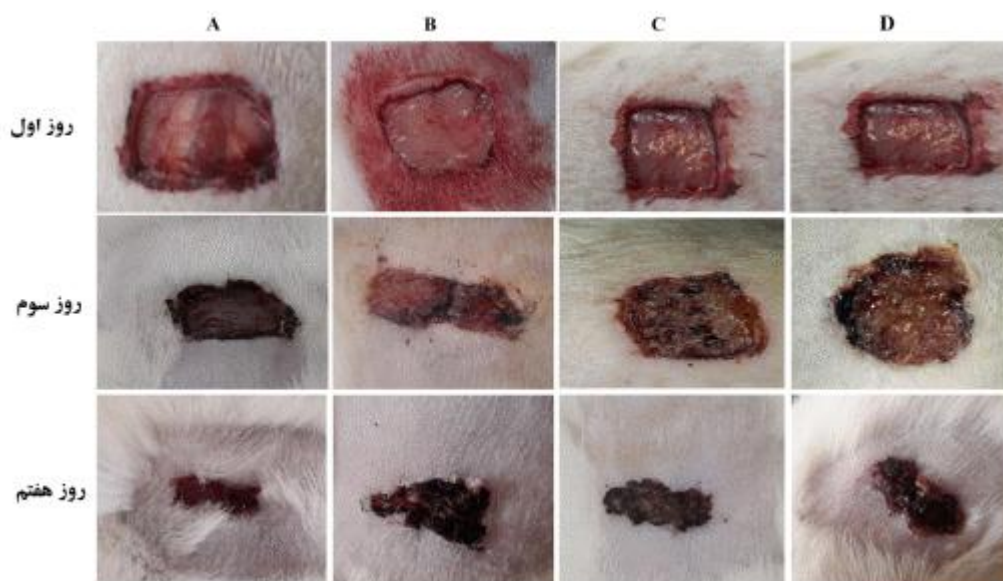
بعد از بیهوش کردن حیوان توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ میلی گرم / کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم / کیلوگرم)، موهای ناحیه پشت حیوان کاملاً تراشیده و تمیز شد و محل مورد نظر جهت ایجاد زخم با اتانول ۷۰٪ ضد عفونی گردید. پس از قرار دادن حیوان در وضعیت مناسب با استفاده از یک شابلون و یک ماژیک، مربعی با ابعاد ۱۰ میلی متر × ۱۰ میلی متر بر روی ناحیه تراشیده شده، ترسیم گردید. در مرحله 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).

نقش داشته باشد؛ زیرا نیتریک اکسید سنتاز قابل القا با پاتوژن 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.

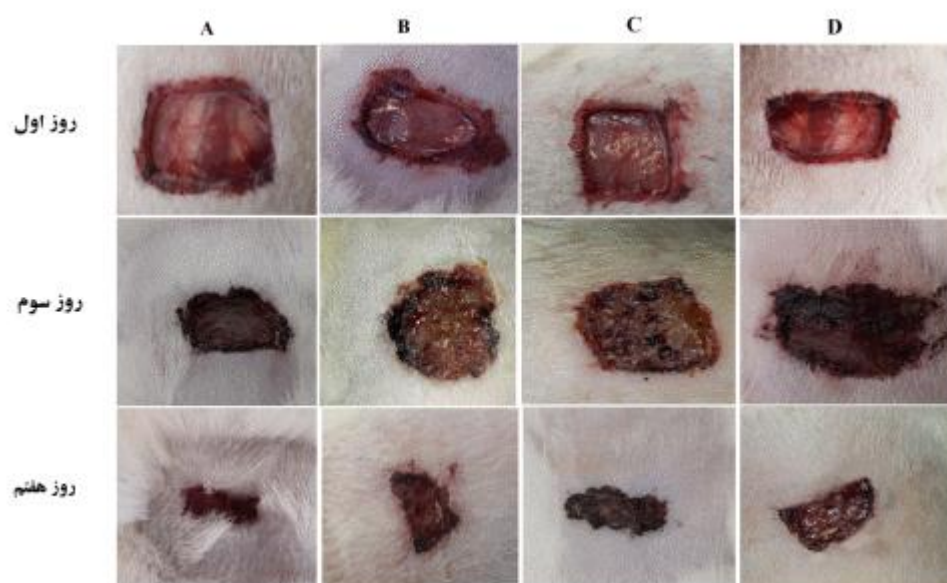
## مواد و روش‌ها

گروه‌های حیوانی:

در این مطالعه از ۴۸ سر موش صحرایی نر و ماده‌ی بالغ در محدوده‌ی وزنی  $25 \pm 20$  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  $22 \pm 2$  درجه سلسیوس و مدت روشنایی \_ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت بود. کلیه ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق دستورالعمل ابلاغ



شکل ۱- تصویر زخم‌های ایجاد شده در گروه‌های 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.



شکل ۲- 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

درصد سدیم دودسیل سولفات (Sodium SDS dodecyl sulfate)، ادرصد Nonidet P-40 و ۵ میلی‌مول EDTA و مهار کننده پروتاز (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، نمونه‌ها 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 پروتئین تام بافتی با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری 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، نمونه‌ها و استانداردها به چاهک‌های

مدل استرس بی حرکتی حاد و مزمن: جهت ایجاد استرس بی حرکتی از دستگاه محدودکننده (Restrainer) استفاده شد. این دستگاه از جنس پلی وینیل کلراید (Polyvinyl chloride, PVC) شفاف به ابعاد ۵×۲۰ سانتی متر با درب لولایی و قابلیت تنظیم طولی برای اندازه و وزن‌های مختلف موش و همچنین دارای روزنه‌هایی برای ورود هوا و یک محفظه برای قرارگیری دم حیوان است. گروه‌های 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 آماده‌سازی 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 لیزکننده (حاوی ۱۰ میلی‌مول بافر فسفات سالیین (Phosphate buffer saline, PBS)، ۰/۱

استفاده از منحنی کالیبراسیون نیتريت سدیم اندازه گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها:

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 8 تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  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  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

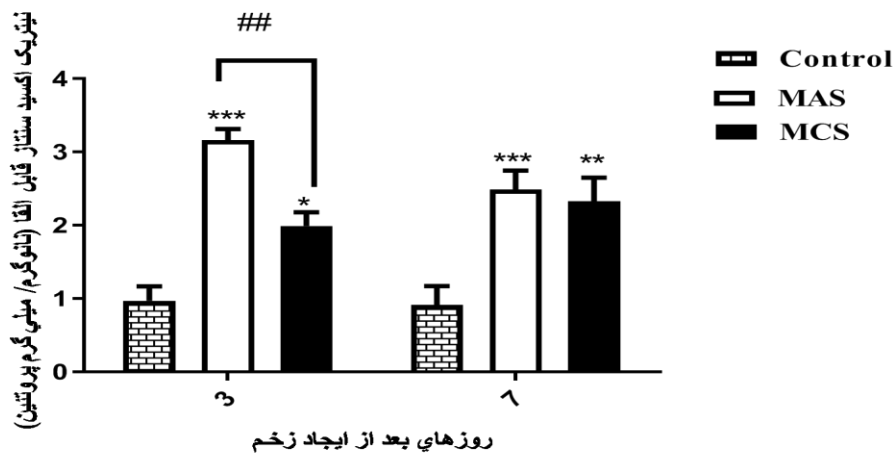
### یافته‌ها

اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتريك اکسید سنتاز قابل القا در حیوانات نر: همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود استرس بی‌حرکتی حاد ( $P < 0.001$ ) و مزمن ( $P < 0.05$ ) غلظت آنزیم نیتريك 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 ( $P < 0.001$ ) و مزمن ( $P < 0.01$ ) 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 ( $P < 0.01$ ) 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.

میکروپلیت الایزا که به وسیله یک آنتی بادی اختصاصی برای نیتريك اکسید قابل القا موش صحرایی پوشش داده شده بودند، اضافه شده و با آنتی بادی اختصاصی ترکیب شدند. سپس یک آنتی بادی آشکارگر اختصاصی برای iNOS 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.

اندازه‌گیری غلظت نیتريك اکسید:

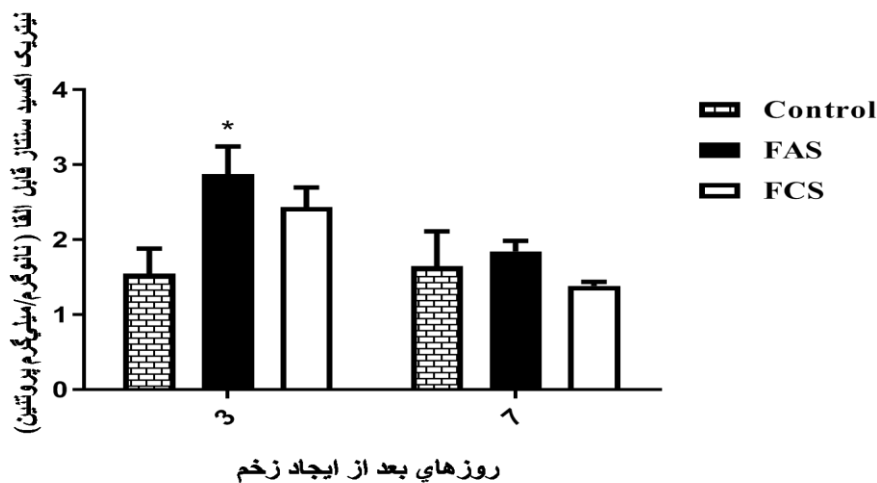
غلظت نیتريت، به عنوان شاخص تولید نیتريك اکسید در نمونه‌های بافتی با استفاده از معرف گریس (Griess reagent) اندازه‌گیری شد (۱۶). حجم‌های مساوی از معرف گریس و نمونه‌های بافتی هموژنیزه با هم مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. میزان جذب نوری نمونه‌ها به وسیله دستگاه پلیت ریدر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



نمودار ۱. اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در بافت زخم در موش صحرائی نر. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) و \*\*\* ( $P < 0.001$ ) نشان دهنده تفاوت معنادار با گروه کنترل است. ## ( $P < 0.01$ ) 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

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.

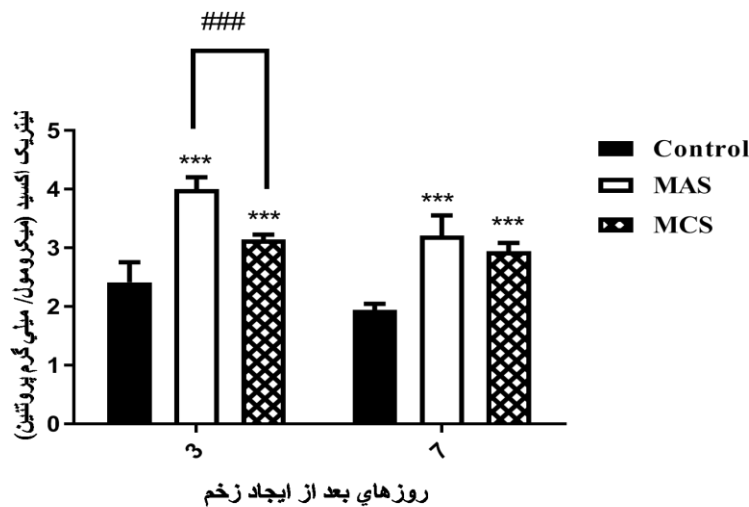
اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در حیوانات ماده: همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود غلظت iNOS در نمونه‌های بافتی به دست آمده از حیوانات ماده‌ای که تحت استرس حاد بی حرکتی بوده‌اند در روز سوم بعد از ایجاد زخم به طور معناداری ( $P < 0.05$ ) بیشتر از گروه



نمودار ۲. اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در بافت زخم در موش صحرائی ماده. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. \* ( $P < 0.05$ ) نشان دهنده تفاوت معنادار با گروه کنترل است. FCS - حیوانات ماده تحت استرس مزمن، FAS - حیوانات ماده تحت استرس حاد

نمونه‌های به دست آمده از گروه‌های تحت استرس حاد و مزمن به طور معناداری ( $P < 0/001$ ) 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 ( $P < 0/001$ ) بیشتر از حیوانات تحت استرس مزمن بود؛ ولی این تفاوت در روز هفتم معنادار نبود (نمودار ۳).

اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم حیوانات نر: اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکسید در نمونه‌های 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 ( $P < 0/001$ ) پیدا کرده است. در روز هفتم بعد از ایجاد زخم نیز میزان نیتریک اکسید در

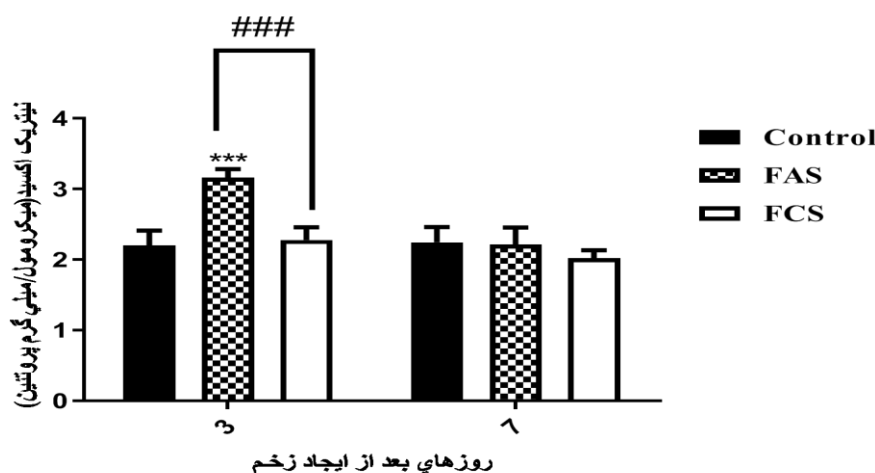


نمودار ۳- اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  SEM نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. \*\*\* ( $P < 0/001$ ) تفاوت معنادار با گروه کنترل و ### ( $P < 0/001$ ) تفاوت معنادار بین گروه تحت استرس حاد و مزمن را نشان می‌دهد. MAS- حیوانات نر تحت استرس مزمن، MCS- حیوانات نر تحت استرس حاد

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).

اثر استرس بی حرکتی 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 ( $P < 0/001$ ) بیشتر از گروه کنترل و حیوانات تحت استرس مزمن بود. در این روز بین غلظت





نمودار ۴. اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم در موش صحرایی ماده. داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  SEM نشان داده شده اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. \*\*\* ( $P < 0.001$ ) تفاوت معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهد و ### ( $P < 0.001$ ) 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 سیتوکین‌های پیش التهابی ترمیم زخم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳).

مسیر نیتریک اکسید سنتاز از جمله مسیرهای احتمالی است که استرس از طریق آن فرآیند ترمیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. 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 می‌شود.

برای ایجاد استرس از مدل استرس بی حرکتی 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 سیتوکین‌هاست (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 پاتورژن التهاب مزمن نقش دارد (۲۰). Saidian و همکاران در سال ۲۰۱۹ در یک مطالعه نشان دادند که iNOS در دم موش‌های دیابتی بیشتر از موش‌های غیر دیابتی است و اینکه iNOS باعث افزایش التهاب و طولانی شدن فرآیند ترمیم زخم می‌شود (۲۱). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش iNOS با تأخیر در ترمیم زخم مرتبط است.

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

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 می کند. اتصال به گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی در هیپوکامپ حیوانات نر دچار تنظیم کاهشی می شود و برعکس اتصال به این گیرنده ها در هیپوکامپ حیوانات ماده دچار تنظیم افزایشی می شود. همزمان میزان اتصال به گیرنده های مینرال کورتیکوئیدی در حیوانات ماده افزایش پیدا می کند؛ ولی در جنس نر تغییری در میزان اتصال به این گیرنده ها ایجاد نمی شود. 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 میانجی گر پاسخ به استرس هستند. از جمله پروتئین هایی که به وسیله گلوکوکورتیکوئیدها تنظیم می شود 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 گیرنده های 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 قدیم الایام نقش آن در کاهش بیان فاکتورهای پیش التهابی شناخته شده است (۳۰). استروژن احتمالاً مانع

و پنجم بعد از ایجاد زخم در حیوانات تحت استرس افزایش یافت که در راستای نتایج مطالعه حاضر است. آن ها 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 مطالعه ای که به وسیله Karamercan و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد نشان داد که مهار بیوستنز NO باعث بهبود استحکام کشتی زخم می شود که نشان دهنده نقش احتمالی مهارکننده های iNOS در بهبود زخم در صورت وجود اندوتوکسمی است (۱۸). نتایج این مطالعه نیز مؤید این مطلب است که iNOS می تواند 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 می شوند 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 کرده اند؛ اما نتایج تحقیقات مختلف در این زمینه متفاوت بوده است (۱۵). در حالیکه نتایج بعضی از مطالعات نشان می دهد که حیوانات ماده و زنان در برابر استرس مزمن حساس تر از حیوانات نر و مردان هستند (۲۳)، مطالعات دیگری برعکس نشان داده اند 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 می دهند (۲۵، ۲۶). در واقع مکانیسم هایی که جنس مؤنث برای پاسخ دهی به استرس استفاده می کند دارای تفاوت اساسی با جنس نر است (۲۷).

هورمون های گلوکوکورتیکوئید نقش اساسی در سازگاری یک ارگانسیم با رویدادهای استرس زا در طول زندگی آن دارند. یکی از دلایل متفاوت بودن پاسخ دو جنس نر و ماده

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 بی حرکتی 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 می تواند 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 هیچ کدام از نویسندگان، افراد و دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

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 بی حرکتی حاد و مزمن باعث افزایش غلظت iNOS و NO در فاز التهاب و ابتدای فاز تکثیر فرآیند ترمیم زخم در موش صحرایی نمی‌شود 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

### 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. Gümüsel 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.

- 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.* 2<sup>nd</sup> 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.

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.