



بررسی تأثیر فلوفنامیک اسید به‌عنوان مهارکننده کانکسین بر روی ترمیم زخم‌های دیابتی

آیسان فتوت^۱، سید جواد احمدپناهی^۲، ابراهیم شهروزیان^۳، فرزاد حیاتی^۴، سحر غفاری خلیق^۵^۱دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران^۲گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران^۳گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران^۴گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران^۵گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایرانdoi [10.22059/jvr.2019.250965.2757](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.250965.2757)

تاریخ دریافت: ۱۱ تیر ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۲۰ مهر ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: فلوفنامیک اسید از خانواده فنانات‌ها بوده و به‌عنوان داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی و ضد درد مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به قابلیت دارو جهت مهار کانال‌های و ممانعت از خروج محتویات سلول از جمله ATP، احتمال تأثیر مثبت آن بر روند التیام زخم‌های دیابتی وجود دارد.

هدف: بررسی اثرات موضعی فلوفنامیک اسید به‌عنوان بلوک کننده کانال کانکسین بر التیام زخم رت‌های دیابتی شده توسط آلوکسان.

روش کار: در این مطالعه از ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار استفاده شد. همه رت‌ها توسط ۱۵۰ میلی گرم در کیلو گرم آلوکسان دیابتی و به‌صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. پس از بیهوشی برشی به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر در ناحیه پشت ایجاد و پوست به‌طور کامل جدا گردید. گروه‌ها به‌صورت جداگانه تحت درمان با پمادهای ۲، ۵ و ۱۰ درصد فلوفنامیک اسید قرار گرفتند و یک گروه نیز به‌عنوان کنترل فقط پماد وازلین و اوسرین دریافت کرد. پماد و پانسمان روزانه تجدید شد. از روز صفر تا ۲۱ روزهای فرد مساحت زخم موردبررسی قرار گرفت. در هر گروه، نیمی از رت‌ها در روز پنج و بقیه در روز ۲۱ یوتانایز و از محل برش، نمونه پاتولوژیک تهیه گردید.

نتایج: فرآیند ترمیم، تراکم فیروبلاست‌ها، روند اپیتلیالیزاسیون، آنژیوژنز، تشکیل رشته‌های کلاژن و بسته شدن زخم در گروه ۲ درصد بهتر از سایر گروه‌ها بود و به ترتیب در گروه‌های کنترل، ۵ و ۱۰ درصد از سیر نزولی برخوردار و دارای اختلاف معنی‌دار بود، بطوریکه در دو گروه آخر، فرآیند ترمیم مختل گردید.

نتیجه‌گیری نهایی: غلظت ۲ درصد دارو نه‌تنها اثرات ضدالتهابی قوی را بروز نداد، بلکه با تأثیر بر روی کانال‌های کانکسین ۴۳ و ممانعت از خروج ATP، فرآیند ترمیم را بهبود بخشیده و تسریع نمود، درحالی‌که در غلظت ۵ و ۱۰ درصد، اثرات ضدالتهابی دارو غالب بوده و منجر به تأخیر در فرآیند ترمیم گردید.

کلمات کلیدی: کانکسین، فلوفنامیک اسید، التیام زخم، دیابت، رت

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: سید جواد احمدپناهی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

پست الکترونیکی: j_panahi@semnan.ac.ir

مقدمه

گپ‌جانکشن‌ها امکان انتقال مستقیم یون‌ها، مولکول‌های کوچک و پیام‌رسان‌ها نظیر Ca^{2+} ، ATP، cAMP، NAD^+ ، IP_3 ، گلوتامات و پروستاگلندین‌ها را در بین سلول‌ها فراهم می‌سازند (۳۵). کانکسین‌های ۳۱، ۲۶ و ۴۳ امکان عبور ATP، cAMP و IP_3 و کانکسین ۴۶ امکان نفوذ cAMP را فراهم می‌سازند.

اتصالات روزنه‌دار کانال‌هایی هستند که امکان انتقال ترکیبات سیتوپلاسمی کوچک را بین سلول‌ها فراهم می‌کنند. پروتئین‌هایی که این اتصالات را می‌سازند تحت عنوان کانکسین شناخته می‌شوند (۳۳، ۳۶). کانکسین‌ها در گروه‌های ۶ تایی، کانکسون‌ها را می‌سازند و دو کانکسون (نیم کانال) در کنار هم یک کانال را شکل می‌دهند.

که فلوفنامیک اسید قادر به مهار کانال کانکسین بوده و مانع از آزاد شدن ATP به خارج سلول می‌شود (۲۶). Becker و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که پپتیدهای وابسته به کانکسین با ممانعت از خروج ATP از سلول، در ترمیم زخم‌های دیابتی نقش دارند (۲). Wang و همکاران در سال ۲۰۰۷ طی مطالعات خود نشان دادند که بیان غیرطبیعی کانال‌های کانکسین در پوست دیابتی، التیام زخم را به تعویق می‌اندازد (۳۵). یک مشکل طولانی در زمینه اتصالات روزنه‌دار، فقدان عوامل یا مهارکننده‌های کانکسین با توانایی بالا است. بازدارنده‌های اختصاصی کانال‌های کانکسین ممکن است اثرات درمانی داشته باشند، زیرا این کانال‌ها به‌عنوان یک هدف فارماکولوژیک قابل‌اعتماد در درمان صرع، آریتمی قلبی، سرطان و تومورها مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۶، ۳۲).

با توجه به اینکه کانکسین ۴۳ عمده‌ترین کانکسین پوست در ارتباط با کراتینوسیت‌ها و لایه زایگر بوده و در روند التیام زخم تعداد آن‌ها در کراتینوسیت‌های لبه زخم کاهش می‌یابد؛ از طرفی فلوفنامیک اسید، یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی است که قادر به مهار کانکسین ۴۳ می‌باشد، به نظر می‌رسد که این دارو با مهار کانال‌های کانکسین بتواند روند التیام زخم را بهبود بخشد. به همین علت مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر این دارو بر روند التیام زخم‌های دیابتی صورت گرفت.

مواد و روش کار

حیوان: در این مطالعه از ۴۰ سررت نژاد ویستار با وزن 10 ± 200 گرم استفاده شد. رت‌ها در قفس‌های پنج‌تایی در محیط با درجه حرارت ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت 10 ± 50 درصد و سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده، غذا به‌صورت پلیت مخصوص و آب بدون محدودیت در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

روش ایجاد دیابت تجربی: دیابت تجربی در رت‌ها با تزریق داخل صفاقی ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن آلوکسان (Sigma Aldrich Corporation – Germany) انجام شد. برای نتیجه بهتر، ۲۴ ساعت قبل از تزریق به رت‌ها غذا داده نشد. حیوان‌هایی که میزان قند خون آن‌ها در هر دسی‌لیتر بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم بود و علائمی نظیر پرنوشی و پرادراری داشتند، دیابتی در نظر گرفته شدند (۴).

ایجاد زخم: پس از حصول اطمینان از دیابتی بودن حیوان، به‌منظور ایجاد زخم ابتدا رت‌ها توسط کتامین و زایلازین بیهوش شده و موهای پشت حیوان تراشیده شد. سپس برشی به ابعاد 2×2 سانتی‌متر

کانکسین‌ها از نظر اندازه حفره با یکدیگر تفاوت دارند به طوری که کانکسین ۴۶ کوچک‌ترین و کانکسین ۴۳ بزرگ‌ترین آن‌ها می‌باشد (۱۹). ده نوع از ۲۱ نوع کانکسین شناخته‌شده در انسان، در لایه‌های مختلف پوست قرار دارد. کانکسین ۴۳ رایج‌ترین کانکسین پوست در ارتباط با لایه بازال، کراتینوسیت و فیبروبلاست است که در روند پرولیفراسیون سلول نقش دارد (۲۷).

آنالیز ایمونوفلورسنت در پوست سالم رت نشان می‌دهد که پروتئین کانکسین ۴۳ در لایه‌های زایگر و خاردار بیان می‌شوند. بین روزهای یک و دو بعد از ایجاد زخم میزان کانکسین ۴۳ به‌صورت واضح در لبه‌ها و اطراف زخم، یعنی همان‌جایی که پرولیفراسیون روی می‌دهد، کاهش می‌یابد. این کاهش سبب بسته شدن نارس اپیدرم بعد از ایجاد زخم شده و کاهش تعداد کانکسین ۴۳ قبل از مهاجرت کراتینوسیت‌ها می‌تواند روند بسته شدن زخم را سرعت بخشد (۲۴). در روند التیام زخم، کانکسین ۴۳ در کراتینوسیت‌های لبه‌ی زخم کاهش می‌یابد و امکان مهاجرت سلول‌ها و بسته شدن زخم را فراهم می‌سازد. کاهش کانکسین ۴۳ برای پرولیفراسیون و مهاجرت کراتینوسیت‌ها در التیام زخم ضروری است اما در زخم‌های مزمن مانند زخم‌های دیابتی تعداد این کانکسین‌ها بالا می‌رود، در نتیجه روند التیام طبیعی زخم با مشکل مواجه می‌شود (۱۱، ۲۷). تا زمانی که تعداد این کانکسین‌ها کاهش نیابد مهاجرت کراتینوسیت‌ها آغاز نمی‌شود و به نظر می‌رسد که با کاهش تعداد کانکسین‌های ۴۳ در رت‌های دیابتی شده، اپیتلیالیزاسیون مجدد سرعت می‌یابد (۲). در آسیب‌های بافتی و در طی روند التیام کانکسین ۴۳ نقش حیاتی در تنظیم التهاب دارد (۱۴، ۱۶). یکی از متابولیت‌های داخل سلولی مهم ATP است که در غلظت میلی‌مولار در سیتوزول حضور دارد و می‌تواند به‌راحتی از برخی نیم‌کانال‌ها نظیر کانکسین‌های ۲۶، ۳۲ و ۴۳ عبور کند. (۲۳)

فلوفنامیک اسید، یک آمینواسید آروماتیک است که در خانواده ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی (NSAIDs) قرار دارد و فعالیت ضدالتهابی آن در اثر مهار سیکلواکسیژناز و در نتیجه ممانعت از سنتز پروستاگلاندین‌ها از آراشیدونیک اسید رخ می‌دهد. فلوفنامیک اسید کانال‌های ۴۳ را مهار می‌کند (۳۵) و بازدارنده‌ی گپ‌جانکشن‌ها است ولی همچنان مکانیسم دقیق عمل این دارو در مهار کردن کانال‌های بین سلولی نامشخص است. (۱۷). تحقیقات نشان می‌دهند که اثرگذاری فنا‌مات‌ها به دلیل اتصال به محل تنظیم فرکانس‌هایی است که موجب بسته شدن کانال‌ها می‌شود، به همین دلیل، تأثیر فنا‌مات‌ها و مشتقاتش محدود به گپ‌جانکشن‌های خاصی است (۳۶). Leybaert و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از پپتیدهای وابسته به کانکسین در سلول‌های اندوتلیال نشان دادند

ترتیب این نوار هم شامل بخش‌های حاشیه‌ای و مرکزی زخم و هم شامل نواحی سالم مجاور لبه زخم بود. نمونه‌ها ۷۲ ساعت در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد و پس از ثبوت، جهت عمل‌آوری در دستگاه هیستوکینت قرار گرفتند. پس از قالب‌گیری توسط پارافین، برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرون از آن‌ها تهیه و متعاقب رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین و اتوزین و ماسون تری کروم توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. از هر نمونه ۵ اسلاید و در هر اسلاید ۵ منطقه غیر هم‌پوشاننده به صورت تصادفی انتخاب و بررسی گردیدند. درجه‌بندی زخم‌ها براساس روش نیمه کمی و مطابق جدول ۱ انجام شد (۱۲).

تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت پذیرفت. داده‌های رتبه‌ای در پارامترهای اپیتیلیزاسیون، فیبروبلاست، آنژیوژنز و کلاژن توسط آزمون کروسکال والیس و آزمون من ویتنی در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ با هم مقایسه گردید. همچنین داده‌های مربوط به سطح زخم نیز با استفاده از آزمون One-Way-ANOVA و تست تکمیلی Tukey در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ با هم مقایسه گردید.

سلول‌های التهابی - (-): عدم حضور سلول‌های التهابی

(خفیف): حضور سلول‌های التهابی در دو میدان میکروسکوپی

(متوسط): حضور سلول‌های التهابی در سه تا پنج میدان

میکروسکوپی

(زیاد): حضور سلول‌های التهابی در بیش از پنج میدان میکروسکوپی

آنژیوژنز - (-): عدم حضور عروق خونی

(خفیف): حضور صفر تا دو عروق خونی

(متوسط): حضور سه تا چهار عروق خونی

(زیاد): حضور بیش از چهار عروق خونی.

فیبروبلاستی - (-): حضور تعداد کمی فیبر کلاژن نازک همراه با

تعداد زیاد فیبروبلاست

(خفیف): حضور فیبرهای نازک کلاژن همراه با تعداد زیاد

فیبروبلاست

(متوسط): حضور فیبرهای ضخیم کلاژن همراه با تعداد زیاد

فیبروبلاست

(زیاد): حضور فراوان فیبرهای ضخیم کلاژن همراه با تعداد کمی

فیبروبلاست.

در ناحیه پشت ایجاد و پوست به‌طور کامل یا تمام ضخامت، در شرایط آسپتیک برداشته شد.

روش درمان: پس از ایجاد زخم، رت‌ها به‌صورت تصادفی به چهار گروه ده‌تایی تقسیم شدند:

گروه اول (۲ درصد): زخم ایجادشده در رت‌های این گروه توسط پماد ۲ درصد اسید فلوفنامیک (۰/۲ گرم اسید فلوفنامیک، ۶/۵ گرم وازلین و ۳/۳ گرم اوسرین) پوشانده شد و پس از قرار دادن گاز استریل بر روی آن، بانداژ گردید.

گروه دوم (۵ درصد): زخم ایجادشده در رت‌های این گروه توسط پماد ۵ درصد اسید فلوفنامیک (۰/۵ گرم اسید فلوفنامیک، ۶/۳ گرم وازلین و ۳/۲ گرم اوسرین) پوشانده و مانند گروه اول بانداژ گردید.

گروه سوم (۱۰ درصد): زخم ایجادشده در رت‌های این گروه توسط پماد ۱۰ درصد اسید فلوفنامیک (۱ گرم اسید فلوفنامیک، ۶ گرم وازلین و ۳ گرم اوسرین) پوشانده و مانند گروه اول بانداژ گردید.

گروه کنترل: زخم ایجادشده در رت‌های این گروه توسط پماد کنترل (۶/۶ گرم وازلین و ۳/۴ گرم اوسرین) پوشانده و مانند گروه اول بانداژ گردید.

از روز صفر تا ۲۱، در تمام گروه‌ها به‌صورت روزانه پانسمان رت‌ها تعویض و پماد زخم‌ها تجدید گردید.

روش تعیین درصد بهبودی زخم: در روزهای صفر، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹ و ۲۱ از سطح زخم توسط دوربین دیجیتال عکس‌برداری شد. به‌منظور بررسی روند بهبود ماکروسکوپی، با استفاده از نرم‌افزار Scion Image مساحت زخم محاسبه گردید. ایجاد زخم و اندازه‌گیری سطح آن توسط یک نفر انجام شد. میزان بهبودی بر اساس فرمول زیر به دست آمد (۸):

$$\text{درصد بهبودی} = \frac{(A_1 - A_x) * 100}{A_1}$$

$$A_i = \text{سطح زخم در روز } i \text{ م}$$

انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک: با توجه به ویژگی

ضدالتهابی دارو و امکان تعارض آن با روند التهاب و ترمیم، نیمی از رت‌های هر گروه در روز ۵ و بقیه آن‌ها در روز ۲۱ پس از ایجاد زخم، توسط اتر یوتانازین شدند. به‌منظور نمونه‌برداری از پوست، از ثلث میانی زخم، نواری به طول ۳ - ۲/۵ سانتی‌متر و عرض ۱ - ۰/۵ سانتی‌متر به‌صورت تمام ضخامت برداشته شد. بدین

جدول ۱. معیار درجه بندی زخم‌ها با روش نیمه کمی.

درجه	اپیتلیالیزاسیون	سلول التهابی	فیبروبلاست	آنژیوژنز	کلاژن
۰	ضخیم شدن لبه‌های برش	-	-	-	-
۱	مهاجرت سلول‌ها (<۵۰ درصد)	خفیف در بافت‌های مجاور	خفیف در بافت‌های مجاور	خفیف در بافت‌های زیرجلدی	حداقل در جوانه گوشتی
۲	مهاجرت سلول‌ها (≥۵۰ درصد)	خفیف در جوانه گوشتی	خفیف در جوانه گوشتی	خفیف در جوانه گوشتی	خفیف در جوانه گوشتی
۳	به هم رسیدن لبه‌های برش	متوسط در جوانه گوشتی	متوسط در جوانه گوشتی	متوسط در جوانه گوشتی	متوسط در جوانه گوشتی
۴	کراتینه شدن	زیاد در جوانه گوشتی	زیاد در جوانه گوشتی	زیاد در جوانه گوشتی	زیاد در جوانه گوشتی

جدول ۲. درجه بندی زخم‌ها از منظر فاکتورهای اپیتلیالیزاسیون، سلول‌های التهابی، حضور فیبروبلاست‌ها، آنژیوژنز و کلاژن.

		اپیتلیالیزاسیون		سلول التهابی		فیبروبلاست		آنژیوژنز		کلاژن	
		روز ۵	روز ۲۱	روز ۵	روز ۲۱	روز ۵	روز ۲۱	روز ۵	روز ۲۱	روز ۵	روز ۲۱
گروه کنترل	۱	۰	۲	۰	۰	۳	۲	۳	۲	۱	۴
	۲	۰	۲	۰	۰	۳	۲	۳	۲	۱	۴
	۳	۰	۲	۰	۰	۳	۲	۳	۲	۱	۴
	۴	۰	۲	۰	۰	۳	۱	۲	۲	۱	۴
	۵	۰	۲	۰	۰	۳	۲	۲	۲	۱	۴
گروه ۲ درصد	۱	۰	۳	۰	۰	۳	۲	۳	۱	۱	۴
	۲	۰	۳	۰	۰	۳	۱	۳	۱	۱	۴
	۳	۰	۳	۰	۰	۳	۱	۳	۲	۱	۴
	۴	۰	۳	۰	۰	۳	۲	۲	۱	۱	۴
	۵	۰	۳	۰	۰	۳	۲	۲	۱	۱	۴
گروه ۵ درصد	۱	۰	۱	۰	۰	۳	۳	۲	۳	۱	۳
	۲	۰	۱	۰	۰	۳	۳	۲	۳	۱	۳
	۳	۰	۱	۰	۰	۲	۴	۱	۴	۰	۳
	۴	۰	۱	۰	۰	۲	۴	۱	۴	۰	۳
	۵	۰	۱	۰	۰	۳	۳	۲	۳	۱	۳
گروه ۱۰ درصد	۱	۰	۰	۰	۰	۳	۴	۲	۴	۰	۲
	۲	۰	۰	۰	۰	۳	۴	۲	۴	۰	۲
	۳	۰	۰	۰	۰	۳	۴	۱	۴	۰	۲
	۴	۰	۰	۰	۰	۲	۴	۲	۴	۰	۲
	۵	۰	۰	۰	۰	۳	۴	۱	۴	۰	۲

نتایج

مساحت زخم کم‌تر شده و با گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد دارای تفاوت معنی‌دار شد ($P < 0.05$) و این اختلاف را تا پایان دوره (روز ۲۱) حفظ کرد. سطح زخم در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد بیشتر از گروه‌های کنترل و ۲ درصد بود. بین دو گروه کنترل و ۲ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (تصویر ۱).

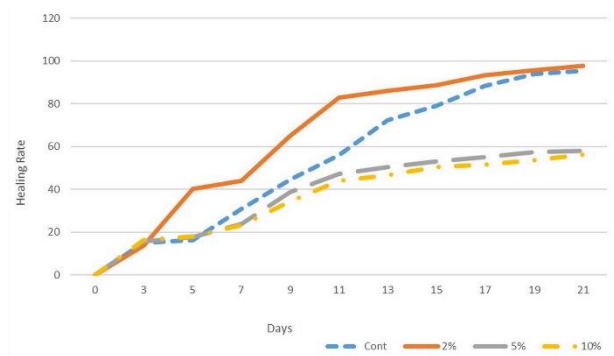
مساحت زخم در روزهای صفر، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹ و ۲۱ مساحت زخم در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری و نتایج زیر حاصل شد:
در روزهای صفر، سه و پنج اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه دیده نشد، اما از روز هفتم در دو گروه کنترل و ۲ درصد

گروه ۲ درصد اندکی بهتر از گروه کنترل بود اما این اختلاف معنی دار نبود. با این حال سرعت بسته شدن زخم و میزان بهبودی آن در گروه ۲ درصد بیشتر بوده و در مقایسه با سایر گروه‌ها، حتی گروه کنترل از روند بهتر و سریع‌تری برخوردار بود (نمودار ۱).

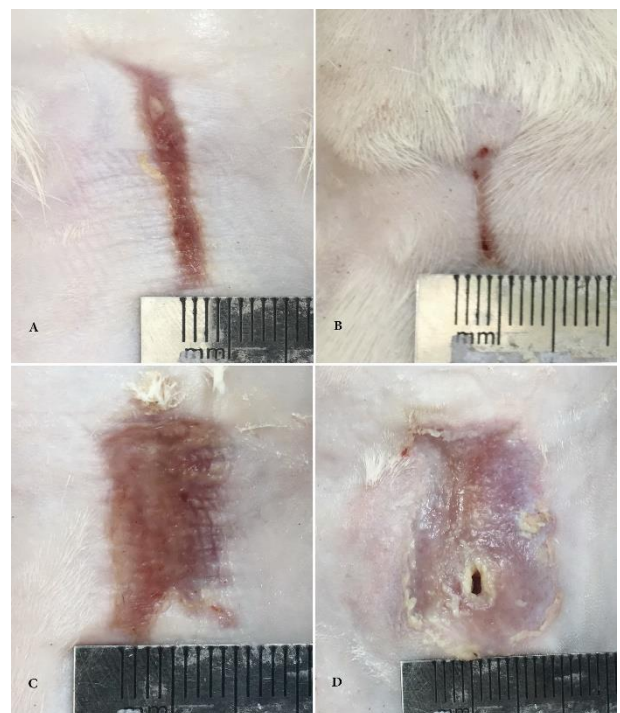
زایش بافت اپیتلیال: روند زایش بافت اپیتلیال در گروه‌های ۲ درصد، کنترل، ۵ درصد و ۱۰ درصد به ترتیب از بهترین تا بدترین وضعیت مشاهده شد. زایش بافت اپیتلیال در روز ۲۱ در گروه‌های ۲ درصد و کنترل به وقوع پیوسته و به خوبی پیشرفت کرده بود، اما در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد صورت نگرفته و بقایای لخته فیبرینی هنوز در زخم مشهود بود (تصویر ۲). در گروه ۲ درصد نسبت به سایر گروه‌ها و حتی گروه کنترل، روند زایش بافت اپیتلیال کامل‌تر صورت گرفته و این اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$). در گروه کنترل نیز زایش بافت اپیتلیال نسبت به گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد کامل‌تر انجام شده و این اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$). در گروه ۵ درصد اگرچه رشد و تکثیر کراتینوسیت‌ها بهتر از گروه ۱۰ درصد صورت گرفته بود اما روند زایش بافت اپیتلیال در هر ۲ گروه پیشرفت خوبی نداشت و بین آن‌ها اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.

فیبروبلاست‌ها: از نظر تراکم فیبروبلاست در روز پنجم بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی داری مشاهده نگردید و تقریباً در تمام گروه‌ها تراکم نسبتاً کم تا متوسطی را در جوانه گوشتی تشکیل دادند. در روز ۲۱ تراکم فیبروبلاست‌ها در دو گروه کنترل و ۲ درصد اندک بود، در حالی که در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد تراکم متوسط و زیاد فیبروبلاست‌ها در جوانه گوشتی به چشم خورد. تراکم فیبروبلاست‌ها در روز ۲۱ بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها از اختلاف معنی داری برخوردار بود ($P < 0.05$)، همچنین این تراکم در گروه ۲ درصد نیز با سایر گروه‌ها واجد اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$) اما هیچ اختلاف معنی داری بین تراکم فیبروبلاست در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد مشاهده نشد.

آنژیوژنز: در روز پنجم در هر دو گروه کنترل و ۲ درصد عروق جدید نسبتاً زیادی در جوانه گوشتی شکل گرفت اما عروق تشکیل شده در گروه ۲ درصد از وسعت بیشتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بود به گونه‌ای که این تفاوت واجد اختلاف معنی دار بود. میزان تشکیل عروق جدید در جوانه گوشتی در گروه ۲ درصد در حد متوسط و در گروه کنترل اندکی کمتر از آن مشاهده شد. این میزان در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد بسیار کمتر از گروه‌های

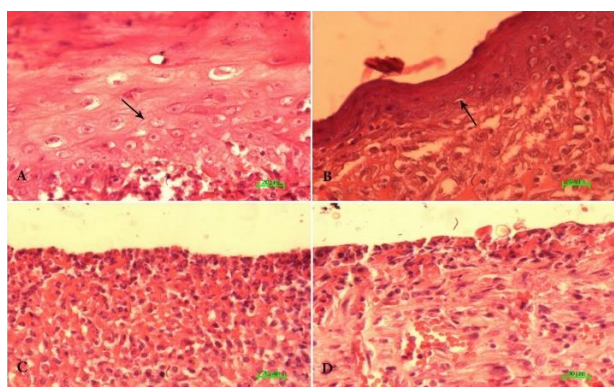


نمودار ۱. میزان بهبودی زخم در گروه‌های مورد مطالعه.

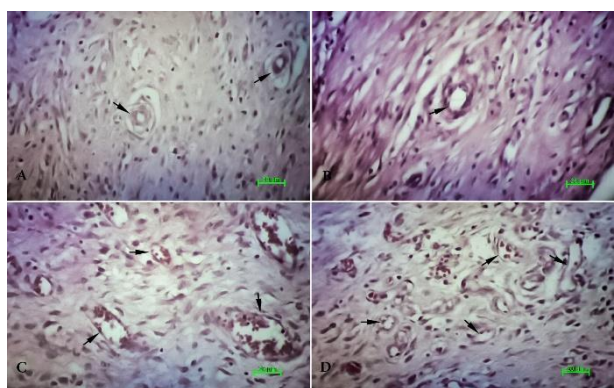


تصویر ۱. سطح زخم در روز ۲۱ ترمیم بسته شدن زخم در گروه ۲ درصد از بهترین و در گروه ۱۰ درصد از بدترین وضعیت برخوردار است. A=کنترل، B=۲ درصد، C=۵ درصد، D=۱۰ درصد.

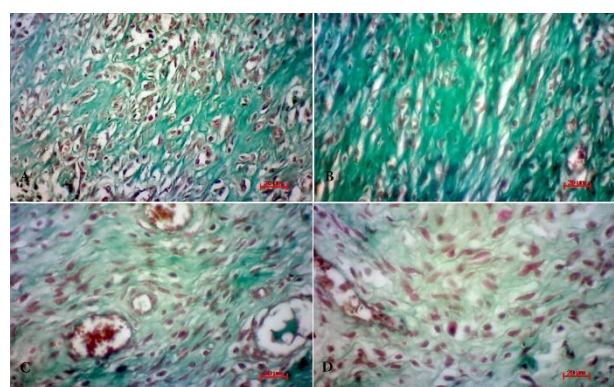
میزان بهبود زخم نیز تا روز پنجم اختلاف معنی داری را در بین گروه‌ها نشان نداد، اما از روز هفتم به بعد میزان بهبود زخم در گروه‌های کنترل و ۲ درصد در مقایسه با گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد از اختلاف معنی دار برخوردار بود. با این وجود میزان بهبود زخم در گروه ۵ درصد نسبت به ۱۰ درصد و همچنین در گروه کنترل نسبت به گروه ۲ درصد واجد اختلاف معنی دار نبود. در مجموع بسته شدن و جمع شدن لبه‌های زخم و در نتیجه میزان بهبودی زخم، در طول دوره (مدت ۲۱ روز)، در



تصویر ۲. وضعیت زایش بافت اپیتلیال در روز ۲۱ ترمیم. در دو گروه کنترل و ۲ درصد زایش بافت اپیتلیال به‌خوبی گسترش یافته و سلول‌های بافت سنگفرشی مطابق به‌خوبی شکل گرفته‌اند. در دو گروه ۵ درصد و ۱۰ درصد زایش بافت اپیتلیال صورت نگرفته و سطح زخم هنوز واجد لخته فیبرینی است. (H&E; $\times=400$) کنترل = A، B=۲ درصد، C=۵ درصد، D=۱۰ درصد، پیکان= اپیتلیوم سنگفرشی مطابق.



تصویر ۳. وضعیت عروق جدید در روز ۲۱ ترمیم. تعداد عروق از کمترین در گروه ۲ درصد تا بیشترین در گروه ۱۰ درصد متغیر است. (H&E; $\times=400$) کنترل = A، B=۲ درصد، C=۵ درصد، D=۱۰ درصد، نوک پیکان= رگ خونی.



تصویر ۴. فیبروپلازی در روز ۲۱ ترمیم. رشته‌های کلاژن در گروه ۲ درصد از بیشترین تراکم، ضخامت و نظم برخوردار است. این وضعیت در گروه کنترل اندکی ضعیف‌تر می‌شود ولی در گروه‌های ۵ و ۱۰ درصد رشته‌های کلاژن ظریف بوده و از تراکم اندکی برخوردارند. (Masson Trichrome; $\times=400$) کنترل = A، B=۲ درصد، C=۵ درصد، D=۱۰ درصد.

کنترل و ۲ درصد بود. اختلاف موجود بین گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد با هر دو گروه کنترل و ۲ درصد از نظر تشکیل عروق جدید معنی‌دار بود ($P<0/05$)، با این حال عروق جدید در جوانه گوشتی گروه ۵ درصد اگرچه بیشتر از گروه ۱۰ درصد تشکیل شد اما این اختلاف معنی‌دار نبود.

در روز ۲۱ در هر دو گروه کنترل و ۲ درصد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای از عروق موجود در جوانه گوشتی کاسته شد. میزان عروق موجود در گروه ۲ درصد کم‌تر از گروه کنترل بوده و اختلاف موجود بین این دو گروه کاملاً معنی‌دار بود ($P<0/05$). در دو گروه ۵ درصد و ۱۰ درصد حتی در روز ۲۱ عروق فراوانی در جوانه گوشتی حضور داشت و این تعداد در گروه ۱۰ درصد بیشتر از گروه ۵ درصد بود (تصویر ۳). اختلاف موجود در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد با گروه‌های کنترل و ۲ درصد از نظر تعداد عروق موجود در جوانه گوشتی کاملاً معنی‌دار بود ($P<0/05$)؛ اما بین دو گروه ۵ درصد و ۱۰ درصد تفاوت معنی‌داری از این نظر مشاهده نشد.

رشته‌های کلاژن: در روز پنجم رشته‌های کلاژن در تمام گروه‌های مورد مطالعه یا هنوز تشکیل نشده یا در کمترین مقدار خود بود؛ اما در روز ۲۱ با پیشرفت ترمیم، تراکم رشته‌های کلاژن بیشتر شده و حجم رشته‌های ضخیم کلاژن نیز افزایش یافت. در گروه‌های کنترل و ۲ درصد حجم قابل‌توجهی از کلاژن ضخیم در جوانه گوشتی دیده شد. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه از نظر حجم رشته‌های کلاژن وجود نداشت، اما نظم رشته‌ها و تشکیل دستجات ضخیم کلاژن در گروه ۲ درصد بهتر از گروه کنترل قابل‌رویت بود. تراکم رشته‌های کلاژن موجود در جوانه گوشتی در گروه ۵ درصد کمتر از کنترل و در گروه ۱۰ درصد کمتر از گروه ۵ درصد بوده و علاوه بر آن ضخامت رشته‌ها نیز با روند مشابهی در گروه ۵ درصد کمتر از کنترل و در گروه ۱۰ درصد کمتر از گروه ۵ درصد بود (تصویر ۴). این اختلاف اگرچه بین دو گروه ۵ درصد و ۱۰ درصد معنی‌دار نبود، اما بین گروه‌های کنترل و ۲ درصد با گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<0/05$). از منظر کیفی نیز رشته‌های کلاژن موجود در جوانه گوشتی در گروه‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد بسیار نامنظم بوده و درجات متفاوتی از رشته‌های نازک تا نسبتاً ضخیم را شامل می‌گردید که با پراکندگی ضعیف تا متوسط در جوانه گوشتی قابل‌رویت بود.

بحث

اپیتلیال مجدد و بسته شدن زخم در این موش‌ها بهتر صورت می‌گیرد (۷). فلوفنامیک اسید دارویی است که کانکسین ۴۳ را مهار می‌کند (۲۷،۳۵) بنابراین انتظار می‌رود گروه‌های تحت درمان با این دارو از روند زایش بافت اپیتلیال بهتری برخوردار باشند زیرا به نظر می‌رسد که کاهش کانکسین ۴۳ در لبه زخم مهاجرت سلولی را تحریک کرده و برای پرولیفراسیون و مهاجرت کراتینوسیت‌ها در التیام زخم ضروری است (۲۷) به‌علاوه مشخص شده که در رت‌های دیابتی تا زمانی که تعداد این کانکسین کاهش نیابد روند زایش بافت اپیتلیال و مهاجرت کراتینوسیت‌ها آغاز نمی‌شود (۲).

برخلاف انتظار در گروه‌های ۵ و ۱۰ درصد نه‌تنها روند زایش بافت اپیتلیال پیشرفت نکرده بود بلکه در همان مراحل اولیه باقی‌مانده بود اما این روند در گروه ۲ درصد به‌خوبی و بسیار کامل‌تر از سایر گروه‌ها انجام شده بود. فلوفنامیک اسید یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی است که با مهار متابولیسم سیکلواکسیژناز، تولید پروستاگلندین را در بافت ملتهب، کند یا متوقف می‌سازد (۱۸). به‌علاوه با مهار کانال کانکسین مانع از آزاد شدن ATP به خارج سلول می‌شود (۳۱). از طرفی التهاب یکی از مراحل ضروری در فرآیند ترمیم زخم می‌باشد که طی آن نفوذ نوتروفیل‌ها، نفوذ مونوسیت‌ها و تبدیل شدن به ماکروفاژ و نهایتاً نفوذ لنفوسیت‌ها به زخم و بافت‌های مجاور صورت می‌گیرد (۱۸). با افزایش ماکروفاژها تشکیل بافت گرانوله نیز آغاز می‌گردد. بر اساس گزارش‌های موجود استفاده از داروهای ضدالتهاب، ترمیم را در جراحات پوستی مختل می‌کند. ترمیم جراحات اگرچه در غیاب نوتروفیل‌ها می‌تواند صورت بگیرد اما در فقدان ماکروفاژها کاملاً مختل می‌شود (۲۸).

به نظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد باعث گردیده تأثیرات ضدالتهابی دارو تشدید و روند زایش بافت اپیتلیال مختل گردد. احتمالاً اثرات ضدالتهابی دارو در همان مراحل اولیه ترمیم زخم، نفوذ نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها را به زخم کاهش داده و متعاقب آن کاهش ماکروفاژها را نیز در پی داشته است. اگرچه Chang و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که NSAIDها بر روی عملکرد و فعالیت $TGF-\beta$ تأثیر قابل ملاحظه‌ای ندارد (۵) اما به نظر می‌رسد اثر ضدالتهابی این دارو با کاهش ماکروفاژها میزان تولید $TGF-\beta$ را کاهش داده و به‌این ترتیب مهاجرت کراتینوسیت‌ها و روند زایش بافت اپیتلیال را مختل می‌نماید. در غلظت پایین فلوفنامیک اسید (۲ درصد)، اثرات ضدالتهابی دارو ناچیز بوده و نفوذ سلول‌های آماسی را به محل زخم تحت تأثیر قرار نمی‌دهد اما همین غلظت اندک دارو برای مهار

مساحت زخم در هر دو گروه کنترل و ۲ درصد به نحو چشمگیری نسبت به دو گروه دیگر کم‌تر بود که از روز هفتم تسریع شد و تا پایان دوره ادامه داشت. به‌منظور بسته شدن سطح زخم، بافت اسکار کوچکی از لبه‌های زخم به سمت مرکز گسترش می‌یابد و با حرکتی جاذب به مرکز، سطح زخم را مسدود می‌کند (۱۰). فاز پرولیفراسیون در روند ترمیم شامل آنژیوژنز، رسوب کلاژن، شکل‌گیری بافت گرانوله، رشد سلولی و انقباض زخم است. در فیبروپلازی و تشکیل بافت گرانوله فیبروبلاست‌ها تکثیر می‌یابند و با تولید کلاژن و فیبرونکتین، یک ماتریکس خارج سلولی موقت پدید می‌آورند (۱۸،۱۰). با تکمیل زایش بافت اپیتلیال، سلول‌های اپیدرمی تمایز مجدد پیدا کرده و فنوتیپ اپیتلیالی خود را به دست می‌آورند و کلاژن نیز بستری را برای مهاجرت سلول‌ها پدید می‌آورد (۳۶). میوفیبروبلاست‌ها بیشترین سلول‌های موجود در بافت گرانولاسیون بالغ بوده و با اتصال به لبه‌های زخم مسئول انقباض زخم هستند (۱۰،۱۰). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۰، با مطالعه بر روی زخم‌هایی با شرایط ایسکمیک نشان دادند که استفاده از لیزوزوم‌های حاوی ATP سبب افزایش زایش بافت اپیتلیال می‌گردد (۳۵). Ghatnekar و همکاران در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۴ نشان دادند که ACT1 می‌تواند منجر به کاهش عملکرد کانکسین ۴۳، افزایش پرولیفراسیون فیبروبلاست‌ها، افزایش کشش پوستی و تسریع روند التیام گردد (۱۴،۱۵). در مقابل گزارشات Dvivedi و همکاران در سال ۱۹۹۷ و Krischak و همکاران در سال ۲۰۰۷ حاکی از آن است که NSAIDها سبب کاهش کشش زخم و کاهش میزان فیبروبلاست‌ها در بافت همبند شده و اثر ضدپرولیفراتیو دارند (۹،۲۵).

در گروه ۲ درصد به علت انسداد کانال‌های کانکسین و افزایش فیبروبلاست‌ها، فرایند انقباض زخم و جمع شدن لبه‌های زخم بهتر از سایر گروه‌ها به وقوع پیوست، درحالی‌که در دو گروه ۵ و ۱۰ درصد به علت اختلال در فاز التهابی ترمیم و متعاقب آن ممانعت از تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌ها، مکانیسم‌های مشروحه مختل شده و انقباض زخم، روند بسیار آهسته را طی کرد.

همان‌گونه که در قسمت نتایج بیان شد، در دو گروه کنترل و ۲ درصد روند زایش بافت اپیتلیال نسبت به سایر گروه‌ها از پیشرفت بهتری برخوردار بوده به طوری که بافت پوششی از لبه زخم به هم رسیده و اپیدرم را در سطح زخم گسترش داده بود. Cogliati و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مطالعه بر روی موش‌هایی که به‌صورت ژنتیکی دچار نقص کانکسین ۴۳ بودند گزارش کردند که زایش بافت

فرآيند ترميم را طولاني کرده و پس از ۲۱ روز، زخم‌ها هنوز در مرحله بافت گرانوله باقي ماندند.

در روز ۲۱ در دو گروه کنترل و ۲ درصد تراکم فيبروبلاست اندک بوده و حجم قابل توجهي از رشته‌هاي ضخيم کلاژن در بافت گرانوله حضور داشت اما در دو گروه ۵ و ۱۰ درصد، تراکم متوسط و زياد فيبروبلاست‌ها به چشم خورد و حجم رشته‌هاي کلاژن در بافت گرانوله اگرچه نسبتاً زياد بود اما رشته‌ها در مقايسه با دو گروه ديگر نازک‌تر، پراکنده‌تر و نامنظم‌تر بودند و تراکم رشته‌هاي ضخيم کلاژن در آن‌ها بسيار کم بود.

کلاژن اصلي‌ترين پروتئين ماتريکس خارج سلولي است که در پستانداران ۷۰ تا ۸۰ درصد پروتئين‌هاي پوست را شامل مي‌شود و کلاژن‌هاي نوع I، II و III اصلي‌ترين انواع آن به شمار مي‌روند که در ترميم زخم شرکت دارند (۳). فيبروبلاست‌ها اصلي‌ترين سلول مستقر در بافت همبند هستند که سنتز و ترشح ترکيبات بافت همبند و مولکول‌هاي پيش‌ساز انواع مختلف کلاژن و فيبرهاي الاستيک را بر عهده دارند (۳،۲۸). فيبروبلاست‌ها متعاقب پروليفراسيون و مهاجرت، به ماتريکس موقت فيبرين وارد شده و آن را توسط ماتريکس خارج سلولي (ECM) جايگزين مي‌کنند. $TGF-\beta$ حاصل از ماکروفاژها تکثير فيبروبلاست‌ها را تحريك مي‌کند (۲۸). Cogliati و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که کانکسين‌هاي مهار شده مي‌توانند تکثير و فعاليت فيبروبلاست‌ها را در زخم افزايش دهند (۷). Chiang و همکاران در سال ۲۰۰۷ نيز نشان دادند که استفاده از لپپوزوم‌هاي حاوي ATP مي‌تواند اثر مشابهي را در ترميم زخم بروز دهد (۶). از طرفي مطالعاتي نظير بررسي‌هاي Krischak و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Guo و DiPietro در سال ۲۰۱۰ بيان گر آن است که NSAID ها ميزان فيبروبلاست‌ها را در بافت همبند کاهش مي‌دهند و روند التيام زخم را با اختلال مواجهه مي‌سازند (۱۸،۲۵).

با عنايت به نتايج حاصل از اين مطالعه به نظر مي‌رسد غلظت ۲ درصد فلوپناميك اسيد با انسداد کانال‌هاي کانکسين و حفظ ATP سلول نقش مثبتی در تکثير و مهاجرت فيبروبلاست‌ها داشته و متعاقباً رسوب بيشتري و بهتر کلاژن را به دنبال داشته است. غلظت‌هاي ۵ درصد و ۱۰ درصد دارو با اختلال در فاز التهابي و کاهش سلول‌هاي التهابي، فرآيند ترميم را به تعويق انداخته، تکثير و مهاجرت فيبروبلاست‌ها را تقليل داده و با تأخير مواجهه ساخته و درنتيجه رسوب کلاژن نيز مطلوب نبوده است.

در مجموع مي‌توان گفت که فلوپناميك اسيد دارويي است که

کانکسين ۴۳ و جلوگيري از اتلاف ATP کافي است به همين علت روند زايش بافت اپيتيلال در گروهی که غلظت ۲ درصد دارو را دريافت نموده بود نسبت به ساير گروه‌ها بهتر صورت گرفته و از اختلاف معنی‌داري برخوردار بود.

در روز پنجم در تمام گروه‌هاي مورد مطالعه، عروق جديدي در جوانه گوشتي شکل گرفت. در روز ۲۱ تراکم عروق جديدي در هر دو گروه کنترل و ۲ درصد به‌طور قابل ملاحظه‌اي کاهش پيدا کرد اما در گروه‌هاي ۵ و ۱۰ درصد هنوز عروق فراواني در جوانه گوشتي حضور داشت. آنژیوژنز بخش ضروري ترميم است که با ايجاد جريان خون در محل آسیب، نكروز ايسکميک را محدود کرده، ذخيره اکسيژن بافت، تغذيه و رشد سلول را تأمين نموده و با افزايش ميزان متابوليسم، سنتز، تقسيم و مهاجرت سلولي را افزايش مي‌دهد. بعلاوه افزايش خون‌رسانی و تغذيه کافي ميزان سنتز پروتئين را در فيبروبلاست‌ها که مسئول توليد کلاژن هستند گسترش مي‌دهد و منجر به افزايش سرعت ترميم مي‌گردد (۲۰). Chiang و همکاران در سال ۲۰۰۷، Wang و همکاران در سال ۲۰۱۰ و Howard و همکاران نيز در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که ATP با افزايش آنژیوژنز، سرعت توليد بافت گرانوله را افزايش داده و ترميم زخم را تسريع مي‌کند (۶،۲۱،۳۵).

مطالعات موجود در زمينه NSAID ها و نقش آن‌ها در آنژیوژنز، نتايج متفاوتی را ارائه نموده است. برخي نظير Ge و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که فلوپناميك اسيد قادر به تحريك آنژیوژنز مي‌باشد (۱۳). از طرفي مطالعات انجام شده توسط Jones و همکاران در سال ۱۹۹۹، Tarnawski و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Pai و همکاران در سال ۲۰۰۰ نيز حاکی از ممانعت NSAID ها از آنژیوژنز مي‌باشند. (۲۲،۳۰،۳۴)؛ اما آنچه اخيراً به اثبات رسيده، اين است که مکانيسم اثر NSAID هاي مختلف بر آنژیوژنز و ترميم زخم متفاوت است. اغلب NSAID ها در محدوده دوز طبيعي خود، تأثير ناچيزي بر آنژیوژنز دارند، درحالي که در مقادير زياد مي‌توانند مهاجرت و تکثير سلول‌ها را مهار کرده و حتي منجر به مرگ سلول شوند (۲۹).

با توجه به مطالب ذکر شده و نتايج حاصل از اين مطالعه مي‌توان اظهار داشت که داروي فلوپناميك اسيد در غلظت‌هاي کم (۲ درصد) با مهار کانکسين‌ها و حفظ ATP سلولي، فرآيند ترميم زخم، از جمله آنژیوژنز را سرعت بخشیده و حتي در مقايسه با گروه کنترل نتايج بهتري را نشان داد. به نظر مي‌رسد حتي غلظت‌هاي ۵ درصد و ۱۰ درصد دارو نيز فرآيند آنژیوژنز را مختل نکرده بلکه

روند ترمیم زخم‌های دیابتی را تسریع می‌نماید و اثرات ضدالتهابی آن مانع از بهبود ترمیم نمی‌شود؛ اما غلظت‌های زیاد دارو نه تنها روند ترمیم را در زخم‌های دیابتی بهبود نمی‌بخشد، بلکه با تداخل در مرحله التهابی، منجر به تأخیر در فرآیند ترمیم می‌گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین دانشگاه سمنان جهت فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این پژوهش و از آقای مرتضی صابری و حسن تقی‌زاده جهت همکاری در امور آزمایشگاهی این پژوهش صمیمانه تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

از یک طرف دارای اثرات ضدالتهابی است و از طرفی قادر به مهار کردن کانال‌های کانکسین و حفظ ATP است. این دو خصوصیت در ترمیم زخم خصوصاً زخم‌های دیابتی که میزان کانال‌های کانکسین ۴۳ درم افزایش یافته و در نتیجه با نشت زیاد ATP مواجه هستیم، اثرات متفاوت و متضادی را بروز می‌دهند. مهار کردن کانال‌های کانکسین می‌تواند منجر به تسریع در فرآیند ترمیم زخم شود در حالی که اثرات ضدالتهابی دارو با اختلال در فاز التهابی مانع از هجوم سلول‌های التهابی به زخم شده و متعاقباً فاکتورهای رشد لازم برای ادامه روند ترمیم به مقدار کافی تولید نشده و فرآیند ترمیم مختل شده و یا به تعویق می‌افتد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داروی فلوفنایمیک اسید در غلظت‌های کم، با مهار کانال‌های کانکسین و حفظ ATP،

References

- Atala, A., Irvine, D.J., Moses, M., Shaunak, S. (2010). Wound healing versus regeneration: Role of the tissue environment in regenerative medicine. *MRS bulletin*, 35, 597-606. <https://doi.org/10.1557/mrs2010.528> PMID: 24241586
- Becker, D.L., Thrasyvoulou, C., Phillips, A.R. (2012). Connexins in wound healing; perspectives in diabetic patients. *Biochim Biophys Acta (BBA-Biomembranes)*, 1818(8), 2068-2075. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2011.11.017> PMID: 22155211
- Brett, D. (2008). A review of collagen and collagen based wound dressings. *Wounds*, 20(12), 347-356. PMID: 25941895
- Chakravarthy, B.K., Gupta, S., Gode, K.D. (1982). Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan induced diabetic rats by epicatechin. *Life Sciences*, 31(24), 2693-2697. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90713-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90713-5) PMID: 6759833
- Chang, J.K., Wang, G.J., Chuang, L.Y., Ho, M.L. (2003). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on transforming growth factor- β expression and bioactivity in rat osteoblast enriched cultures. *Kaohsiung J Med Sci*, 19(6), 278-287. [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70474-7](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70474-7) PMID: 12873036
- Chiang, B., Essick, E., Ehringer, W., Murphree, S., Hauck, M.A., Chien, S. (2007). Enhancing skin wound healing by direct delivery of intracellular adenosine triphosphate. *Am J Surg*, 193(2), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2006.08.069> PMID: 17236849
- Cogliati, B., Vinken, M., Silva, T.C., Araujo, C.M.M., Aloia, T.P.A., Chaible, L.M., Mori, C.M.C., Dagli, M.L.Z. (2015). Connexin 43 deficiency accelerates skin wound healing and extracellular matrix remodeling in mice. *J Dermatol Sci*, 79(1), 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.03.019> PMID: 25900674
- Dill, R.E., Iacopino, A.M. (1997). Myofibroblasts in phenytoin- induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *J periodontol*, 68(4), 375-380. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.4.375> PMID: 9150043
- Dvivedi, S., Tiwari, S.M., Sharma, A. (1997). Effect of ibuprofen and diclofenac sodium on experimental wound healing. *Indian J Exp Biol*, 35(11), 1243-1245. PMID: 9567757
- Ehrlich, H.P., Hunt, T.K. (2012). Collagen organization critical role in wound contraction. *Adv Wound Care*, 1(1), 3-9. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0311> PMID: 24527271
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 366(9498), 1736-1743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67700-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67700-8) PMID: 16291068
- Gal, P., Kilik, R., Mokry, M., Vidinsky, B., Vasilenko, T., Mozes, S., Lenhardt, L. (2008). Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Vet Med*, 53(12), 652-659. <https://doi.org/10.17221/1973-VETMED>
- Ge, R., Hu, L., Tai, Y., Xue, F., Yuan, L., Wei, G., Wang, Y. (2013). Flufenamic acid promotes angiogenesis through AMPK activation. *Int J Oncol*, 42(6), 1945-1950. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1891> PMID: 23589027
- Ghatnekar, G.S., Grek, C.L., Armstrong, D.G., Desai, S.C., Gourdie, R.G. (2015). The effect of a connexin43-based Peptide on the healing of chronic venous leg ulcers: a multicenter, randomized trial. *J Invest Dermatol*, 135(1), 289-298. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.318> PMID: 25072595
- Ghatnekar, G.S., O'Quinn, M.P., Jourdan, L.J., Gurjarpadhye, A.A., Draughn, R.L., Gourdie, R.G. (2009). Connexin43 carboxyl-terminal peptides reduce scar progenitor and promote regenerative healing following skin wounding. *Regen Med*, 4(2), 205-223. <https://doi.org/10.2217/17460751.4.2.205> PMID: 19317641
- Grek, C., Rhet, J.M., Abt, M., Bruce, J., Ghatnekar, G., Yeh, E.S. (2015). Targeting connexin 43 with α -connexin carboxyl-terminal (ACT1) peptide in breast cancer. *Am Assoc Cancer Res*, 75(15), 4358. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-4358>

17. Guinamard, R., Simard, C., Del Negro, C. (2013). Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther*, 138(2), 272-284. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.012> PMID: [23356979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23356979/)
18. Guo, S.A., DiPietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, 89(3), 219-229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
19. Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol Biol*, 94(1), 120-143. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011>
20. Hoseini Sanati, M., Torkaman, G. (2011). The effective mechanisms of low level laser therapy on wound healing. *Offic J Iran Cent Med Laser*, 8(3), 34-41.
21. Howard, J.D., Sarojini, H., Wan, R., Chien, S. (2014). Rapid granulation tissue regeneration by intracellular ATP delivery- A comparison with Regranex. *PLoS One*, 9(3), e91787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091787> PMID: [24637626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24637626/)
22. Jones, M.K., Wang, H., Peskar, B.M., Levin, E., Itani, R.M., Sarfeh, I.J., Tarnawski, A.S. (1999). Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med*, 5(12), 1418-1423. <https://doi.org/10.1038/70995> PMID: [10581086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10581086/)
23. Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci*, 28(18), 4702-4711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008> PMID: [18448647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18448647/)
24. Kretz, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., Ott, T. (2003). Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Sci*, 116(16), 3443-3452. <https://doi.org/10.1242/jcs.00638> PMID: [12840073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12840073/)
25. Krischak, G.D., Augat, P., Claes, L., Kinzl, L., Beck, A. (2007). The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. *J Wound Care*, 16(2), 76-78. <https://doi.org/10.12968/jowc.2007.16.2.27001> PMID: [17319622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17319622/)
26. Leybaert, L., Braet, K., Vandamme, W., Cabooter, L., Martin, P.E., Evans, W.H. (2003). Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release. *Cell Commun Adhes*, 10(4-6), 251-257. <https://doi.org/10.1080/cac.10.4-6.251.257> PMID: [14681025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14681025/)
27. Lorraine, C., Wright, C.S., Martin, P.E. (2015). Connexin43 plays diverse roles in co-ordinating cell migration and wound closure events. *Biochem Soc Trans*, 43(3), 482-488. <https://doi.org/10.1042/BST20150034> PMID: [26009195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26009195/)
28. Malekmohammadi, M., Tehrani, H.A., Aghdami, N. (2011). Skin structure and wound healing phase. *J Dermatol Cosm*, 2(4), 229-244.
29. Mojid Mondol, M.A. (2006). Antiangiogenic Study of Two Nonsteroidal Anti-inflammatory Compounds Using Chick Chorioallantoic Membrane Assay. *J Med Sci*, 6, 609-614. <https://doi.org/10.3923/jms.2006.609.614>
30. Pai, R., Szabo, I.L., Kawanaka, H., Soreghan, B.A., Jones, M.K., Tarnawski, A.S. (2000). Indomethacin Inhibits Endothelial Cell Proliferation by Suppressing Cell Cycle Proteins and PRB Phosphorylation: A Key to Its Antiangiogenic Action? *Mol Cell Biol Res Commun*, 4, 111-116. <https://doi.org/10.1006/mcbr.2000.0260> PMID: [11170841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11170841/)
31. Sáez, J.C., Retamal, M.A., Basilio, D., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*, 1711(2), 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2005.01.014> PMID: [15955306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955306/)
32. Srinivas, M. (2009). Pharmacology of connexin channels. In: *Connexins A Guide*. Harris, A., Lock, D. (1st ed.). Springer Nature. Humana Press. p. 207-224.
33. Sullivan, R., Ruangvoravat, C., Joo, D., Morgan, J., Wang, B.L., Wang, X.K., Lo, C.W. (1993). Structure, sequence and expression of the mouse Cx43 gene encoding connexin 43. *Gene*, 130(2), 191-199. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90419-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90419-4) PMID: [8395450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395450/)
34. Tarnawski, A.S., Jones, M.K. (2003). Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Med*, 81, 627-636. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0479-y> PMID: [13679997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13679997/)
35. Wang, J., Wan, R., Mo, Y., Li, M., Zhang, Q., Chien, S. (2010). Intracellular delivery of adenosine triphosphate enhanced healing process in full-thickness skin wounds in diabetic rabbits. *Am J Surg*, 199, 823-832. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2009.05.040> PMID: [20609726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20609726/)
36. Yetes, C.C., Hebda, P., Wells, A. (2012). Skin wound healing and scarring: Fetal wounds and regenerative restitution. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 96, 325-333. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21024> PMID: [24203921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24203921/)

**Effect of Flufenamic Acid as Connexin Inhibitor on Diabetic Wound Healing**Aysan Fotowat¹, Seyed Javad Ahmadpanahi², Ebrahim Shahroozian³, Farzad Hayati⁴, Sahar Ghaffari Khaligh⁵¹Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran²Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran³Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran⁴Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran⁵Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Irandoi [10.22059/jvr.2019.250965.2757](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.250965.2757)

Received 22 July 2019, Accepted 12 October 2019

Abstract**BACKGROUND:** Flufenamic acid is a member of the fenamates and is used as an analgesic and NSAID drug. According to the ability of this drug on blocking connexin and preventing leakage of substances such as ATP from cells, it seems to be beneficial in healing diabetic wounds.**OBJECTIVES:** Evaluation of the effects of topical flufenamic acid as a connexin-channel blocker on skin wound healing in alloxan-induced diabetic rats.**METHODS:** In this study diabetics was induced in 40 male rats by IP injection of 150mg/kg of alloxan and they were divided to 4 groups. After anesthesia, 2×2 cm incision was made on the back of the rats and the skin was separated completely. Three groups were treated by 2, 5 and 10 percent concentration of flufenamic acid ointment separately, and one group was treated by Vaseline and ucerine ointment as control. Bandage and ointment were changed daily and the procedure was carried out for 21 days. The wound surface was measured on odd days. Half of the rats of each group on day five and half of them on day 21 were euthanized to get pathologic slides.**RESULTS:** Process of healing, fibroblast concentration, epithelialization, angiogenesis, collagen formation and wound closure in 2 percent group were better than other groups and in control, 5 and 10 percent groups had a decreasing trend respectively and had a significant difference. In the last two groups, the healing process was disrupted.**CONCLUSIONS:** The 2 percent concentration of drug not only did not show potent anti-inflammatory effects, but also improved the process of healing by blocking the connexin 43 and inhibition of ATP release, while in the concentration of 5 and 10 percent, anti-inflammatory effects of the drug predominated and delayed the healing process.**Keywords:** Connexin, Flufenamic acid, Wound healing, Diabetes, Rat

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: j_panahi@semnan.ac.ir Tel/Fax: 023-31533616 / 023-33664894**How to cite this article:**Fotowat, A., Ahmadpanahi, S., Shahroozian, E., Hayati, F., Ghaffari Khaligh, S. (2020). Effect of Flufenamic Acid as Connexin Inhibitor on Diabetic Wound Healing, J Vet Res, 75(1), 98-108. <https://doi.org/10.22059/jvr.2019.250965.2757>**Figure Legends and Table Captions****Figure 1.** Wound surface on the 21st day of healing. Wound closure is best in the 2% and the worst in the 10% groups.**Figure 2.** Epithelialization on the 21st day of healing. Epithelialization is well developed in both control and 2% groups and squamous cells are formed. There was no epithelialization in 5% and 10% groups and the surface of the wound still has a fibrin clot. (H&E. ×=400). A= control, B= 2%, C= 5%, D= 10%, Arrow = Squamous stratified epithelium.**Figure 3.** Condition of the new vessels on the 21st day of healing. The number of vessels varies from the lowest in the 2% to the most in the 10% group. (H&E. ×=400). A= control, B= 2%, C= 5%, D= 10%, Arrow head= Blood vessel.**Figure 4.** Fibroplasia on the 21st day of healing. Collagen fibers have the highest density, thickness and arrangement in the 2% group. This situation is slightly weaker in the control group but the collagen fibers are thin and have a low density in groups of 5% and 10%. (Masson Trichrome. ×=400). A= control, B= 2%, C= 5%, D= 10%.**Diagram 1.** The rate of wound healing in the studied groups.