



Original Research Paper

Study the effect of day and night on skin wound healing

*Nematollah Ebrahimi*¹, *Aboutorab Tabatabaei Naeini*^{1*}, *Marjan Chahardah Cherik*², *Mahnaz Taherianfard*³, *Mansour Sayyari*⁴

¹ Department of Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

² Biochemist, Private Sector, Shiraz, Iran

³ Department of Basic Science, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

⁴ Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Key Words

Rat wound model
Wound healing rate
Daytime wounds
Nighttime wounds
Healing rate

Abstract

Introduction: The skin is a complex structure and has three layers (epidermis, dermis and hypodermis). The skin has different cell types such as Langerhans cells, keratinocytes and etc. The skin is the first layer of the body's defense and protects the body against external factors (such as chemicals, physical damage and etc). The wound healing process begins following any damage to the skin. Wound healing consists of four stages (inflammation, debridement, proliferation and maturation). Wound healing is affected by many factors, including the circadian rhythm. In this regard, circadian rhythm is a biological process that follows a 24-hour cycle and affects the skin cells and other body organs. The aim of the present study was to compare the speed of wound healing during days and nights.

Materials & Methods: Forty male Sprague-Dawley rats were prepared and kept at a constant temperature, light (12 hours light / 12 hours dark) and proper nutrition. Rats were randomly selected and divided into groups A and B. In group A, ulcers were created at 8-10 am and in group B, ulcers were created at 11-9 pm. Evaluation of results based on daily measurement of wound surface (by Digimizer program) immediately after wound creation and (3, 7, 10, 14 and 21 days after wound creation) to determine the rate of clinical healing and biochemical test (hydroxyproline assay) were performed to compare the rate of wound healing on the 10th and 21st day of the study on skin samples in both groups.

Result: Hydroxyproline level was markedly increased on day 21 in group A as compared to group B. Measurements of wound dimensions and the healing process showed a significant increase on day 21 in group A in comparison with group B.

Conclusion: The results of the present study show that daytime wounds creation healing faster than nighttime wounds creation.

* Corresponding Author's email: taba61342@gmail.com

Received: 1 October 2021; Reviewed: 3 November 2021; Revised: 5 January 2022; Accepted: 3 February 2022

(DOI): [10.22034/AEJ.2022.325523.2738](https://doi.org/10.22034/AEJ.2022.325523.2738)

مقاله پژوهشی

مطالعه تاثیر روز و شب بر التیام زخم‌های جلدی

نعمت‌الله ابراهیمی^۱، ابوتراب طباطبایی نائینی^{۱*}، مرجان چهارده‌چریک^۲، مهناز طاهریان‌فرد^۳، منصور سیاری^۴

^۱ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۲ بیوشیمیست، بخش خصوصی، شیراز، ایران

^۳ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۴ گروه علوم پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده	کلمات کلیدی
<p>مقدمه: پوست ساختاری پیچیده با سه لایه (اپیدرم، درم، هیپودرم) و انواع مختلف سلولی نظیر کراتینوسیت سلول‌های لانگرهانس و غیره می‌باشد. پوست به‌عنوان اولین سد دفاعی بدن، محافظت از بدن در برابر عوامل خارجی (نظیر مواد شیمیایی، آسیب‌های فیزیکی و...) را برعهده دارد. فرآیند ترمیم زخم به‌دنبال هرگونه آسیب به پوست آغاز می‌گردد. ترمیم زخم شامل چهار مرحله التهابی، پاک‌سازی، تکثیر و بلوغ می‌باشد. ترمیم زخم تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد که در این راستا ریتم شبانه‌روزی نیز مطرح است. ریتم شبانه‌روزی یک فرآیند بیولوژیکی است که از یک چرخه ۲۴ ساعته پیروی نموده و فعالیت سلول‌های پوست و سایر ارگان‌های بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعه حاضر با هدف مقایسه سرعت بهبود زخم در طول روز و شب انجام گردید.</p> <p>مواد و روش‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley تهیه و در شرایط دما، نور (۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی) و تغذیه مناسب نگهداری، به‌صورت تصادفی انتخاب و به گروه‌های A و B تقسیم شدند. در گروه A زخم‌ها در ساعت ۸-۱۰ صبح و در گروه B زخم‌ها در ساعت ۹-۱۱ شب ایجاد شدند. ارزیابی نتایج براساس اندازه‌گیری روزانه سطح زخم (توسط برنامه Digimizer)، بلافاصله پس از ایجاد زخم و (در روزهای ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از ایجاد زخم) جهت تعیین میزان بهبودی بالینی و ارزیابی بیوشیمیایی (اندازه‌گیری میزان هیدروکسی‌پرولین) جهت مقایسه میزان بهبود زخم به‌ترتیب در روز ۱۰ و ۲۱ مطالعه بر روی نمونه‌های پوست در هر دو گروه صورت پذیرفت.</p> <p>نتایج: میزان هیدروکسی‌پرولین در روز ۲۱ در گروه A نسبت به گروه B به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته بود. اندازه‌گیری ابعاد زخم و روند بهبودی، افزایش معنی‌داری را در زخم‌های ایجاد شده در گروه A در روز ۲۱ نشان دادند.</p> <p>بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد زخم‌های ایجاد شده در روز سریع‌تر از زخم‌های ایجاد شده در شب بهبود یافته‌اند.</p>	<p>مدل زخم موش میزان بهبود زخم زخم‌های روز زخم‌های شب سرعت ترمیم</p>

مقدمه

قرار می‌گیرند) می‌باشند (۲۳) و نیاز به این دو فاکتور، بعد از تولد نسبت به قبل از تولد و سایر فعایت‌های متابولیکی و ترمیمی شدیداً افزایش می‌یابد (۲۴، ۲۵). مرحله بلوغ در حدود ۲۰ روز پس از آسیب شروع و می‌تواند ماه‌ها یا حتی سال‌ها در زخم‌های پیچیده باقی بماند (۲۶). برخی مطالعات در سطوح ملکولی نشان داده‌اند که سرعت بهبود زخم ایجاد شده در روز و شب متفاوت است. ریتم شبانه‌روزی تقریباً تمامی جنبه‌های رفتاری و هم‌چنین فرآیندهای رفتاری، فیزیولوژیکی و متابولیکی را مدیریت می‌نماید (۲۷، ۲۸). مرکز تنظیم ریتم‌شبانه‌روزی در هسته سوپراکیاسماتیک (SCN) در ناحیه هیپوتالاموس قدامی قرار دارد. با استفاده از سیستم ریتینو هیپوتالامیک، مرکز خود را با نور محیط تنظیم و نتیجه آن تنظیم ریتم‌شبانه‌روزی بدن است (۲۸، ۲۹). در سطح مولکولی، ساعت شبانه‌روزی از یک حلقه بازخورد بیان ژن خودتنظیمی تشکیل شده است. SCN ترشح هورمون‌ها را کنترل، سیگنال‌های عصبی را ارسال و در نتیجه ریتم بدن و ساعت شبانه‌روزی بدن را تنظیم می‌نماید (۲۷). یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که تنظیم عملکرد پوست صرفاً نتیجه تأثیر SCN از طریق انتقال‌دهنده‌های عصبی غدد درون‌ریز بر روی پوست نمی‌باشد. در واقع، مانند بسیاری از اندام‌ها و پوست ساعتی قوی و ذاتی دارد (۳۰، ۳۱، ۳۲) و لازم است عنوان گردد که نقش ساعت شبانه‌روزی در پوست تا حد زیادی ناشناخته باقی‌مانده است (۳۲). با توجه به مراحل ترمیم زخم و تأثیر روز و شب بر میزان بهبود زخم، این مطالعه براساس هدف ارزیابی سرعت روند بهبود و عوامل ترمیمی در طول روز و شب طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد: کیت تجاری جهت اندازه‌گیری هیدروکسی‌پرولین از شرکت کیازیس (همدان، ایران) و سایر موادشیمیایی مورد نیاز از سیگما (سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) و مرک (دارمشتات، آلمان) تهیه گردید.

حیوانات: ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ، نژاد Sprague-Dawley (۲۵±۲۰۰ گرم، ۸-۶ هفته) از مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شیراز (شیراز، ایران) تهیه و در همان مرکز در شرایط تعیین شده (قفس استاندارد موش با ابعاد ۴۵×۴۰×۵۰ سانتی‌متر، ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی دردمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و (۷ صبح تا ۷ بعدازظهر چرخه روشنایی/۷ بعدازظهر تا ۷ صبح چرخه تاریکی) به مدت ۲۱ روز نگه‌داری شدند. در طول مطالعه، حیوانات در قفس‌های مختص خود باقی‌مانده و رژیم غذایی استاندارد و آب به‌صورت آزاد در دسترس بود.

ترمیم زخم و دست‌یابی به‌روش‌های بهینه مدیریت زخم یکی از مسائل حائز اهمیت در انسان و حیوانات می‌باشد. پوست بزرگ‌ترین ارگان بدن و دارای سه لایه (اپیدرم، درم و هیپودرم) می‌باشد. فعالیت‌های مختلفی از جمله ایمنی، محافظت در برابر موادمیکروبیایی خارجی و آسیب‌های بیولوژیکی، مهار از دست دادن بیش از حد آب بدن، تنظیم دما و تولید ویتامین D را انجام می‌دهد (۱، ۲، ۳). اپیدرم مهار از دست دادن بیش از حد آب بدن را برعهده دارد و از پنج لایه تشکیل شده است (۴، ۵). درم ضخیم‌ترین لایه‌ای است که مستقیماً در زیر اپیدرم قرار گرفته است و عمدتاً حاوی عروق خونی و لنفاوی، فیبروبلاست‌ها، اعصاب و بافت‌همبند می‌باشد (۵، ۶، ۷). هیپودرم عمیق‌ترین ناحیه پوست بوده و حاوی رگ‌های خونی بزرگ، چربی زیرجلدی و بافت‌همبند آرنول می‌باشد. فرآیند ترمیم زخم بلافاصله پس از ضربه و آسیب ناشی از محرک‌های داخلی و خارجی آغاز می‌گردد (۸). فرآیند ترمیم زخم شامل چهار مرحله مجزا (التهابی، پاک‌سازی، تکثیر و بلوغ) می‌باشد (۹). مرحله التهابی بلافاصله پس از آسیب شروع می‌گردد. نفوذپذیری عروق خونی توسط عوامل کموتاکتیک و متعاقب آن مهاجرت سلول‌هایی نظیر نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به ناحیه زخم افزایش می‌یابد (۱۰). مرحله پاک‌سازی (دبریدمنت) با حضور سلول‌های نوتروفیل و مونوسیت آغاز می‌گردد. مونوسیت‌ها در این مرحله توسط تحریکات نوتروفیل‌ها ظاهر می‌گردند و در نهایت مونوسیت‌ها در بافت به ماکروفاژها تمایز می‌یابند. ماکروفاژها عروق‌زایی و ترشح فاکتورهای رشد (اینترلوکین-۱) را تحریک نموده و تولید ماتریکس در زخم‌ها را متعادل می‌نمایند. در مرحله تکثیر، زخم با بافت همبند جدید پر شده و با ترکیبی از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر بافت‌گرانوله، انقباض و ایجاد پوست جدید، منجر به کاهش اندازه ابعاد زخم می‌گردند. فیبروبلاست‌ها از بافت اطراف به محل زخم مهاجرت نموده، تکثیر و فعال شده و سنتز کلاژن، گلیکوز‌آمینوگلیکان‌ها و فیبرونکتین را آغاز می‌نمایند (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴). کلاژن پروتئین ساختاری اصلی در ماتریکس خارج سلولی بافت‌های مختلف (غضروف‌ها، استخوان‌ها، تاندون‌ها، رباط‌ها و پوست) می‌باشد (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹). حداقل ۱۶ نوع کلاژن وجود دارد که ۸۰ تا ۹۰ درصد کلاژن بدن از نوع ۱، ۲ و ۳ می‌باشد (۲۰). حضور کلاژن در روند بهبود زخم اهمیت حیاتی داشته، موزی با سطح پوست قرار گرفته و استحکام کششی پوست را ایجاد می‌نمایند (۲۱، ۲۲). پرولین و هیدروکسی‌پرولین اسیدآمینوهای اصلی در تشکیل پروتئین کلاژن (خانواده‌ای از مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی و متشکل از سه زنجیره پلی‌پپتیدی که توسط سلول‌ها، جهت یکپارچگی ساختاری و سایر عملکردها مورد استفاده

که در آن WAA ارزیابی ناحیه زخم است، iWA ناحیه زخم اولیه (زمان ۰) و fWA آخرین زمان زخمی شدن پوست (۳، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۲۱) است (۳۴).

سنجش غلظت هیدروکسی پرولین: میزان هیدروکسی پرولین در هر گروه ۱۰ و ۲۱ روز پس از ایجاد زخم بر روی نمونه‌های پوست اندازه‌گیری گردید. نمونه‌های پوستی در هر گروه در حضور هیدروکلراید ۱۲ نرمال به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد هضم شدند. اندازه‌گیری هیدروکسی پرولین طبق دستورالعمل کیت تجاری کیازیست و براساس واکنش با معرف اریلیخ جهت تولید کروموفور صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری پروتئین کل: پروتئین کل نمونه‌های پوست هموزن شده توسط روش Bradford تعیین شد (۳۵).

تحلیل آماری: داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) بیان گردیده‌اند. جهت تجزیه و تحلیل آماری از آزمون‌های t مستقل، اندازه‌گیری مکرر، t زوجی و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۳) استفاده گردید. مقادیر ($p < 0.05$) به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اندازه‌گیری روند بهبود زخم: در روز ۲۱ پس از ایجاد زخم پوستی، بین گروه‌های A و B تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0.05$). روند بهبود زخم در طی ۲۱ روز در گروه A و B به‌طور جداگانه قابل توجه است ($p < 0.05$) (شکل ۲).

غلظت هیدروکسی پرولین: تفاوت معنی‌داری در سطوح هیدروکسی پرولین بین گروه‌های A و B مشاهده نگردید. بین گروه‌های A و B تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0.05$) (شکل ۳).

حقوق حیوانات: تمام آزمایش‌های انجام شده بر روی حیوانات توسط کمیته تحصیلات تکمیلی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران تایید گردید. توصیه‌های دستورالعمل شورای اروپا (EC/۶۰۹/۸۶) در ۲۴ نوامبر ۱۹۸۶، در مورد استانداردهای حفاظت از حیوانات مورد استفاده برای اهداف آزمایشی نیز دنبال شد.

طرح آزمایش: حیوانات جهت انجام آزمایش به صورت تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم گردیدند:

گروه A که زخم در ساعت ۸-۱۰ صبح و گروه B که در آن، زخم در ساعت ۹-۱۱ شب ایجاد ایجاد گردید. دو گروه هم‌چنین دارای دو زیر گروه برابر بودند:

• گروه A به زیرگروه‌های ۱۰A و ۲۱A (۱۰ و ۲۱ روز پس از ایجاد زخم پوستی) تقسیم شد.

موش‌های زیرگروه ۱۰A و ۲۱A بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح، در روزهای ۱۰ و ۲۱ (پس از ایجاد زخم پوستی)، به شیوه انسانی معدوم و نمونه‌های پوستی جهت ارزیابی بیوشیمیایی اخذ گردید.

• گروه B به زیرگروه‌های ۱۰B و ۲۱B (۱۰ و ۲۱ روز پس از ایجاد زخم پوستی) تقسیم شد. موش‌های زیرگروه ۱۰B و ۲۱B در ساعت‌های ۹ تا ۱۱ شب به شیوه انسانی معدوم و روند همانند زیرگروه‌های قبلی تکرار گردید.

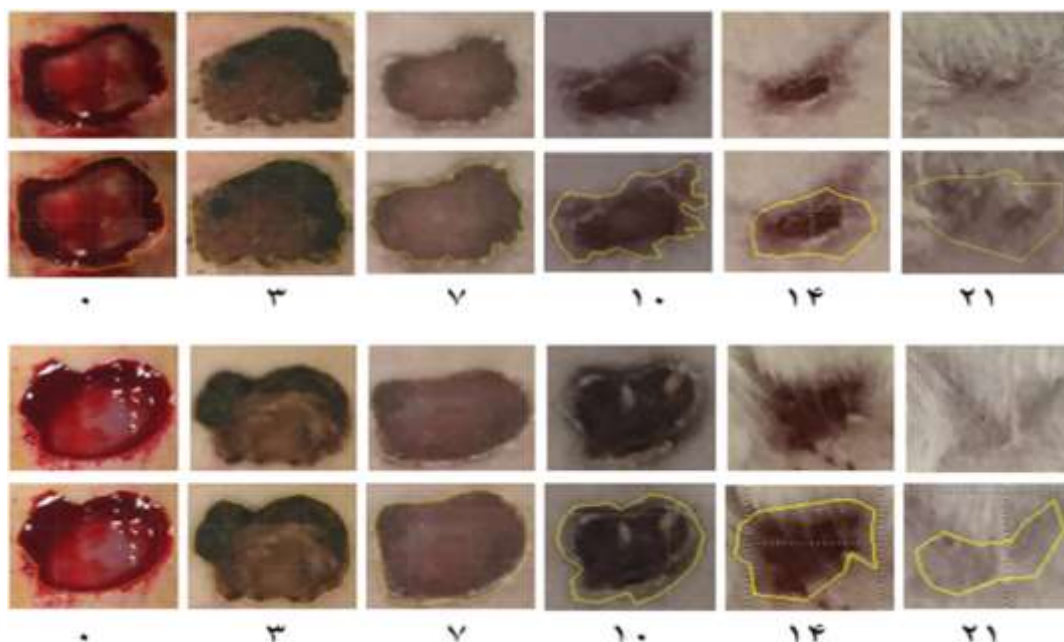
روش ایجاد زخم پوستی: وزن تمامی موش‌ها قبل از عمل جراحی مورد ارزیابی و ثبت قرار گرفت. القا بی‌هوشی با تزریق ۸ میلی‌گرم/کیلوگرم زایلازین هیدروکلراید (۲ درصد؛ آلفاسان، هلند) و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین هیدروکلراید (۱۰ درصد؛ آلفاسان، هلند) در عضله ران صورت پذیرفت. قبل از انجام برش، موهای قسمتی از پوست ناحیه پشت، بین اولین مهره سینه‌ای و اولین مهره کمری تراشیده، ضد عفونی و نهایتاً زخم پوستی مربعی شکل با ابعاد تقریبی (۲×۲ سانتی‌متر) ایجاد گردید (۳۳).

ارزیابی روند بهبود ناحیه زخم (Wound Area Assessment):

بلافاصله پس از ایجاد زخم‌های پوستی و در زمان‌های (۳، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز پس از آن)، موش‌ها بر روی یک میز چوبی قرار داده شدند و با استفاده از دوربین دیجیتال (سونی، W230-DSC، ژاپن) از ناحیه زخم‌ها در فاصله استاندارد ۳۰ سانتی‌متر از پایه افقی عکس‌برداری صورت پذیرفت. جهت ارزیابی نواحی زخمی در زمان‌های ذکر شده، تصاویر با استفاده از نرم‌افزار مورفومتری (برنامه @Digimizer، ۷5.3.5) پردازش شدند. جهت ارزیابی ناحیه زخم به از معادله زیر استفاده گردید:

$$WAA = \frac{iWA - fWA}{iWA} \times 100$$

(A)

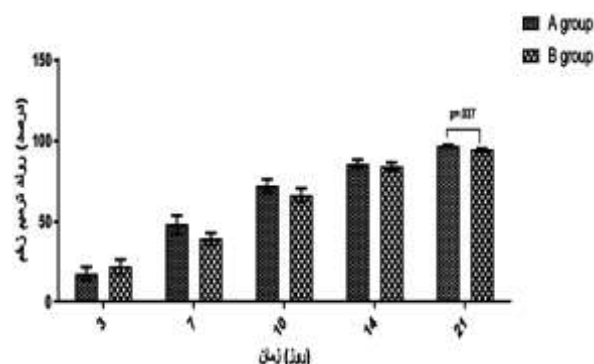


(B)

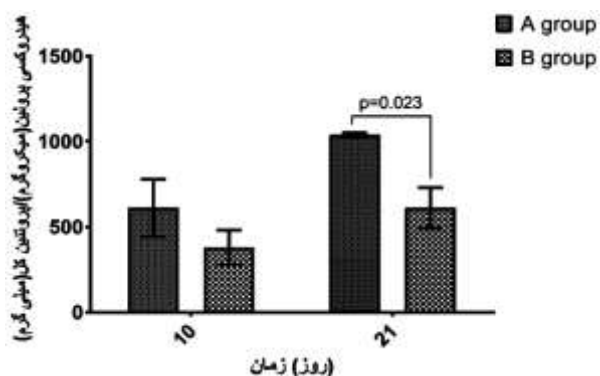
شکل ۱: روند بهبود زخم توسط برنامه digimizer در زمان‌های مختلف (۰، ۳، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۲۱) ارزیابی گردید (A: group A, B: group B)

بحث

ریتم شبانه‌روزی بر روی سطوح مختلف بافتی (نظیر پوست، سیستم متابولیک، ریه، سلول‌های ایمنی و ترشح هورمون‌ها) اثرگذار بوده (۲۸، ۳۶، ۳۷) و تمرکز بیشتر مطالعات انجام شده بر روی اثرات اختلال ریتم شبانه‌روزی بر سلول‌ها و اندام‌های بدن در سطوح سلولی و مولکولی (سیستم ایمنی، کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها) بوده است (۳۲، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱). هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر روز و شب بر بهبود زخم‌های پوستی ایجاد شده در موش صحرایی بود. یافته‌های این پژوهش نشان داد که تفاوت معنی‌دار فاکتورهای ارزیابی شده، در پایان مطالعه بیش‌تر مشهود می‌باشد. در مورد بهبود روند ترمیم و کوچک‌شدن محل زخم تفاوت معنی‌دار در زمان ۲۱ بین گروه A و B مشاهده گردید. براساس مطالعه دیگری، ترشح سیتوکین‌ها (نظیر اینترلوکین-۱ و اینترلوکین-۶ و...) و تعادل در ارتباط میان هورمون‌های کورتیکواستروئیدی و سیستم ایمنی نیز مشخص می‌باشد (۴۲). در تحقیق دیگری اثر دقیق و مشخصی از ریتم شبانه‌روزی بر روی سیستم ایمنی مشخص نشده است (۴۳). در سایر مطالعات بر روی ریتم شبانه‌روزی در موش نشان داده شده است که ترشح عوامل پیش‌التهابی در طول روز افزایش یافته درحالی‌که در شب کاهش می‌یابند (۴۴) و سطوح بالای کورتیکواستروئیدها در شب منجر به کاهش تعداد سلول‌های ایمنی می‌گردد که در طول روز عکس مورد



شکل ۲: روند بهبود زخم توسط برنامه digimizer ارزیابی و درصد بهبود زخم توسط فرمول عنوان شده محاسبه گردید



شکل ۳: غلظت هیدروکسی پرولین در نمونه‌های پوستی در زمان‌های ۱۰ و ۲۱ روز پس از ایجاد زخم پوستی

در هر نمودار تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد. ($p < 0.05$)

منابع

1. Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W. and Packer, L., 1994. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 102(1): 122-124.
2. Kanitakis, J., 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology*. 12(4): 390-399.
3. Farage, M.A., Miller, K.W. and Maibach, H.I., 2017. Degenerative changes in aging skin. *Textbook of aging skin*. 15-30.
4. Jackson, S.M., Williams, M.L., Feingold, K.R. and Elias, P.M., 1993. Pathobiology of the stratum corneum. *Western journal of medicine*. 158(3): 279.
5. James, W.D., Berger, T.G., Elston, D.M. and Odom, R.B., 2006. *Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
6. Yousef, H. and Sharma, S., 2018. Anatomy, skin (Integument), epidermis. *StatPearls Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing LLC: St Petersburg, FA, USA.
7. Brincat, M., Muscat Baron, Y. and Galea, R., 2005. Estrogens and the skin. *Climacteric*. 8(2): 110-123.
8. Shaw, T.J. and Martin, P., 2009. Wound repair at a glance. *Journal of cell science*. 122(18): 3209-3213.
9. Kobayashi, H., Aiba, S., Yoshino, Y. and Tagami, H., 2003. Acute cutaneous barrier disruption activates epidermal p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases in human and hairless guinea pig skin. *Experimental dermatology*. 12(6): 734-746.
10. Noli, C. and Miolo, A., 2001. The mast cell in wound healing. *Veterinary dermatology*. 12(6): 303-313.
11. Regan, M.C., Kirk, S.J., Wasserkrug, H.L. and Barbul, A., 1991. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *Journal of Surgical Research*. 50(5): 442-448.
12. Ehrlich, H.P. and Krummel, T.M., 1996. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound repair and regeneration*. 4(2): 203-210.
13. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. and Gabbiani, G., 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *Journal of Cell Biology*. 122(1): 103-111.
14. Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altrrock, B.W., Deuel, T.F. and Thomason, A., 1991. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of cellular biochemistry*. 45(4): 319-326.
15. Di Lullo, G.A., Sweeney, S.M., Körkkö, J., Ala-Kokko, L. and San Antonio, J.D., 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. 277(6): 4223-4231.
16. Britannica, E., 2007. *Britannica Online*. Encyclopaedia Britannica.
17. Birbrair, A., Zhang, T., Files, D.C., Mannava, S., Smith, T. and Wang, Z.M., 2014. Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner. *Stem cell research & therapy*. 5(6): 122.
18. Mazumdar, P., 2017. The Dual Matrix of Life: On Genetic Science, Art and the Truth Games of the "Third Culture". *Junctures: The Journal for Thematic Dialogue*. 18.
19. Fossum, T.W., 2018. *Small Animal Surgery E-Book*: Elsevier Health Sciences.

ذکر شده فوق می‌باشد (۴۵، ۴۶). با توجه به نتایج تحقیقات انجام پذیرفته، شاید بتوان شباهت نسبتاً ملموسی در افزایش روند ترمیم در گروه A نسبت به B و مکانیسم‌های زیستی یاد شده عنوان نمود. البته به دلیل عدم وجود مطالعات کلینیکی مشابه، عدم معنی‌داری در زمان‌های کم‌تر قابل توصیف نمی‌باشد و نیازمند مطالعات آتی بیش‌تر، جهت شناخت مکانیسم‌های هریک از موارد فوق می‌باشد. غلظت پرولین و هیدروکسی‌پرولین به‌طور قابل توجهی در طول رشد و نمو جنین، ترمیم‌بافتی و تکثیر سلولی افزایش یافته و نقش‌های همه جانبه‌ای در متابولیسم و فیزیولوژی سلولی، تنظیم بیان ژن و مسیرهای سیگنال‌دهی، ایفا می‌نمایند (۴۷، ۴۸). علاوه بر موارد ذکر شده، هیدروکسی‌پرولین به‌عنوان شاخص تشکیل کلاژن نقش مهمی در بسته و جمع‌شدن زخم دارد و نشانه‌ای از افزایش مهاجرت، تکثیر و تمایز فیبروبلاست‌ها می‌باشد (۴۹، ۵۰) و سلول‌های فیبروبلاست (۴۳) به‌علت دارا بودن خاصیت انقباضی، لایه‌اپیدرم را کشیده و موجب کاهش ابعاد زخم و هم‌سویی رشته‌های کلاژن (۵۱) می‌گردند. در همین راستا معنی‌دار بودن روند ترمیم در زمان ۲۱، شاهد معنی‌دار بودن هیدروکسی‌پرولین در همین زمان در گروه A نسبت به گروه B است که شاید بتوان دلیل آن را حضور سلول‌های فیبروبلاست بیش‌تر در گروه A دانست. با توجه به افزایش سطح کلاژن در مرحله بلوغ از ترمیم زخم (۵۲)، احتمالاً بالابودن معنی‌دار هیدروکسی‌پرولین در گروه A نسبت B را شاید بتوان تاخیر در روند ترمیم زخم در گروه B دانست. با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد بین مدت زمان ایجاد زخم در روز و شب و میزان بهبودی زخم همبستگی قوی وجود دارد و مشاهدات ماکروسکوپی روند ترمیم زخم و تأثیر ریتم شبانه‌روزی بر این فرآیند تأییدکننده این موضوع می‌باشد و زخم‌هایی که در روز ایجاد شده‌اند، سرعت بهبودی بالاتری از لحاظ بالینی و میزان پروتئین موجود در زخم دارند. پیشنهاد می‌گردد مطالعات آتی با تمرکز هم‌زمان مطالعات سلولی/مولکولی و کلینیکی همراه باشند. توصیه می‌گردد فاکتورهای بیوشیمیایی نظیر $TNF-\alpha$ ، اینترلوکین‌های ۱ و ۶، ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی، ایمونوهیستوشیمیایی و بیومکانیک در زمینه ارتباط میان سیستم ایمنی و سلول‌های پوستی (فیبروبلاست) و تأثیر ریتم شبانه‌روزی بر روی آن‌ها انجام گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز قدردانی می‌نمایند.

37. **Hastings, M., O'Neill, J.S. and Maywood, E.S., 2007.** Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of Endocrinology*. 195(2): 187-198.
38. **Kondratov, R.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Vykhovanets, O.V. and Antoch, M.P., 2006.** Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & development*. 20(14): 1868-1873.
39. **Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G.D., Herzog, E.D. and Volk, H.D., 2009.** A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(50): 21407-21412.
40. **Hayashi, M., Shimba, S. and Tezuka, M., 2007.** Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(4): 621-626.
41. **Hashiramoto, A., Yamane, T., Tsumiyama, K., Yoshida, K., Komai, K. and Yamada, H., 2010.** Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF- α . *The journal of immunology*. 184(3): 1560-1565.
42. **Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H. and Tomic-Canic, M., 2008.** Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 16(5): 585-601.
43. **Mesut Sipahi, M., Kürşad Zengin, M. and Serhat Tanik, M., 2014.** Effects of circadian rhythm disorders on wound healing and strength of bowel anastomosis in rats. *Wounds*. 26(11): 317-322.
44. **Son, G.H., Chung, S. and Kim, K., 2011.** The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Frontiers in neuroendocrinology*. 32(4): 451-465.
45. **Haus, E. and Smolensky, M.H., 1999.** Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiology international*. 16(5): 581-622.
46. **Dhabhar, F.S., Miller, A.H., Stein, M., McEwen, B.S. and Spencer, R.L., 1994.** Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain, behavior, and immunity*. 8(1): 66-79.
47. **Phang, J.M., Donald, S.P., Pandhare, J. and Liu, Y., 2008.** The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino acids*. 35(4): 681-690.
48. **Phang, J.M., Liu, W. and Zabirnyk, O., 2010.** Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annual review of nutrition*. 30: 441-463.
49. **Mirnezami, M., Ebrahimi Fakhar, H.R., Rezaei, K. and Rahimi, H., 2011.** Comparing the healing effects of topical phenytoin, conjugated estrogen and silver sulfadiazine on skin wounds in male rats. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 15(1): 11-14.
50. **Goel, A. and Shrivastava, P., 2010.** Post-burn scars and scar contractures. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 43: S63.
51. **Brass, D.M., Yang, I.V., Kennedy, M.P., Whitehead, G.S., Rutledge, H. and Burch, L.H., 2008.** Fibroproliferation in LPS-induced airway remodeling and bleomycin-induced fibrosis share common patterns of gene expression. *Immunogenetics*. 60(7): 353-369.
52. **Fossum, T.W., 2013.** *Small Animal Surgery Textbook-E-Book*: Elsevier Health Sciences.
20. **Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J., 2000.** Collagen: the fibrous proteins of the matrix. *Molecular Cell Biology*. 4.
21. **Singh, O., Gupta, S.S., Soni, M., Moses, S., Shukla, S. and Mathur, R.K., 2011.** Collagen dressing versus conventional dressings in burn and chronic wounds: a retrospective study. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 4(1): 12.
22. **Martini, F., Nath, J. and Bartholomew, E., 2004.** *Fundamentals of anatomy & physiology 6th edition*. San Francisco: Benjamin Cummings.
23. **Gordon, M.K. and Hahn, R.A., 2010.** Collagens. *Cell and tissue research*. 339(1): 247-257.
24. **Wu, G., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Kim, S.W. and Knabe, D.A., 2011.** Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino acids*. 40(4): 1053-1063.
25. **Wu, G., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Kim, S.W. and Knabe, D.A., 2010.** Functional amino acids in swine nutrition and production. *Dynamics in animal nutrition*. 69: 98.
26. **Flanagan, M., 2000.** The physiology of wound healing. *Journal of wound care*. 9(6): 299-300.
27. **Brown, S.A., 2014.** Circadian clock-mediated control of stem cell division and differentiation: beyond night and day. *Development (Cambridge, England)*. 141(16): 3105-3111.
28. **Lyons, A.B., Moy, L., Moy, R. and Tung, R., 2019.** Circadian Rhythm and the Skin: A Review of the Literature. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 12(9): 42.
29. **Beri, K. and Milgraum, S.S., 2016.** Rhyme and reason: the role of circadian rhythms in skin and its implications for physicians. *Future Science*.
30. **Al-Nuaimi, Y., Hardman, J.A., Bíró, T., Haslam, I.S., Philpott, M.P. and Tóth, B.I., 2014.** A meeting of two chronobiological systems: circadian proteins Period1 and BMAL1 modulate the human hair cycle clock. *Journal of Investigative Dermatology*. 134(3): 610-619.
31. **Plikus, M.V., Vollmers, C., de la Cruz, D., Chaix, A., Ramos, R. and Panda, S., 2013.** Local circadian clock gates cell cycle progression of transient amplifying cells during regenerative hair cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(23): E2106-E2115.
32. **Geyfman, M., Kumar, V., Liu, Q., Ruiz, R., Gordon, W. and Espitia, F., 2012.** Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(29): 11758-11763.
33. **Hamidi, S.A., Naeini AT, Oryan A, Tabandeh MR, Tanideh N, Nazifi S. 2017.** Cutaneous wound healing after topical application of pistacia atlantica gel formulation in rats. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 14(1): 65.
34. **Santos, T.S., dos Santos, I.D., Pereira-Filho, R.N., Gomes, S.V., Lima-Verde, I.B. and Marques, M.N., 2021.** Histological Evidence of Wound Healing Improvement in Rats Treated with Oral Administration of Hydroalcoholic Extract of Vitis labrusca. *Current Issues in Molecular Biology*. 43(1): 335-352.
35. **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
36. **Plikus, M.V., Van Spyk, E.N., Pham, K., Geyfman, M., Kumar, V. and Takahashi, J.S., 2015.** The circadian clock in skin: implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity. *Journal of biological rhythms*. 30(3): 163-182.