

## 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 تمri<sup>۱</sup>، فاطمه زداعتی<sup>۲</sup>، رسول حدادی<sup>۳</sup>، مریم کو معلی<sup>۴</sup>

۱. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (نویسنده مسئول). تلفن: ۰۸۱۳۸۳۱۶۷۳؛ ایمیل: ptamri@gmail.com کد ارائه: ۴۵۵۳-۹۵۵۳-۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰

<sup>۲</sup>. استاد، گوهارمکولوژی و سمتشناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایام: کد ارجمند: X-۶۹۷۰-۹۷۰-۰۹۰۰-۰۰۰۰.

۳. استادیار، گوشه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. کد ارکید: ۴۶۶۵-۹۶۴۲-۱۰۰۰۰۰۰۱.

حکیمہ

**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 ستاز قابل القا (iNOS) و نیتریک اکسید (NO) در بافت زخم در موش صحرایی پیورد.

**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، جمع آوری شد. غلظت iNOS به روش الایزا و غلظت NO با استفاده از اندازه‌گیری غلظت نتیریت به وسیله معرف گریس اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** استرس بی حرکتی حاد ( $P < 0.001$ ) و مزمن ( $P < 0.05$ ) 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 ( $P < 0.05$ ). استرس بی حرکتی حاد و مزمن باعث افزایش معنادار 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 ( $P < 0.001$ ).

**نتیجه‌گیری:** افزایش میزان iNOS و NO در اثر استرس می‌تواند یکی از مکانیسم‌های اصلی تأخیر در ترمیم زخم به وسیله است س. باشد.

**كلمات كليدي:** نتیجہ کی اکسید، استر سی بھر کتے، تمیز زخم، نتیجہ کی اکسید سنتا ز قابل القا

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۵/۶ اصلاحه نهایی: ۱۴۰۰/۷/۱۸ بذری ش: ۱۴۰۰/۷/۲۸

## مقدمه

اندوتیلیوم در بدن تولید و ریلیز می‌شود و بدین ترتیب احتمالاً در فرآیندها و مسیرهای پاتوفیزیولوژیک مختلف 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 (Constitutive nitric oxide synthase, cNOS) انجام می‌شود که یک آنزیم وابسته به کلسیم است که به طور دائم در سلول‌های ایمنی، عصبی و اندوتیالیال 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 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 نهفته‌گی، 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 نیتریک اکسید سنتاز ساختاری تولید می‌شود، واسطه اعمال فیزیولوژیک است درحالی که بیان نیتریک اکسید قابل القا باعث تولید مقادیر بیشتر نیتریک اکسید می‌شود که با اثرات سیتوکسیک 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

استرس سال‌هاست که کانون توجه علم، پژوهش و پژوهشی 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 محرك است که نیازمند تغییرات روانشناختی، رفتاری و فیزیولوژیکی است که بتواند به طور موقتی 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 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 مختلف 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 اندوتیال 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).

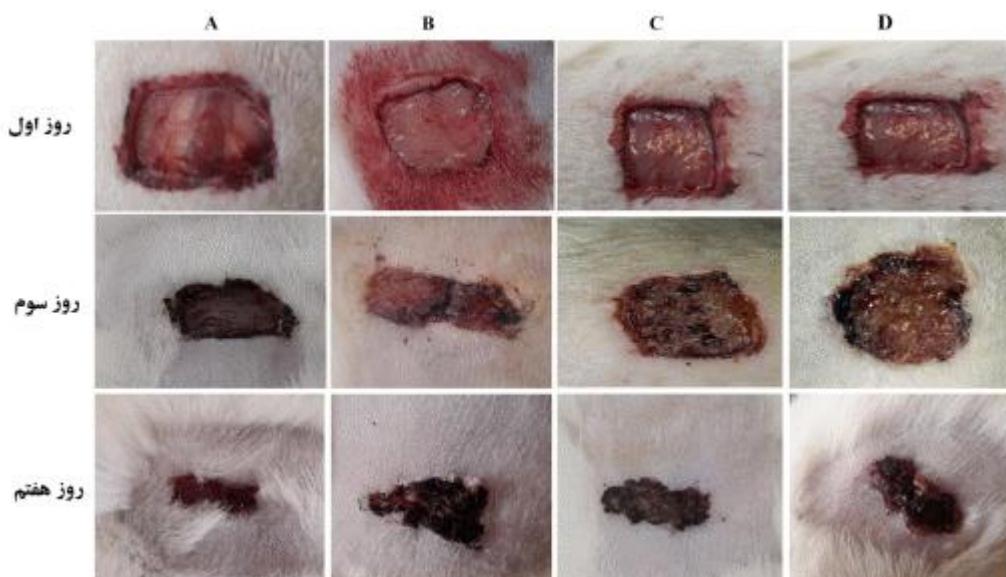
التهاب یک بخش طبیعی از فرآیند ترمیم زخم است؛ ولی اگر التهاب طولانی شود، فرآیند ترمیم نیز طولانی خواهد شد. نیتریک اکسید (Nitric oxide, NO) هم در التهاب و هم در ترمیم زخم دخالت دارد. نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد است که دائمًا به وسیله بافت‌های مختلف مانند

شده توسط دانشگاه علوم پزشکی همدان (کد کمیته اخلاق: پاتوژنر التهاب مزمن مرتبط است (۱۱)؛ لذا هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید سنتاز قابل القا و نیتریک اکسید در طول ترمیم زخم در موش صحرایی بود.

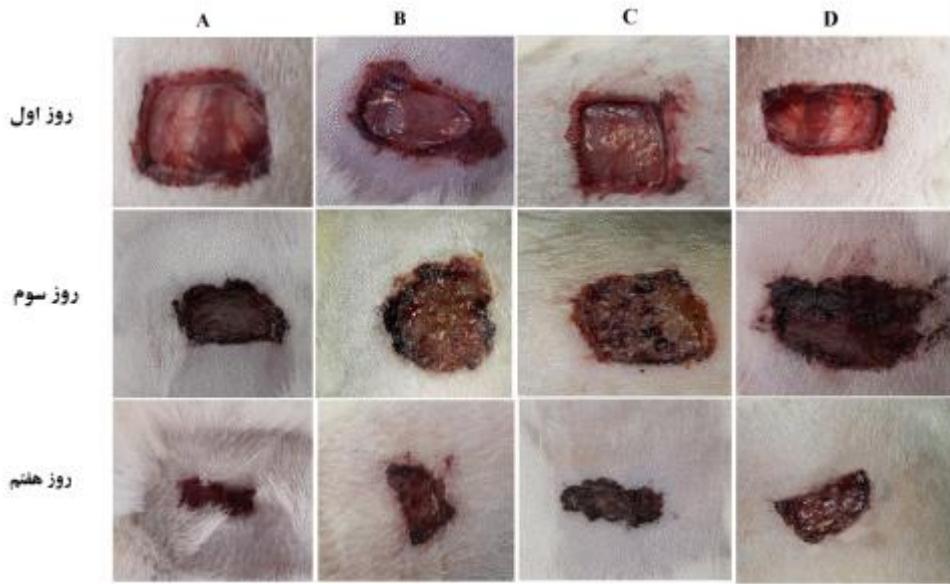
بعد از بیهوش کردن حیوان توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ میلی گرم / کیلوگرم) و زایلazین (۵ میلی گرم / کیلوگرم)، موهای ناحیه پشت حیوان کاملاً تراشیده و تمیز شد و محل مورد نظر جهت ایجاد زخم با اتانول ۷۰٪ ضد عفونی گردید. پس از قرار دادن حیوان در وضعیت مناسب با استفاده از یک شابلون و یک ماژیک، مربعی با ابعاد ۱۰ میلی متر  $\times$  ۱۰ میلی متر بر روی ناحیه تراشیده شده، ترسیم گردید. در مرحله‌ی بعد با استفاده از یک تیغ جراحی یک زخم با خشامت کامل که شامل برداشتن لایه‌های اپiderم و درم بود در پوست حیوان ایجاد شد (شکل‌های ۱ و ۲).

**مواد و روش‌ها**  
گروه‌های حیوانی:

در این مطالعه از ۴۸ سر موش صحرایی نر و ماده‌ی بالغ در محدوده وزنی  $۲۰۰ \pm ۲۵$  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  $۲۲ \pm ۲$  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 مختلف حیوانی در روز اول، سوم و هفتم. A. گروه کنترل ماده تحت استرس حاد. B. حیوانات ماده تحت استرس حاد. C. گروه کنترل نر تحت استرس حاد. 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. گروه کنترل ماده، C. گروه کنترل نر، D. گروه کنترل نر تحت استرس مزمن

Sodium SDS در صد سدیم دودسیل سولفات (dodecyl sulfate, Nonidet P-40) و درصد میلی مول EDTA و مهار کننده پروتئاز) جهت استخراج پروتئین هموژنیزه شدن. هموژن بافتی در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد (۱۳). سوپرناتانت جهت اندازه‌گیری میزان نیتریک اکسید سنتاز مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری میزان نیتریک اکسید، نمونه‌ها در بافر تربیس هموژنیزه شده و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدن و سوپرناتانت برای سنجش غلاظت نیتریک اکسید مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). میزان پروتئین تام بافتی با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۱۵).

اندازه‌گیری غلاظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا: غلاظت 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 محدود کننده (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 وزن‌های مختلف موش و همچنین دارای روزنه-هایی برای ورود هوای محفظه برای قرار گیری 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 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 ملی‌لیتری) مخلوط شدند و در ۴°C در ۱۵ دقیقه در شرایط آسپتیک درست شدند.

استفاده از منحنی کالیبراسیون نیتریت سدیم اندازه گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها:

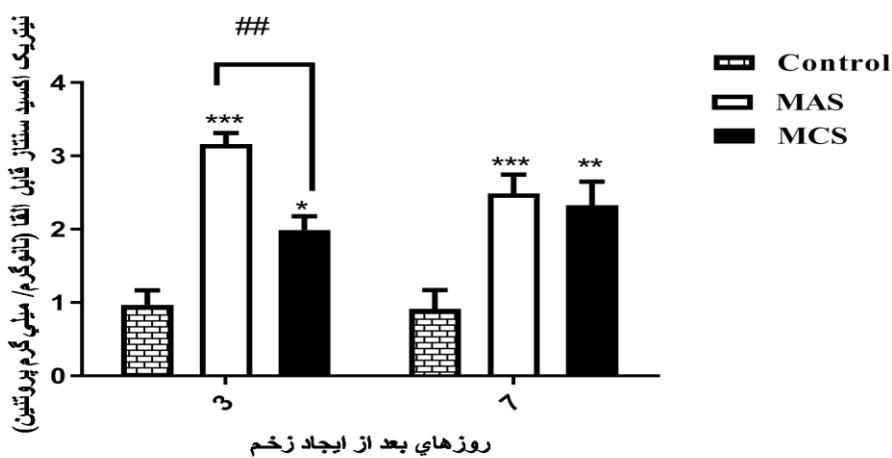
داده ها با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism داده ها با استفاده از نرم افزار آماری Mean $\pm$  SEM ۸ تجزیه و تحلیل شدند. داده ها به صورت نشان داده شدند. جهت بررسی تفاوت آماری بین مقادیر آزمایشی و کنترل، از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه (ANOVA) استفاده شد و جهت شناسایی تفاوت بین گروه ها از تست Tukey استفاده شد. مقادیر  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید ستاز قابل القا در حیوانات نر: همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود استرس بی حرکتی حاد ( $P < 0.001$ ) و مزمن ( $P < 0.05$ ) غلظت آنزیم نیتریک اکسید ستاز قابل القا در روزهای سوم بعد از ایجاد زخم، به طور معناداری نسبت به گروه کنترل (بدون استرس) افزایش داده اند. 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 می دهد در روز سوم بعد از ایجاد زخم، غلظت iNOS در حیواناتی که تحت استرس حاد بوده اند 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 گروه های تحت استرس حاد و مزمن وجود نداشت.

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 آشکارگر اختصاصی شدند. سپس یک آنتی بادی آشکارگر اختصاصی ترکیب شدند. آنچه که اضافه شده و از آنچه که آشکارگر اختصاصی موش صحرایی با برچسب بیوتین و کونژو گه آویدین - پراکسیداز به چاهک ها اضافه شده و انکوبه شدند. پس از شستشوی کامل پلیت، سوبسترا به چاهک ها اضافه شد. فقط چاهک هایی که حاوی آنتی بادی iNOS موش صحرایی و آنتی بادی آشکارگر با برچسب بیوتین و کونژو گه آویدین - پراکسیداز بودند به رنگ آبی ظاهر شدند. با افروختن محلول متوقف کننده به چاهک ها واکنش آنژیم - سوبسترا خاتمه یافته و رنگ زرد ظاهر شد. میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Bioteck microplate reader, USA ۴۵۰) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. با مقایسه میزان جذب نمونه ها با منحنی استاندارد، غلظت iNOS در نمونه ها محاسبه شد.

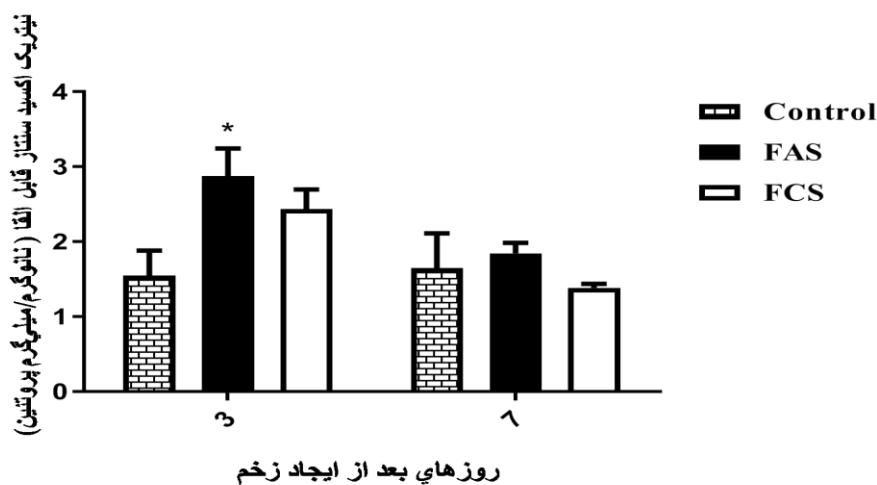
اندازه گیری غلظت نیتریک اکسید: غلظت نیتریت، به عنوان شاخص تولید نیتریک اکسید در نمونه های بافتی با استفاده از معرف گریس (Griess reagent) اندازه گیری شد (۱۶). حجم های مساوی از معرف گریس و نمونه های بافتی هموژنیزه با هم مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. میزان جذب نوری نمونه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



نمودار ۱. اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا 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. \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) 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.

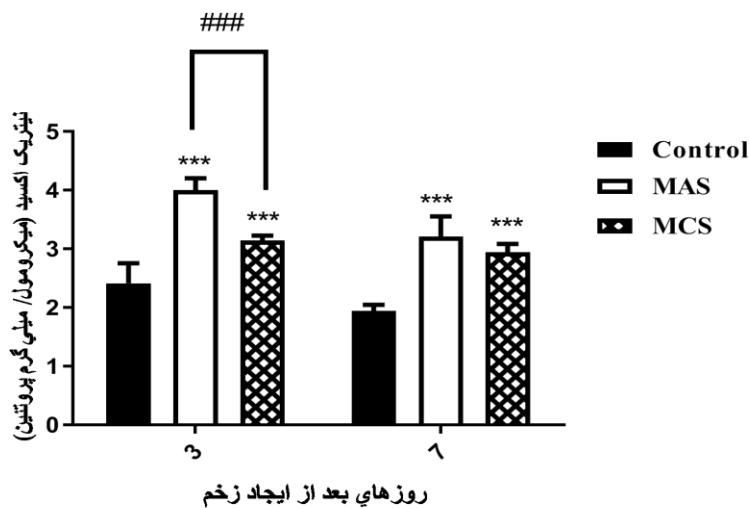
اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در حیوانات ماده: همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود غلظت iNOS در نمونه‌های بافته به دست آمده از حیوانات ماده‌ای که تحت استرس حاد بی حرکتی بوده‌اند در روز سوم بعد از ایجاد زخم به طور معناداری ( $P < 0.05$ ) بیشتر از گروه



نمودار ۲. اثر استرس بی حرکتی حاد و مزمن بر غلظت نیتریک اکسید سنتاز قابل القا در بافت زخم در موش صحرایی ماده. داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  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 بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم حیوانات نزدیک اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکسید در نمونه‌های به دست آمده از گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان نیتریک اکسید در بافت زخم حیوانات نزدیک 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

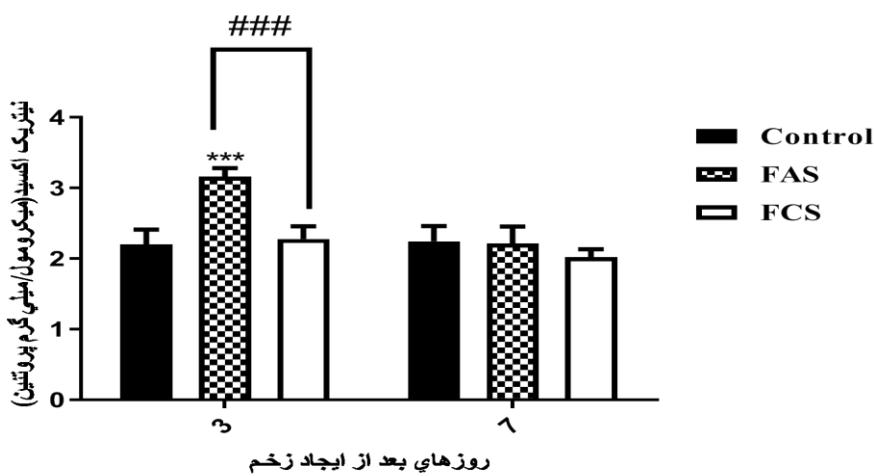


نمودار ۳- اثر استرس بی‌حرکتی حاد و مزمن بر میزان نیتریک اکسید در بافت زخم در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  نشان داده شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و سپس تست تعقیبی Tukey است. \*\*\* ( $P<0.001$ ) تفاوت معنادار با گروه کنترل و # ( $P<0.05$ ) تفاوت معنادار بین گروه تحت استرس حاد و مزمن را نشان می‌دهد. MCS- حیوانات نر تحت استرس مزمن، MAS- 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 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 ( $P<0.001$ ) 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  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  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، - حیوانات ماده تحت استرس حاد

### بحث

#### 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 عمده‌تاً مرتبط با اثرات ضدالتهابی و سرکوبیگر 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 دادند که iNOS در درموش‌های 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

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 گلوكورتیکوئید و سیتوکین های 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 NO و iNOS 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

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 گلوکورتیکوئیدی در هیپوکامپ حیوانات نر دچار تنظیم کاهشی می شود و بر عکس 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 گلوکوکورتیکوئیدها 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 فعل 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 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 بیوسنتز NO باعث بهبود استحکام کششی زخم می شود که نشان دهنده نقش احتمالی مهار کننده های iNOS در بهبود زخم در صورت وجود اندو توکسمی است (۱۸). نتایج این مطالعه نیز مؤید این مطلب است که NO 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 NO و iNOS 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 حالکه 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 بر عکس 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 مذکور در برابر استرس مزمن نشان می دهند (۲۴، ۲۵). 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 ارگانیسم 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 می‌تواند نقش هورمون استروژن در کاهش بیان iNOS باشد.

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.

### 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 نویسنندگان، افراد و دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

### 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 می‌شود 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.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.

- 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-Ahmadianabi 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.Karamerican 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, Oriasa 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.