Archive Of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۲۹- ۴۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

بررسی اثر کاربنوکسولون در کاهش شدت التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید سالمونلا انتریکا در موش آزمایشگاهی

نیما حسینی جزنی: دانشیار میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران، n_jazani@yahoo.com *
مینا مهدی شیشوان: کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران، minamehdishishavan@yahoo.com
شهرام شهابی: دانشیار ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران، shahabirabori@yahoo.com
بهروز ایلخانی زاده: دانشیار آسیب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران، ilkhani_b@yahoo.com
بابک منصورافشار: پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران، babi13662003@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های شوک حرارتی تولید سایتوکاین‌های پیش برنده التهاب را مهار می‌کنند. کاربنوکسولون القا کننده پروتئین‌های شوک حرارتی به شمار می‌آید. هدف از این پژوهش، بررسی اثر تجویز این دارو در کاهش شدت التهاب ناشی از تجویز لیپو پلی ساکارید در موش است.

مواد و روش‌ها: ابتدا دوز کشنده ۸۰ درصد لیپو پلی ساکارید در موش تعیین و سپس دوز مناسب دارو به منظور کاهش میزان مرگ و میر مشخص شد. در نهایت دارو به همراه لیپو پلی ساکارید در گروه‌های متفاوت با زمان بندی متفاوت تزریق شد. پس از ۲۴ ساعت میزان مرگ و میر محاسبه و کلیه، کبد، طحال، ریه و روده موش‌های زنده از نظر شدت نکروز بررسی شد. در هر گروه سه ساعت پس از تزریق، مقادیر عامل نکروز توموری سرمی تعیین شد.

نتایج: تجویز دارو همزمان با لیپو پلی ساکارید میزان مرگ در موش‌ها را از ۸۰ به ۲۰ درصد کاهش داد. شدت نکروز در کبد و کلیه گروه‌های دریافت کننده دارو نسبت به کنترل مثبت، کمتر بود. همچنین در گروه دریافت کننده لیپوپلی ساکارید، سطح سرمی عامل نکروز توموری آلفا نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار یافت (P value = ۰/۰۳۲)؛ ولی در گروه‌های دریافت کننده دارونسبت به گروه کنترل معنی دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری: تزریق داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت باعث کاهش التهاب و آسیب ناشی از شوک آندوتوکسیک می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لیپو پلی ساکارید، کاربنوکسولون دی سدیم سالت، عامل نکروز توموری آلفا، التهاب

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive Of SID

مقدمه

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی است که در جنس سالمونلا و خانواده انتروباکتریاسه قرار می‌گیرد. این باکتری عامل ایجاد کننده عفونت‌های روده ای یا خارج روده ای در انسان، دام‌ها و پرندگان است (۱). انتقال عفونت‌های ناشی از سالمونلا تیفی موریوم بیشتر به دنبال مصرف مواد غذایی و آشامیدنی اتفاق می‌افتد. مهم‌ترین عامل بیماری زایی این باکتری، لیپوپلی‌ساکارید آن است (۲). حضور لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی در جریان خون، ترشح سیتوکین‌های پیش برنده التهاب از جمله عامل نکروز توموری آلفا را به دنبال دارد. ترشح سیستمیک عامل نکروز توموری آلفا موجب اتساع عروق و کاهش حجم پلاسما، افزایش نفوذپذیری عروقی، شوک و انعقاد منتشر داخل عروقی می‌شود. شوک آندوتوکسیک، نیز توسط عامل نکروز توموری آلفا آغاز شده و موجب نارسایی اندام‌های حیاتی مانند کلیه‌ها، کبد، قلب و ریه‌ها می‌شود. بنا به دلایل ذکر شده، شوک آندوتوکسیک دارای میزان مرگ و میر بالایی است (۳- ۵).

مطالعات مختلف نشان داده است که در صورت القا سنتز پروتئین‌های شوک حرارتی در درون سلول‌ها، این سلول‌ها به مواجه بعدی با لیپو پلی ساکارید مقاوم می‌شوند. به عبارت دیگر، این نوع سلول‌ها مقادیر بسیار کمتری از عامل نکروز توموری آلفا و سایر سیتوکین‌های پیش برنده التهاب را آزاد خواهند کرد. بنابراین، کشف ترکیباتی که از نظر بالینی بدون خطر بوده و قادر به تحریک تولید پروتئین‌های شوک حرارتی هستند، می‌توانند از نظر درمان شوک آندوتوکسیک مفید باشد. از طرف دیگر، پروتئین‌های شوک حرارتی واسطه‌های تعدیل کننده پاسخ‌های ایمنی و التهابی‌اند. افزایش میزان پروتئین‌های شوک حرارتی در داخل سلول‌ها، تحمل سلول‌ها را نسبت به سایتوکاین‌های پیش برنده التهاب مانند عامل نکروز توموری آلفا و اینترلوکین یک بهبود می‌بخشد. انباشته شدن پروتئین‌های شوک حرارتی در درون سلول، مهار رونویسی و کاهش ترشح عامل نکروز توموری آلفا و اینترلوکین یک را موجب می‌شود (۶).

کاربنوکسولون دی سدیم سالت، ترکیب گلوکوکورتیکوئیدی دارویی و بخش اصلی و فعال ریشه شیرین بیان است. شیرین بیان، گیاه چند ساله بومی ناحیه مدیترانه ای، از مرکز تا جنوب روسیه و آسیای صغیر تا ایران است که امروزه به شکل گسترده ای در سراسر اروپا، خاورمیانه و آسیا کشت می‌شود (۷). کاربنوکسولون امروزه در درمان زخم‌ها استفاده می‌شود (۸) و دارای اثر ضد تشنج، آرام بخش و آرام کننده ماهیچه‌ها در موش است (۹). این دارو دارای اثرات ضد التهابی (۱۰و ۱۱)، آنتی اکسیدانی (۱۲) و محافظت بخش کبدی[1] است (۱۳). همچنین، این دارو بیان ژن و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ "HSP70"[2] را افزایش می‌دهد. القا پروتئین‌های شوک حرارتی به دنبال تجویز کاربنوکسولون به غلظت دارو و رده سلولی مورد استفاده بستگی دارد. اگرچه هدف مستقیم کاربنوکسولون معلوم نیست ولی احتمال دارد القا استرس اکسیداتیو در میتوکندری‌ها به‌وسیله کاربنوکسولون، به افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی منجر شود (۱۴). در حال حاضر، استراتژی‌های درمانی برای درمان شوک آندوتوکسیک شامل کمک به خنثی‌سازی لیپو پلی ساکارید یا سایتوکاین‌های القا شده به‌وسیله آن است. مطالعات نشان می‌دهد که خنثی‌سازی سایتوکاین‌های پیش برنده التهاب مانند عامل

www.SID.ir

Archive Of SID

نکروز توموری آلفا و اینترلوکین یک، مرگ و میر ناشی از عفونت خون با باکتری‌های گرم منفی را در مدل‌های حیوانی مختلف کاهش می‌دهد (۱۵). همچنین نشان داده شده است که پروتئین‌های شوک حرارتی به طور معنی داری تولید سایتوکاین‌های القا شده به وسیله لیپو پلی ساکارید را مهار می‌کنند (۱۶). هدف از این پژوهش، بررسی اثر تجویز داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت در کاهش شدت التهاب عمومی ناشی از لیپو پلی ساکارید سالمونلا تیفی موریوم در موش آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

روش تعیین دوز کشنده لیپوپلی ساکارید در تجویز همزمان با د-گالاکتوز آمین هیدروکلراید

برای مشخص کردن دوز کشنده لیپو پلی ساکارید، به مظور حساس نمودن موش‌ها نسبت به این ماده، لیپوپلی‌ساکارید سالمونلا انتریکا، سروتایپ تیفی موریوم[۳](LPS L6511) (Sigma Aldrich) در همراهی با د- گالاکتوزآمین هیدروکلراید (Merck) تجویز شد. برای این منظور ۲۰ سر موش BALB/c جنس ماده، ۶ الی ۸ هفته ایی به وزن‌های ۱۸ تا ۲۵ گرم، در چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول، دوم، سوم وچهارم به ترتیب با محلول رینگر لاکتات حاوی لیپوپلی ساکارید به میزان ۵۰ و ۵ میکروگرم به کیلوگرم وزن بدن و۷ میکروگرم/ موش وبه ترتیب درهمراهی با د- گالاکتوزآمین به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم ویا ۱۸، ۱۸ و۱۵ میلی‌گرم/ موش ازاین ماده به طریقه داخل وریدی از ورید دم موش تزریق شدند (۱۷).

در همه گروه‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت، درصد مرگ و میر محاسبه و بهترین دوز کشنده برای انجام آزمایش‌های بعدی مشخص شد (۱۸).

روش تعیین دوز مناسب داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت

برای مشخص کردن دوز مناسب داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت، ۱۵ سر موش BALB/c جنس ماده، ۶ الی ۸ هفته‌ایی در محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۵ گرم به سه گروه تقسیم شدند. به تمام گروه‌ها محلول رینگر لاکتات حاوی لیپو پلی ساکارید به میزان ۷ میکروگرم به هر موش و د- گالاکتوز آمین به میزان ۱۸ میلی‌گرم به هر موش به عنوان بهترین دوز کشنده لیپوپلی ساکارید ود-گالاکتوز آمین به طور هم زمان، همراه با به ترتیب غلظت‌های ۱۰ (گروه اول)، ۲۰ (گروه دوم) و ۳۰ (گروه سوم) میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن از داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت از طریق ورید دم موش تزریق شد. درهمه گروه‌ها پس از ۲۴ ساعت درصد مرگ ومیر محاسبه شد و دوز مناسب دارو به عنوان دوزی که تجویز آن باعث بیش‌ترین کاهش در میزان مرگ و میر ناشی از تجویز لیپو پلی ساکارید و د- گالاکتوز آمین در موش‌ها می‌شود، انتخاب شد (۱۹ و ۲۰).

زمان بندی تزریق دارو

برای تعیین زمان مناسب مصرف دارو، ۶۰ سر موش BALB/c جنس ماده، ۶ الی ۸ هفته ای به وزن ۱۸ تا ۲۵ گرم به ۶ گروه ده تایی تقسیم و طبق برنامه زمانی ارائه شده در جدول ۱ تزریق شدند.

www.SID.ir

Archive Of SID

جدول ۱- زمان بندی تزریق لیپوپلی ساکارید- د-گالاکتوزآمین وکاربنوکسولون دی سدیم سالت در گروه‌های مختلف

	زمان بندی تزریق	مقدار لیپوپلی‌ساکارید دریافتی µg/mouse	مقدار د-گالاکتوز آمین دریافتی mg/mouse	مقدار کاربنوکسولون دی سدیم سالت دریافتی mg/Kg	نام‌گزاری گروه
۱	تجویز لیپوپلی ساکارید ودگالاکتوز آمین در بافر رینگر لاکتات و به شکل همزمان به طریقه داخل وریدی انجام شد.	۷	۱۸	-	**LPS**
۲	تجویز لیپوپلی ساکارید، د-گالاکتوز آمین وکاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طور همزمان به طریقه داخل وریدی انجام شد.	۷	۱۸	۲۰	LPSCarb
۳	ابتدا داروی کاربنوکسولون وپس از ۶ ساعت لیپوپلی ساکارید همراه با د-گالاکتوز آمین دربافر رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.	۷	۱۸	۲۰	Carb6LPS
۴	ابتدا لیپوپلی ساکارید ود- گالاکتوز آمین وپس از ۱ ساعت داروی کاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.	۷	۱۸	۲۰	LPS1Carb
۵	ابتدا لیپوپلی ساکارید ود- گالاکتوز آمین به طریقه داخل وریدی وپس از یک ساعت داروی کاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل صفاقی تجویز شد.	۷	۱۸	۲۰	LPS1Carbi .p.
۶	فقط محلول رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.	-	-	-	Control

در موارد تزریق داخل وریدی کلیه تزریق‌ها از طریق ورید دم انجام شد. حجم بافر رینگر لاکتات تزریق شده درتمام موش‌ها ۲۰۰ میکرولیتر است.

پس‌از گذشت ۲۴ ساعت، درصد مرگ ومیر در گروه‌ها محاسبه و کبد، طحال، کلیه، ریه و روده موش‌های زنده استخراج شد (۱۹). به منظور بررسی شدت آسیب بافتی، از محل ضایعه همراه با قسمت سالم بافت‌های ذکر شده ، برش‌های بافتی تهیه و با روش هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی شد. برای درجه بندی شدت نکروز بافتی در کبد از اعداد صفر تا ۴ استفاده شد. عدد صفر نشان دهنده فقدان آسیب بافتی یا نکروز[۴]، عدد یک نشانگر نکروز خفیف در برخی نقاط[۵]، عدد دو نکروز ضعیف[۶]، عدد سه بیانگر شدت نکروز متوسط[۷] و عدد چهار نشانگر نکروز شدید[۸] است (۲۱). در مورد سایر بافت‌ها درجه بندی استاندارد وجود ندارد.

تهیه سرم برای سنجش عامل نکروز توموری آلفا

۳۰ سر موش BALB/c جنس ماده، ۶ الی ۸ هفته ای به وزن ۱۸ تا ۲۵ گرم به ۶ گروه پنج تایی تقسیم شده و طبق زمان‌بندی ذکر شده، دوباره تزریق شدند. درهرگروه سه ساعت پس ازتزریق، نمونه‌های سرم جمع‌آوری شده و مقادیر عامل نکروز توموری آلفا بااستفاده ازکیت ELISA طبق دستورالعمل شرکت سازنده (R&D System) سنجش شد. به منظور مقایسه نتایج بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس ANOVA، نرم افزار SPSS و آزمون مقایسه چند گانه Tukey استفاده شد.

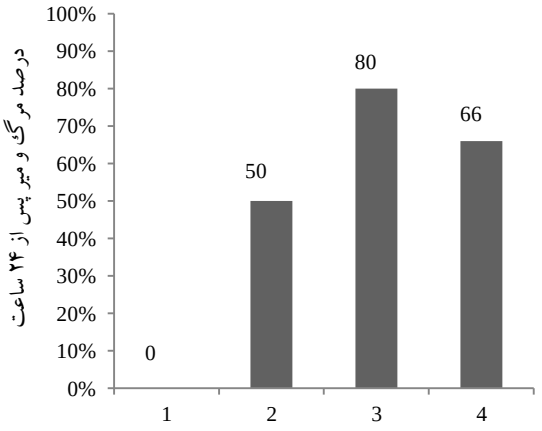
www.SID.ir

Archive Of SID

نتایج

نتایج تعیین دوز کشنده لیپو پلی ساکارید و د- گالاکتوزآمین هیدروکلراید

نتایج مربوط به تعیین بالاترین دوز کشنده لیپوپلی‌ساکارید همراه با د- گالاکتوز آمین با تجویز چهاردوز مختلف در چهار گروه پنج تایی از موش‌های Balb/c تحت تزریق مشخص شد. همچنان که شکل ۱ نشان می‌دهد، بالاترین میزان مرگ ومیر در گروهی از موش‌ها که ۷ میکروگرم لیپو پلی ساکارید همراه با ۱۸ میلی‌گرم د- گالاکتوز آمین را دریافت نموده بودند، مشاهده شد. بنابراین، این دوز به عنوان بهترین دوز تجویز لیپو پلی ساکارید / د- گالاکتوزآمین تعیین و برای بررسی اثر تجویز داروی کاربنوکسولون متعاقب تجویز لیپو پلی ساکارید / د- گالاکتوز آمین استفاده شد.

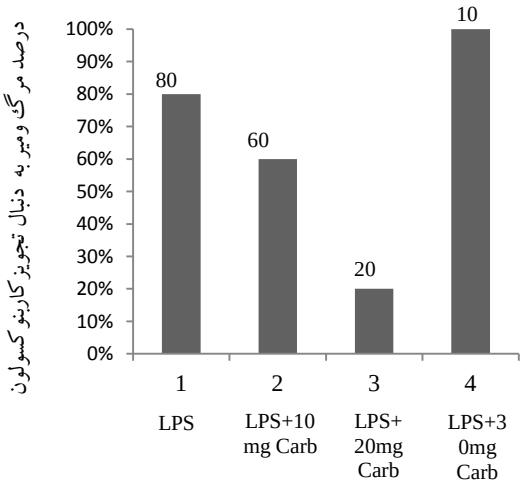


شکل ۱- نمودارتعیین دوز کشنده لیپو پلی ساکارید و د- گالاکتوزآمین هیدروکلراید

حداکثر میزان مرگ ومیر در گروه سوم (گروهی که ۷ میکروگرم لیپو پلی ساکارید و۱۸ میلی‌گرم/موش د-گالاکتوز آمین دریافت نمود) ایجاد شد. درگروه اول، دوم و چهارم میزان مرگ ومیر به ترتیب صفر، ۵۰ و۶۶ درصد بود.

نتایج تعیین دوز مناسب داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت

نتایج مربوط به تعیین دوز مناسب داروی کاربنوکسولون با تجویز سه دوز مختلف از داروی کاربنوکسولون در سه گروه پنج تایی نشان داد که در گروه دوم میزان مرگ و میر از ۸۰ به ۲۰ درصد کاهش یافت (۶۰ درصد کاهش). این گروه تزریق سه ماده لیپو پلی ساکارید به میزان ۷ میکروگرم و د- گالاکتوز آمین به میزان ۱۸ میلی‌گرم به هر موش و کاربنوکسولون به مقدار ۲۰ میلی‌گرم به کیلو گرم را دریافت نمود. بنابراین، دوز مناسب داروی کاربنوکسولون برای انجام آزمایش‌های بعدی ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مشخص شد (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار نتایج تعیین دوز مناسب داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت.

گروه اول دوز کشنده ۸۰ درصد لیپوپلی ساکارید- دگالاکتوز آمین دارو را دریافت نموده است. گروه‌های دوم و سوم و چهارم به ترتیب ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم از داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت را متعاقب تجویز دوز ۸۰ درصد کشنده لیپوپلی ساکارید- دگالاکتوز آمین دریافت نمودند. حداکثر میزان افزایش بقاء در گروه سوم (گروهی که ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم از داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت را متعاقب

www.SID.ir

Archive Of SID

تجـویز دوز ۸۰ درصـد کشـنده لیپـوپلی سـاکارید- دگالاکتوز آمین دریافت نمود) مشاهده شد.

نتـایج تزریـق دوز مناسـب داروی کاربنوکسـولون دی سدیم سالت در زمان‌های مختلف

همچنان که با مراجعه به جدول ۲ مشخص مـی‌شـود، تجویز داروی کاربنوکسـولون دی سـدیم سـالت بهتـرین اثـر را هنگـامی داشـته اسـت کـه هـم زمـان بـا لیپـو پلـی سـاکارید و د- گـالاکتوز آمـین تزریـق شـود. همچنـین هنگـــامی کـــه داروی کاربنوکســـولون بـــا دوز ۲۰ میلـی‌گـرم/کیلـوگرم یـک سـاعت پـس از تجـویز ۷ میکروگـرم لیپـو پلـی سـاکارید و ۱۸ میلـی‌گـرم/مـوش د- گالاکتوز آمین به طریقه داخل صـفاقی تجـویز شـود، نتیجه مطلوبی می‌دهد.

جدول ۲- نتایج تزریق دوز مناسب داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت در زمان‌های مختلف

	زمان بندی تزریق	نام‌گزاری گروه	درصد مرگ ومیر پس از ۲۴ ساعت
۱	تجویز لیپوپلی ساکارید ودگالاکتوز آمین در بافر رینگر لاکتات وبه شـکل همزمـان بـه طریقه داخل وریدی انجام شد.	LPS	۸۰
۲	تجویز لیپوپلی ساکارید، د-گالاکتوز آمین وکاربنوکسولون در بـافر رینگـر لاکتـات بـه طور همزمان به طریقه داخل وریدی انجام شد.	LPSCarb	۲۰
۳	ابتدا داروی کاربنوکسولون وپس از ۶ ساعت لیپـوپلی سـاکارید همـراه بـا د-گـالاکتوز آمین دربافر رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.	Carb6LPS	۷۰
۴	ابتدا لیپوپلی ساکارید ود- گالاکتوز آمین وپس از ۱ سـاعت داروی کاربنوکسـولون در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.	LPS1Carb	۹۰
۵	ابتدا لیپوپلی ساکارید ود- گالاکتوز آمین به طریقه داخل وریدی وپس از یـک سـاعت داروی کاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل صفاقی تجویز شد.	LPS1Carbi.p.	۵۰
۶	فقط با محلول رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.	Control	صفر

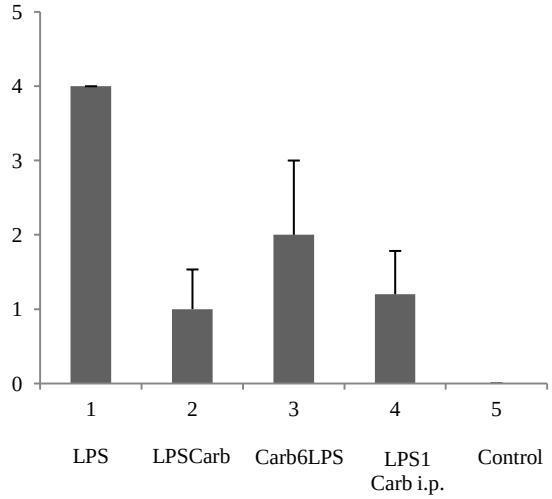
در گـروه‌هـای دریافـت کننـده لیپـوپلی سـاکارید د-گالاکتوز آمین، دوز تزریقی بـه ترتیـب ۷ میکروگـرم و۱۸ میلی‌گرم/ موش ودر کلیه گروه‌های دریافت کننـده کاربنوکسولون دوز تزریقی ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بـوده است.

نتایج تحلیل بافتی کبد، طحال، کلیه، ریه و روده

گـــروه دریافـــت کننـــده لیپـــو پلـــی ســـاکارید و د- گـالاکتوز آمـین (گـروه LPS)در مقایسـه بـا دیگـر گروه‌ها، بیش ترین شدت نکروز کبدی را نشـان داد. در گروه کنترل (بافر رینگر لاکتات) آسیب کبدی مشـاهده نشـد. در سـه گروهـی کـه داروی کاربنوکسـولون را در زمـان‌هـای مختلـف دریافـت کـرده انـد (گـروه‌هـای LPSCarb، Carb6LPS و .LPS1Carbi.p) شـــــدت نکروز کبدی کاهش یافت و از سه گـروه تحـت درمـان با کاربنوکسولون، گروه LPSCarb (دریافـت هـم زمـان لیپو پلی ساکارید، د- گالاکتوز آمین و کاربنوکسولون)، کم‌ترین شدت نکروز دربافت کبدی (نکروز خفیـف در برخی نقاط) رانشان داد. در گـروه LPS1Carb بـه علـت آن‌که تنها یک موش از آزمایش قبلـی زنـده مانـده بـود، نتایج قابل اعتماد نبوده و درشکل ۳ ذکرنشد.

www.SID.ir

Archive Of SID



شکل ۳- نمودار مقایسه ای میانگین شدت نکروز در سلول‌های کبدی در گروه‌های مورد مطالعه

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین میزان نکروز در گروه LPS ایجاد شد، گروه‌های دریافت کننده داروی کاربنوکسولون درمقایسه با گروه LPS کاهش درشدت نکروز کبدی رانشان دادند. در گروه کنترل منفی هیچگونه نکروزی مشاهده نشد. مقادیر به شکل میانگین (Mean±SE) نشان داده شده است.

همچنین، در کلیه موش‌های گروه کنترل با حفظ هسته سلولی هیچگونه نکروزی در سلول‌های توبولار مشاهده نشد. در صورتی‌که در گروه LPS در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشترین میزان نکروز حاد توبولار مشاهده شد و بیشتر سلول‌ها هسته‌های خود را از دست دادند. در گروه‌های گیرنده دارو کاهش درخور توجهی در میزان نکروز توبولی مشاهده شد. به طوری‌که با بررسی لام پاتولوژی تهیه شده از کلیه موش‌های گروه LPS1Carbi.p.، هیچگونه تغییری در سلول‌های کلیه مشاهده نشد وهمچنین شدت نکروز در سایر گروه‌های دریافت کننده کاربنوکسولون نیز به شدت کاهش یافت به طوری‌که در گروهCarb6LPS ، در برخی از نقاط از دست رفتن هسته‌ها به چشم می‌خورد و نکروز توبولی مشاهده شد ولی شدت نکروز در مقایسه با گروه LPS کمتر بود. تاثیر داروی کاربنوکسولون در گروهی که کاربنوکسولون، لیپوپلی ساکارید ود گالاکتوز آمین را به طور همزمان دریافت کرده است، در کاهش شدت نکروز بیشتر به چشم می‌خورد. در این گروه نکروز توبولی بسیار خفیفی در کلیه موش‌های تحت بررسی در مقایسه با گروه LPS و گروهCarb6LPS مشاهده شد.

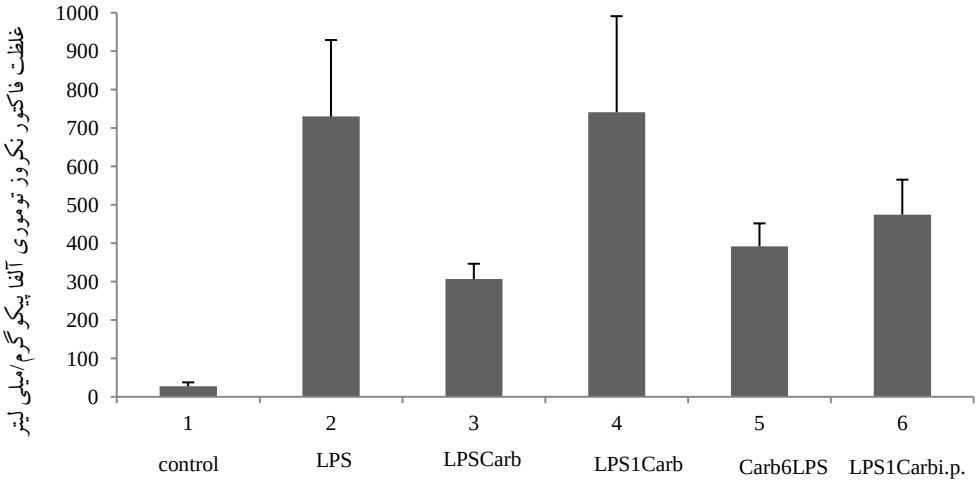
در بررسی بافتی نمونه‌های به دست آمده از طحال، ریه وروده نتایج معنی داری بین گروه‌ها به دست نیامد.

نتایج سنجش غلظت عامل نکروز توموری آلفا موجود در سرم موش‌ها با استفاده از کیت الایزا

برای بررسی اختلاف میانگین غلظت عامل نکروز توموری آلفا با سایر گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد. این آزمون با (P value <0.05) اختلاف معنی‌داری را در میانگین بین برخی گروه‌ها نشان می‌دهد. آزمون مقایسه چند گانه Tukey نشان می‌دهد که اختلاف در میانگین غلظت عامل نکروز توموری آلفا مشاهده شده بین گروه LPS با گروه کنترل معنی دار است(P value <0.05). بنابراین، تزریق لیپو پلی ساکارید و د- گالاکتوز آمین باعث افزایش تولید عامل نکروز توموری آلفا شده است. همچنین گروه کنترل با گروه LPS1Carb تفاوت معنی دار دارد (P value <0.05). ولی گروه کنترل از لحاظ میانگین غلظت عامل نکروز توموری آلفا با گروه‌های LPSCarb و Carb6LPS و LPS1Carbi.p. تفاوت معنی دار ندارد و این نتایج نشان می‌دهد که دارو اثر درمانی مطلوبی در موش‌های مورد مطالعه داشته است (شکل ۴).

www.SID.ir

Archive Of SID



شکل ۴- میانگین (Mean±SE) غلظت عامل نکروز توموری آلفا درگروه‌های مختلف

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، گروه LPSCarb از نظر میانگین غلظت عامل نکروز توموری آلفا با دیگر گروه‌ها تفاوت معنی دار ندارد. گروه LPS1Carb به جز گروه کنترل با دیگر گروه‌ها تفاوت معنی دار ندارد. گروه Carb6LPS و LPS1Carbi.p. با هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی دار نشان نداد. گروه LPS به جز گروه کنترل با دیگر گروه‌ها از اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

بحث و نتیجه گیری

در این بررسی، نتیجه گرفته شد که تجویز لیپوپلی‌ساکارید سالمونلا تیفی موریوم به میزان ۷ میکروگرم و د- گالاکتوزآمین هیدروکلراید به مقدار ۱۸ میلی‌گرم باعث مرگ ۸۰ درصد موش‌ها می‌شود. می‌ون داین[۹] و همکاران وی نیز برای ایجاد مدل آزمایشگاهی شوک اندوتوکسیک، لیپو پلی ساکاریدرا با دوز ۵ میکروگرم و د- گالاکتوز آمین را با دوز ۲۰ میلی‌گرم به هر موش به شکل داخل صفاقی تزریق کردند که موجب مرگ ۸۰ درصد موش‌ها شد (۲۲).

این مقادیر با مقادیر استفاده شده در مطالعه ما کمابیش مطابقت دارد.

به دنبال تزریق ۲۰ میلی‌گرم (به کیلو گرم وزن بدن) از داروی کاربنوکسولون در موش‌های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید ود-گالاکتوز آمین با دوز ذکر شده، پس از ۲۴ ساعت میزان مرگ و میر موش‌ها از ۸۰ درصد به ۲۰ درصد کاهش یافت (شکل ۲).

در این مطالعه، تجویز داروی کاربنوکسولون به میزان ۳۰ میلی‌گرم (به کیلوگرم وزن بدن) همراه با لیپوپلی ساکارید و د- گالاکتوز آمین باعث مرگ کلیه موش‌های تحت آزمایش شد. پیش از این نیز نشان داده شده است که تجویز داروی کاربنوکسولون به مقدار زیاد اثر کشندگی دارد. کاربنوکسولون در فعالیت‌های بیوانرژیتیک میتوکندری دخالت دارد که به نوبه خود موجب تغییرات متابولیکی سمی در کبد می‌شود (۲۳). کاربنوکسولون یکی از ترکیبات عمده گیاه شیرین بیان محسوب شده و نشان داده شده است که مصرف بیش ازحد شیرین بیان اثرات سمی بر روی کبد و سیستم

www.SID.ir

Archive Of SID

قلبی– عروقی دارد و افزایش فشار خون و ادم را موجب می‌شود (۲۴).

نتایج به دست آمده نشان داد، مصرف داروی کاربنوکسولون در زمان‌های مختلف در موش‌های تحت تیمار با لیپو پلی ساکارید و د – گالاکتوز آمین، میزان مرگ و میر را کاهش می‌دهد. به طوری‌که تزریق هم‌زمان داروی کاربنوکسولون با غلظت ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، همراه با لیپوپلی ساکارید و د- گالاکتوز آمین میزان مرگ و میر را به ۲۰ درصد رساند و کم‌ترین درصد مرگ و میر در این گروه در مقایسه با سایر گروه‌های دریافت کننده دارو مشاهده شد (جدول ۲) .

در گروه LPS1Carb درصد مرگ و میر (۹۰ درصد) بیش‌تری در مقایسه با گروه کنترل مثبت یعنی گروه LPS (۸۰ درصد) مشاهده شد و این امر به احتمال زیاد به علت استرس ایجاد شده هنگام تزریق داخل وریدی در موش‌های مبتلا به شوک آندوتوکسیک است. به همین دلیل گروه اضافی دیگری در آزمایش‌ها تعریف شد و به منظور کاهش استرس، تزریق دارو به شکل داخل صفاقی انجام شد. در این گروه میزان مرگ ومیرکاهش یافته و از ۸۰ به ۵۰ درصد رسید.

در گروه LPS بررسی لام‌های آسیب‌شناسی موش‌های زنده نکروز شدید کبدی (شدت چهارمثبت) را نشان داد در صورتی‌که در گروه کنترل که بافر رینگر لاکتات دریافت کردند، آسیب کبدی مشاهده نشد (شدت صفر). در مطالعه مشابهی کون[۱۰] و همکاران ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم گالاکتوز آمین و ۵۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن لیپو پلی ساکارید به طور داخل صفاقی به موش‌های بالب سی تزریق کردند و ۹ ساعت پس از تزریق شدت نکروز کبدی را بررسی نموده و بروز نکروز هموراژیک در بافت کبدی رامشاهده نمودند. این محققان نشان دادند که آسیب‌های کبدی القا شده تحت تاثیر لیپو پلی ساکارید و د- گالاکتوز آمین با واسطه افزایش تولید عامل نکروز توموری آلفا روی می‌دهد (۱۰). از طرفی در گروه‌هایی که کاربنوکسولون را به عنوان دارو دریافت نمودند شدت نکروز در کبد در مقایسه با گروه LPS کاهش یافت که نشان دهنده نقش موثر کاربنوکسولون در کاهش شدت نکروز در کبد موش‌ها است (شکل۳).

جوناسن وهمکاران نشان دادند که در موش‌هایی که به طور سیستمیک با لیپوپلی ساکارید تجویزشدند، عملکرد توبول‌های کلیه دچار اختلال شده، میزان فیلتراسیون گلومرولی وفشار خون کاهش یافته، سیستم‌های انتقال آب ونمک در سلول‌های توبولار کلیه دچار اختلال شده و نارسایی حاد کلیه ایجاد می‌شود. البته این محققان خاطر نشان کردند که مکانیسم‌های آسیب‌های کلیوی به دنبال تجویز سیستمیک لیپوپلی‌ساکارید پیچیده بوده و به طور کامل شناخته نشده است (۲۵). در مطالعه حاضر نیز نقش تجویز لیپوپلی ساکارید در ایجاد نکروز حاد توبولار و از دست رفتن هسته‌های سلولی مشاهده شد. البته تجویزداروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت در زمان‌های مختلف کاهش درخور توجهی درمیزان نکروز توبولی را در گروه‌های دریافت کننده دارو باعث شد.

مقدار عامل نکروز توموری آلفا تولید شده در گروه LPS به طور میانگین 729.88±199.63 پیکوگرم/ میلی‌لیتر و در گروه کنترل 27.92±10.7 پیکوگرم/ میلی‌لیتر بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تجویز لیپو پلی ساکارید باعث القا تولید عامل نکروز توموری

www.SID.ir

Archive Of SID

آلفا شده است. این سیتوکین نقش مهمی درالقا آسیب‌های کشنده کبدی ایفاء می‌کند.

مقدار عامل نکروز توموری آلفا در گروه LPS1Carb 741.46±250.23 پیکوگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. این مقادیر در مقایسه با گروه LPS (729.88±199.63 پیکوگرم/میلی‌لیتر) بیش‌تر است. همچنین، در گروه دیگری که پس از آن به آزمایش اضافه شد با نام LPS1Carbi.p. (که تزریق دارو به شکل داخل صفاقی انجام شد)، مقدار عامل نکروز توموری آلفا به 474.78±91.16 پیکوگرم/میلی‌لیتر کاهش یافت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت با در نظر گرفتن شرایط و جوانب تجویز دارو از جمله نحوه تزریق، داروی کاربنوکسولون باعث کاهش مقدار تولید عامل نکروز توموری آلفا به دنبال تجویز لیپوپلی ساکارید می‌شود، تفاوت مشاهده شده شاید به این دلیل است که موش‌هایی که به دنبال تزریق لیپوپلی ساکارید دچار شوک اندوتوکسیک شده اند به علت تحریک شدید سیستم عصبی سمپاتیک، عروق محیطی تنگ شده ای دارند و بنابراین تزریق دوم داخل وریدی در این موش‌ها به شدت استرس زا است، در حالی که تزریق داخل صفاقی باعث چنین استرسی نمی‌شود. همچنین در حالی‌که در گروه LPS افزایش معنی‌داری در غلظت عامل نکروز توموری آلفا نسبت به گروه کنترل می‌بینیم، مشاهده می‌شود که اختلاف در غلظت عامل نکروز توموری آلفا در گروه‌های دریافت کننده دارو با کنترل معنی دار نیست، که این رویداد نشان دهنده نقش موثر تجویز دارو با روش مناسب در جلوگیری از افزایش غلظت عامل نکروز توموری آلفا است (۲۷ و ۲۶) . در مجموع، مطالعه پیش روی نشان داد که تزریق داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت باعث کاهش التهاب و آسیب ناشی از شوک آندوتوکسیک با واسطه کاهش در میزان عامل نکروز توموری آلفا، کاهش شدت نکروز در کبد وکلیه ونیز کاهش میزان مرگ ومیر در موش‌های تحت مطالعه می‌شود.

References

(1) Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & *Adelberg's Medical Microbiology*, 25rd ed. New York: McGraw-Hill; 2010.

(2) Ohno A, Isii Y, Tateda K, Matumoto T, Miyazaki S, Yokota S, et al. Role of LPS length in Clearance rate of bacteria from the bloodstream in mice. *Microbiol* 1995; 141(10): 2749-59.

(3) Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-57.

(4) Hirata K, Kaneko A, Ogawa K, Hayasaka, H, Onoe T. Effect of endotoxin on rat liver. Analysis of acid phosphatase isozymes in the liver of normal and endotoxin-treated rats. *Lab Invest* 1980; 43(2): 165-71.

(5) Hewett JA, Roth RA. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacol Rev* 1993; 45(4):382−411.

(6) Ensor JE, Wiener S, McCrea KA, Viscardi RM, Crawford EK, Hasday JD. Differential effects of hyperthermia on macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 1994; 266 (4 Pt 1): C967–74.

(7) Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. *Herbal Medicine: expanded Commission E Monographs*. First rd ed, Newtown: American Botanical Council; 2000.

(8) Turpie AG, Thomson TJ. Carbenoxolone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference to side effects. *Gut* 1965; 6(6):591–4.

www.SID.ir

Archive Of SID

(9) Hosseinzadeh H, Nassiri Asl M. Anticonvulsant, sedative and muscle relaxant effects of carbenoxolone in mice. *BMC Pharmacol*. 2003; 29(3): 3.

(10) Tangri KK, Seth PK, Parmar SS, Bhargava KP. Biochemical study of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of glycyrrhetinic acid. *Biochem Pharm* 1965; 14(8): 1277–81.

(11) Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, Ando K, Aizu-Yokota E, Sato T, et al. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and otaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(13): 1633–44.

(12) Kiso Y, Tohkin M, Hikino H, Hattori M, Sakamoto, T, Namba T. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrhhizin, I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med* 1984; 50(4): 298–302.

(13) Haraguchi H, Ishikawa H, Mizutani K, Tamura Y, Kinoshita T. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in Glycyrrhiza inflate. *Bioorg Med Chem* 1998; 6(3): 339–47.

(14) Salvi M, Fiore C, Battaglia V, Palermo M, Armanini D, Toninello A. Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria which is responsible for transition pore opening. *Endocrinology* 2005; 146(5): 2306–12.

(15) Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15rd ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

(16) Zhang GY, Cao YH, Xu Y. Effect of gap junction in the ischemic injury of focal cerebral infarct. *Chin J Clin Rehab* 2004; 8: 4510-11.

(17) Kwon A H, Qiu Z, Nagahama H, MKaibori M, Kamiyama Y. Fibronectin Suppresses Apoptosis and Protects Mice From Endotoxic Shock. *Transplant Proc* 2004; 36(8): 2432-5.

(18) AkikoMorikawa TS, Naoki Koide YK, Guo-zhi J, Takahashi K, TamadaY, Yokochi T. Apoptotic cell death in the response of D-Galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 1996; 64(3):734-738.

(19) Jing L, Qiong W, Wang F. Glutamine induces heat-shock protein and protects against *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in rats. *Crit Care* 2007: 11(2): R34.

(20) Fredricka C, Martin AH. Carbenoxolone and mefloquine suppress tremor in the harmaline mouse model of essential tremor. *Mov Disord* 2006; 21(10): 1641-9.

(21) Van Westerloo DJ, Giebelen I, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno M, DeVos A, et al. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Regulates the Host Response during Septic Peritonitis. *J Infect dis* 2005; 191(12): 2138-48.

(22) Mai Van Dien KT, Mya mu M, Koide N, Sugiyama T, Mori I, Yoshida T, et al. Protective Effect of Wogonin on Endotoxin-Induced Lethal Shock in D-Galactosamine-Sensitized Mice. *Microbial Immunol* 2001; 45(11):751-6.

(23) Laubenthal F, Frage einer lebersch Z, Wirkung von A. Carbenoxolone. *Dtsch med Wschr* 1972; 97:1351–4

(24) Constantin J, Ishii-Iwamoto EL, Suzuki-Kemmelmeier F, Yamamoto N, Bracht A. Bivascular liver perfusion in the anterograde and retrograde modes. Zonation of the response to inhibitors of oxidative phosphorylation. *Cell Biochem Funct* 1995; 13(3): 201–9.

(25) Jonassen TE, Graebe M, Promeneur D, Nielsen S, Christensen S, Olsen NV. Lipopolysaccharide-induced acute renal failure in conscious rats: effects of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303(1): 364-74.

www.SID.ir

Archive Of SID

(26) Sethi A, Prakash S, Mohta M, Tyagi A. Shock - a short review. *Indian J Anaesth* 2003; 47(5):345-59.

(27) Chien S. Role of the sympathetic nervous system in hemorrhage. *Physiol Rev*. 1967; 47(2): 214-88.

[1]. Hepatoprotective
[2]. Heat shock protein 70
[3]. Lipopolysaccharide from *salmonella* enterica serotype *typhimurium*
[4]. Absent Necrosis
[5]. Occasional Necrosis
[6]. Mild Necrosis
[7]. Moderate necrosis
[8]. Severe necrosis
[9]. Mai Van Dien
[10]. A. H. Kwon

www.SID.ir