بررسي تاثير تخليه مركزي و محيطي سيستم سروتونرژيك مركزي بر التهاب محيطي ايجاد شده توسط كاراژنين در پاي موش صحرايي

نسرين مالكي*[١]، عليرضا محجل نايبي[١]، عليرضا گرجاني[١]، اشرف فخرجو[٢]

[١]دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، [٢]گروه پاتولوژي دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز

تاريخ دريافت: ٨٣/١٠/١٩ ، تاريخ پذيرش : ٨٤/٢/١٨

Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema

[1,*] Maleki N.,[1]Mohajjele Nayebi A., [1]Garjani A., [2] Fakhrjou A.

[1]School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, [2]School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences

Received: 2005/1/8 acceptance: 2005/5/23

Abstract: The role of serotonergic system was investigated on peripheral inflammation induced by intraplantary injection of carrageenan. Para-chlorophenylalanine (pCPA) was administered intracerebroventricularly (50, 100 µg/rat) or intraperitoneally (150 mg/kg, 3 days) and inflammation was induced by injection of carrageenan, 2 hours and 1 day later, respectively. Paw oedema was decreased significantly in pCPA-treated (100 µg/rat, i.c.v.) rats compared to control groups. Injection of exogenous serotonin (i.c.v.) by dose of 0.70 nmol/10µl/rat, but not the dose of 0.35 nmol/10µl/rat, 15 min after induction of inflammation completely reversed the anti-inflammatory effects of pCPA. Myeloperoxidase activity in inflamed paws were reduced significantly in groups who received (either i.c.v. or i.p.) pCPA compared to controls. Exogenous serotonin (0.70 nmol/10µl/rat) reduced inflammatory response when injected (i.c.v.) 30 min before or 30 min after the induction of inflammation. Injection of serotonin at the time of induction of inflammation had no inflammatory/anti-inflammatory effect. These results suggest that serotonin, as a neurotransmitter in central nervous system, may be involved in modulating peripheral inflammation.

***Keywords**: Serotonin, Inflammation, Carrageenan, Parachlorophenylalanine, Myeloperoxidase, Central Nerrow System, Rats.*

چكيده: در مطالعه حاضر نقش سيستم سروتونرژيك مركزي بر التهاب محيطي حاد ايجاد شده توسط تزريق كاراژنين به كف پاي موش صحرايي بررسي گرديد. پاراكلروفنيل آلانين (pCPA) با دوزهاي ۵۰ و ۱۰۰ ميكروگرم براي هر موش صحرايي در حجم ۱۰ ميكروليتر بداخل بطن مغز (i.c.v.) تزريق گرديد و ۲ ساعت بعد با تزريق كاراژنين به كف پا التهاب القا شد. در گروه ديگر pCPA بصورت داخل صفاق (i.p.) با دوز ۱۵۰ ميلي گرم براي هر كيلوگرم به مدت ۳ روز تزريق شد و ۲۴ ساعت بعد التهاب ناشي از كاراژنين ايجاد گرديد. ادم پا در گروه تحت درمان با pCPA (100 µg/rat, i.c.v.) نسبت به گروه كنترل كاهش معني دار داشت($p<0.05$) . تزريق سروتونين اگزوژن با دوز ۰/۷۰ nmol/10µl/rat - پانزده دقيقه پس از ايجاد التهاب در گروه تحت درمان با pCPA – اثرات ضدالتهاب pCPA را بطور كامل از بين برد در صورتي كه دوز ۰/۳۵ nmol/10µl/rat از سروتونين نتوانست اين اثر را ايجاد نمايد. فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز در گروه هاي تحت درمان با pCPA (i.p. يا i.c.v.) بصورت معني دار نسبت به گروه كنترل كاهش يافت. تزريق سروتونين اگزوژن با دوز ۰/۷۰ nmol/10µl/rat بصورت i.c.v. ۳۰ دقيقه قبل و يا ۳۰ دقيقه پس از ايجاد التهاب منجر به كاهش معني دار در پاسخ التهابي گرديد در صورتي كه تزريق سروتونين در زمان القاي التهاب هيچگونه اثر التهاب زايي/ ضدالتهابي از خود نشان نداد. نتايج بدست آمده نشان مي دهد كه سروتونين بعنوان يك نوروترانسميتر سيستم عصبي مركزي مي تواند در تنظيم پاسخ التهابي حاد محيطي نقش ايفا كند.

گل واژه گان: سروتونين، التهاب، كاراژنين، پاراكلروفنيل آلانين، ميلوپراكسيداز، سيستم عصبي مركزي، موش صحرايي.

*نويسنده مسئول: دكتر نسرين مالكي، دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تلفن: ۳۳۷۲۲۵۰؛ نمابر: ۳۳٤٤۷۹۸

*Corresponding Author: Dr. Nasrin Maleki, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences.Tel: 3372250; Fax: 3344798; E-mail: melekins2002@yahoo.com

مقدمه

ارتباط بين سيستم ايمني و سيستم عصبي مركزي يك گفتگوي متقابل و دو طرفه است. سايتوكاين هاي مترشحه از سيستم ايمني مي توانند بر اعمال سيستم عصبي مركزي تاثير گذارند و بطور متقابل سلولهاي سيستم عصبي مركزي قادر هستند پيامبرهاي شيميايي سنتز كنند كه منجر به تغيير در اعمال و رفتار سلولهاي سيستم ايمني مي شوند.

سروتونين (5HT) يكي از مواد شيميايي مترشحه توسط سيستم عصبي مركزي است كه در رده پستانداران به وفور وجود دارد. نقش اين ماده در CNS و دستگاه گوارش بخوبي مشخص شده است (٢-١). تحقيقات اخير نشان داده است كه سروتونين مي تواند از طريق تاثير بر سلولهاي سيستم ايمني و مدياتورهاي شيميايي پاسخ هاي التهابي را تنظيم نمايد (٣). پاراكلروفنيل آلانين (pCPA) يك مهار كننده برگشت ناپذير آنزيم تريپتوفان هيدروكسيلاز است كه با جلوگيري از سنتز سروتونين باعث تخليه طولاني مدت سيستم سروتونژيك از سروتونين مي شود. تجويز pCPA به موشهاي صحرايي توانسته است بخوبي التهاب مزمن ايجاد شده در مدل حيواني آرتريت ناشي از آجووانت را مهار كند (۴). همچنين نشان داده شده است كه افزايش غلظت سروتونين در CNS به واسطه تجويز مهار كننده هاي اختصاصي برداشت سروتونين (SSRIs) شدت التهاب ناشي از آرتريت را افزايش داده است (۵). در التهاب ناشي از كاراژنين كه يك التهاب حاد مي باشد در طي فاز اول التهاب (ساعت اول) غلظت سروتونين در مغز و شاخ خلفي نخاع موش صحرايي افزايش مي يابد (٧-۶). نشان داده شده است كه تجويز فلوكستين قبل، همزمان و يا بعد از القاي التهاب توسط كاراژنين منجر به كاهش پاسخ التهابي شده است (٨).

هدف ما در اين مطالعه، ارزيابي نقش سروتونين در التهاب حاد محيطي مي باشد. در اين تحقيق سعي در يافتن پاسخ چهار سوال نموده ايم: (١) آيا تخليه سروتونين مركزي يا محيطي تاثيري بر روند شدت التهاب حاد محيطي دارد؛ (٢) آيا تجويز سروتونين اگزوژن مي تواند اثرات ناشي از تخليه سروتونين را معكوس نمايد؛ (٣) با توجه به اثرات التهاب زايي سروتونين آيا افزايش غلظت سروتونين در CNS مي تواند در شروع و شدت التهاب تاثير گذارد و (۴) آيا "زمان تجويز" عامل مهمي در تعيين اثر سروتونين اگزوژن است؟

مواد و روش كار

مواد شيميايي

ملح اتيل استرپاراكلروفنيل آلانين، سروتونين، كاراژنين λ، آنزيم ميلوپراكسيداز، ديانيزيدين دي هيدروكلراید، هگزا دسيل تري متيل آمونيوم بروماید، گزيلن، هماتوكسيلين، ائوزين، پارافين از نمايندگي هاي كمپاني سيگما در ايران خريداري شدند.

حيوانات

موش هاي صحرايي نر از نژاد ويستار در محدوده وزني ٢٥٠-٢٠٠ گرم از حيوانخانه دانشگاه علوم پزشكي تبريز خريداري شدند. هر شش موش در يك قفس استاندارد از جنس پروپيلن نگهداري مي شدند و دسترسي كافي با آب و غذا داشتند. بدنبال كانول گذاري مغزي براي جلوگيري از آسيب كانول، هر موش در يك قفس به تنهايي نگهداري مي شد. از هيجده ساعت قبل از ايجاد التهاب غذاي موشها قطع مي شد ولي دسترسي آزاد به آب وجود داشت. موشها حداقل يك ساعت قبل از شروع آزمايش به آزمايشگاه آورده مي شدند و هر موش فقط يكبار در طي مطالعه مورد آزمايش قرار مي گرفت.

كانول گذاري مغزي

ابتدا موشها با تزريق i.p. تيوپنتال سديم با دوز ۵٠ ميلي گرم بر كيلوگرم بيهوش شدند و در صورت نياز به تجويز مجدد از دوز ۵ ميلي گرم بر كيلوگرم از تيوپنتال سديم در طي جراحي استفاده مي شد. پس از بيهوشي، موش در دستگاه استرئوتاكس (Steolting, USA) قرار مي گرفت و كانول i.c.v. راهنما را در مختصات بطن مغز به صورت: P: -0.8 mm, L: 1.4 mm, V: 3.3 mm مطابق روش

Paxinos و Watson (٩) قرار مي داديم. پس از اتمام آزمايش مغز تمامي موشهايي كه در آنها كانول i.c.v. قرار داده شده بود به روش رنگ آميزي مورد بررسي قرار مي گرفت تا از محل صحيح ورود كانول مغزي اطمينان حاصل كنيم.

ادم ناشي از كاراژنين در پاي موش صحرايي

جهت ايجاد ادم به پاي راست موشها ١٠٠ ميكروليتر از سوسپانسيون كلوئيدي كاراژنين ١% تزريق شد (١٠). تزريق كاراژنين منجر به قرمزي و تورم قابل مشاهده در پاي موشها شد كه در ساعت چهارم به اوج خود رسيد و تا ٤٨ ساعت بعد ادامه داشت. حجم پا توسط دستگاه پلتيسمومتر (UGO BASILE 7140, Italy) بلافاصله قبل و سپس هر ساعت تا ساعت چهارم اندازه گيري شد. اعداد بدست آمده بر حسب درصد افزايش در حجم پا محاسبه گرديد و با مقادير گروه كنترل مقايسه گرديد.

اندازه گيري فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز

ادم ناشي از كاراژنين به ترتيبي كه در فوق بيان شد ايجاد گرديد. در ساعت ٤ (اوج التهاب) موشها با اتركشته شده و سپس قطع نخاع مي شدند. پاي ملتهب توسط گيوتين (شركت رازي راد، ايران) قطع مي شد. بافت نرم پا جدا شده و در پليت محتوي ١ ميلي ليتر بافر فسفات ٥٠mM حاوي ٠/٥% HTAB قرار داده مي شد. بافت جدا شده به لوله هموژنايزر منتقل مي شد و پليت دو بار هر بار با ١ ميلي ليتر محلول بافر حاوي HTAB شستشو داده مي شد. به لوله هموژنايزر بافر بيشتري اضافه مي شد تا جايي كه به ازاي هر ٠/١ گرم از بافت پا ٥ ميلي ليتر بافر وجود داشته باشد. بافت ٥ بار و هر بار به مدت ٤٥ ثانيه، به فواصل يك دقيقه، در سرعت ٨٥٠٠ دور در دقيقه با استفاده از دستگاه هموژنايزر (IKA, Labortechnik, Germany) هموژنيزه شد.

بافت هموژنيزه شده در حمام يخ به مدت ١٠ ثانيه تحت عمل sonication قرار گرفت و سپس ٣ بار تحت انجماد (توسط گاز نيتروژن) و ذوب قرار گرفت و دوباره عمل sonication به مدت ١٠ ثانيه در حمام يخ انجام گرفت. سوسپانسيون به دست آمده در دماي ٥ درجه سانتي گراد با سرعت ٣٠٠٠ دور در دقيقه سانتريفوژ (Hettich, D-78532 Tuttlingen, Germany) شد. فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز با استفاده از اسپكتروفتومتر اندازه گيري شد. براي اين كار ٠/١ ميلي ليتر از محلول زلال رويي سانتريفوژ شده با ٢/٩ ميلي ليتر بافر فسفات ٥٠mM (pH=٦) حاوي ديانيزيدين دي هيدروكلراید (٠/١٦٧ ميلي گرم بر ميلي ليتر) و ٠/٠٠٥% پراكسيد هيدروژن واكنش داده شد. جذب رنگ به دست آمده از اين واكنش در طول موج ٤٠٠nm با استفاده از اسپكتروفتومتر (Cecil 9000 UV/VIS) اندازه گيري شد. فعاليت ميلوپراكسيداز بر حسب ميلي يونيت در ١٠٠ ميلي گرم وزن بافت تازه پا بيان شد (١٠).

مطالعات هيستولوژيك

قطعاتي از بافت پا در ساعت چهارم جدا شده و در فرمالين ١٠% فيكس شدند. پس از تهيه برشهاي مناسب، نمونه ها توسط هماتوكسيلين و ائوزين رنگ آميزي شدند و در زير ميكروسكوپ مورد مطالعه قرار گرفتند.

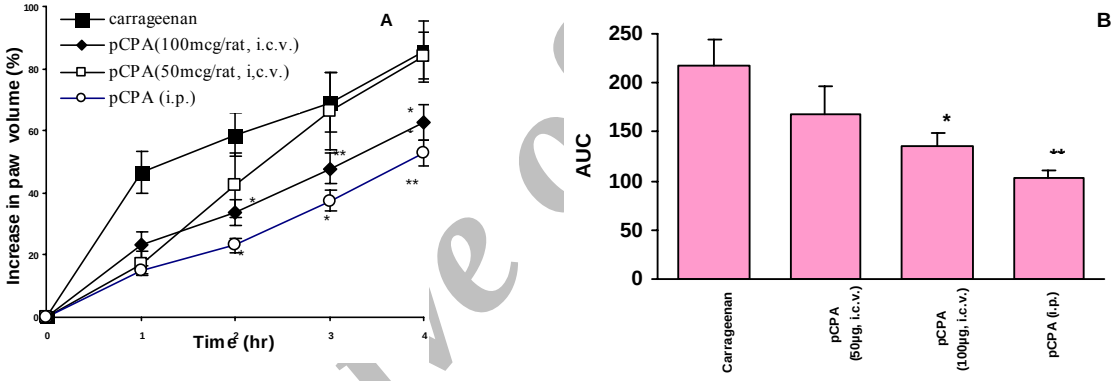
مطالعات آماري

نتايج بصورت ميانگين ± انحراف معيار از ميانگين (mean±s.e.m.) بيان شده اند. التهاب ناشي از كاراژنين و فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز با استفاده از آناليز واريانس (ANOVA) يك سويه و تست بعدي Student-Newman-keuls مورد بررسي آماري قرار گرفتند. اختلاف بين گروه ها در P<٠/٠٥ معني دار تلقي گرديد.

نتايج

اثر تخليه سروتونين توسط **pCPA** بر ادم ناشي از كاراژنين

در اين مطالعه دستور كار عبارت بود از: (الف) تزريق i.c.v. دوزهاي ۱۰۰ µg/rat و ۵۰ از pCPA (۱۱) و القاي التهاب ۲ ساعت بعد با تزريق ۱۰۰ ميكروليتر كاراژنين به كف پاي موش صحرايي؛ (ب) تزريق (۱۵۰ mg/kg, i.p) pCPA به مدت ۳ روز (۴) و القاي التهاب ۲۴ ساعت بعد توسط تزريق ۱۰۰ ميكروليتر كاراژنين به كف پا موش صحرايي. القاي التهاب حاد در موشهاي گروه كنترل منجر به افزايش بارز در حجم پا شد. اين افزايش ۱ ساعت بعد از تزريق كاراژنين قابل مشاهده بود و در ساعت ۴ به اوج خود رسيد. در اين ساعت حجم پا در گروه كنترل نسبت به مقادير پيش از تزريق كاراژنين در حدود ۹±۸۵/۵% افزايش يافت. pCPA با دوز ۱۰۰ µg/rat در تزريق i.c.v. باعث مهار چشمگير در پاسخ التهاب ناشي از كاراژنين شد. اين مهار در ساعت ۲ (P<۰/۰۵)، ساعت۳ (P<۰/۰۱) و ساعت ۴ (P<۰/۰۱) معني دار بود. درمان موشها با دوز ۵۰ µg/rat (i.c.v.) چنين اثر ضدالتهابي ايجاد نكرد (شكل ۱A). پاسخ التهابي كل كه به صورت سطح زير منحني (AUC) حساب شده است در گروه تحت درمان با pCPA (100 µg/rat, i.c.v.) در حدود ۳۷/۳% نسبت به گروه كنترل كاهش (P<۰/۰۵) يافته است (شكل ۱B).



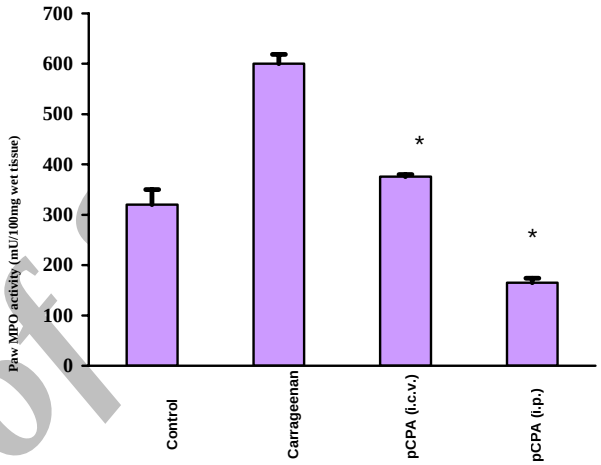
نمودار ۱- مقايسه اثرات ضدالتهابي pCPA در تزريق i.c.v. با دوزهاي ۱۰۰ µg/rat و۵۰ و pCPA بصورت i.p. با دوز ۱۵۰ mg/kg بر ادم ناشي از كاراژنين. تزريق كاراژنين ۲ ساعت پس از تزريق i.c.v. و ۲۴ ساعت پس از تزريق i.p. پاراكلروفنيل آلانين صورت گرفته است. در شكل (A) نتايج حاصل از درصد تغيير حجم پا نسبت به پاي كنترل مربوط به ۶ موش در هر گروه نشان داده شده است. در شكل (B) پاسخ التهابي كل بصورت AUC گروههاي درمان و كنترل با يكديگر مقايسه گرديده است. نتايج بصورت mean±s.e.m. براي گروههاي ۶ تايي از موشها بيان گرديده است. (P<۰/۰۵)* و (P<۰/۰۱) ** در مقايسه با گروه كنترل.

اثر تخليه سروتونين توسط **pCPA** بر فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز

تزريق كاراژنين به كف پاي موش صحرايي ايجاد پاسخ التهابي به صورت تورم و قرمزي نمود كه در ساعت ۴ به اوج خود رسيد. در اين ساعت افزايش بارزي در انفيلتراسيون نوتروفيل ها به پاي موش صورت مي پذيرد كه با اندازه گيري فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز (MPO) در بافت پا به صورت كمي قابل اندازه گيري است. فعاليت MPO در گروهي كه تنها كاراژنين دريافت كرده بودند، ۱۹±۶۰۰ ميلي يونيت در هر ۱۰۰ گرم بافت تازه بود كه نسبت به فعاليت اين آنزيم در گروه موش هاي طبيعي (بدون دريافت هر گونه دارو) كه ۳۰±۳۲۰ ميلي يونيت در هر ۱۰۰ گرم بافت تازه بود افزايش معني دار داشت. تزريق pCPA (۱۰۰ µg/rat, i.c.v.) منجر به كاهش ۳۷/۴% در فعاليت آنزيم شد

(P<٠/٠٥)، (٣٧٥/٦±٤/٥) ميلي يونيت در هر ١٠٠ گرم بافت تازه).

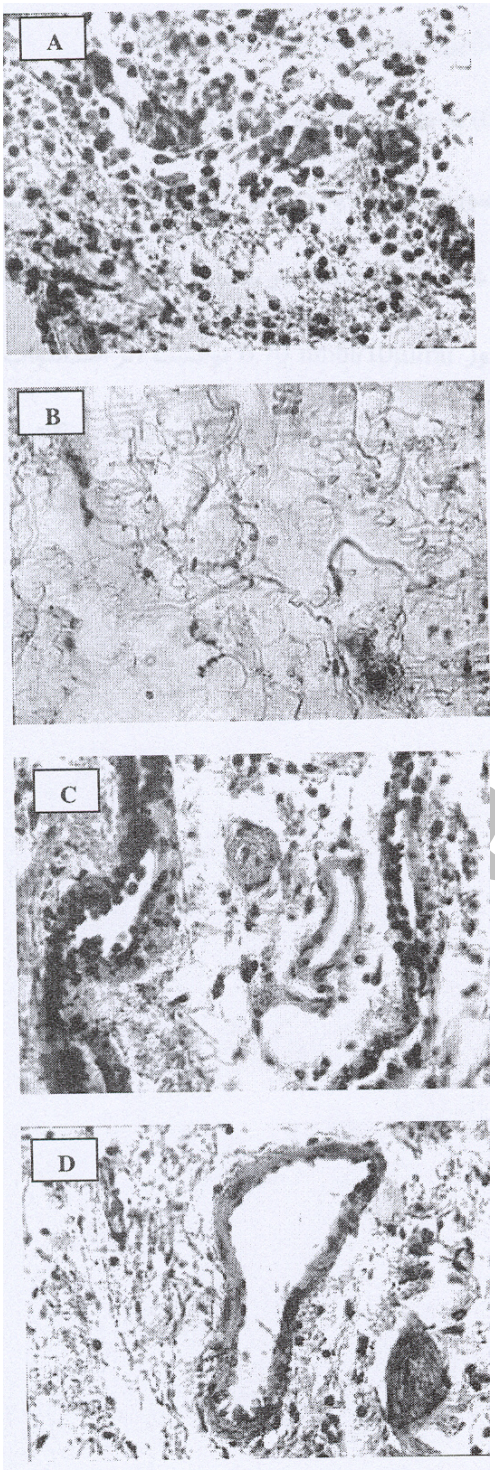
همچنين تزريق pCPA (150 mg/kg, i.p.) به مدت سه روز منجر به كاهش چشم گير ٧٢/٥% (P<٠/٠١) در فعاليت آنزيم شد (١٦٤/٧±٩/٣ ميلي يونيت در هر ١٠٠ گرم بافت تازه) ؛ (شكل ٢).



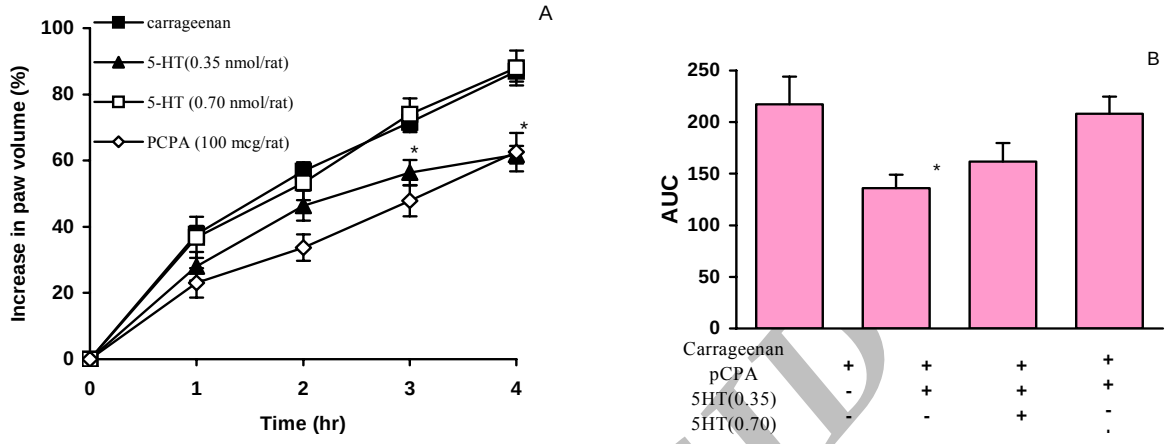
نمودار ٢- اثر pCPA بر فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز در پاي ملتهب موش صحرايي. pCPA با دوز ١٠٠µg/rat بصورت .i.c.v دو ساعت قبل از القاي التهاب و با دوز ١٥٠ mg/kg بصورت .i.p به مدت سه روز تا ٢۴ ساعت قبل از القاي التهاب تجويز مي گرديد. نتايج بصورت .mean±s.e.m براي گروهاي ۶ تايي از موشها بيان گرديده است. (P<٠/٠٥)* و (P<٠/٠١) ** در مقايسه با گروه كنترل.

مطالعات بافتي اثر **pCPA** بر ادم ناشي از كاراژنين

مطالعات ميكروسكوپيك بافت پاي موش هاي صحرايي كه كاراژنين دريافت كرده بودند مشخص كننده ادم شديد و انفيلتراسيون گسترده پلي مورفونوكلئورها به ناحيه درم در پاي ملتهب مي باشد (شكل ٣A). همچنين اتصال نوتروفيل ها به اندوتليوم عروق به منظور مهاجرت (دياپدزيس) و واسكوليت در اطراف عروق موجود در درم در گروه دريافت كننده كاراژنين مشاهده مي شود (شكل ٣C). بيشتر اين تغييرات در گروه تحت درمان با PCPA به صورت .i.p كاهش يافته است (شكل هاي ٣B و ٣D).



نمودار ٣- نمونه هاي بافتي از موشهاي صحرايي كه (A) كاراژنين تزريق شده اند، بيانگر ادم و انفيلتراسيون شديد PMNs به درم مي باشد. (B) درمان با PCPA با دوز ١٥٠ mg/kg بصورت .i.p باعث كاهش ادم و تجمع PMNs در درم شده است. تجمع شديد PMNs و خروج آنها از عروق در گروه دريافت كننده كاراژنين در شكل (C) مشخص است كه درمان با pCPA (شكل D) باعث كاهش آن شده است. بزرگنمايي ۴٠×



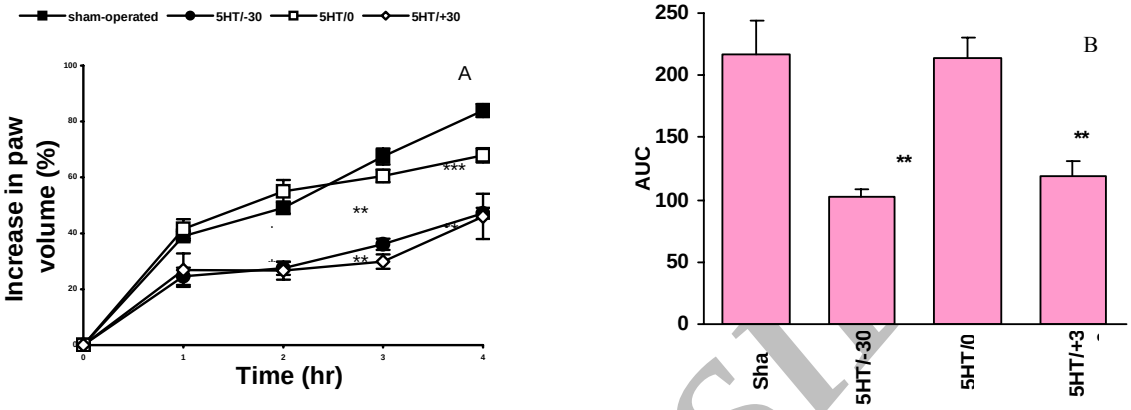
نمودار ۴- اثر تجويز سروتونين (0.35 and 0.70 nmol/10µl/rat, i.c.v) بر اثرات ضدالتهابي ناشي از تزريق pCPA. سروتونين(5HT) ۱۵ دقيقه پس از ايجاد التهاب توسط كاراژنين تزريق گرديد. در شكل (A) نتايج حاصل از درصد تغيير حجم پا نسبت به پاي كنترل مربوط به ۶ موش در هر گروه نشان داده شده است. در شكل (B) پاسخ التهابي كل بصورت AUC گروههاي درمان و كنترل با يكديگر مقايسه گرديده است. نتايج بصورت mean±s.e.m. براي گروهاي ۶ تايي از موشها بيان گرديده است. (P<۰/۰۵)* در مقايسه با گروه كنترل.

اثرتجويز سروتونين (5HT) بر ادم ناشي از كاراژنين در موشهاي صحرايي درمان شده با pCPA (i.c.v.)

سروتونين با دوزهاي (0.35 and 0.70 nmol/10µl/rat, i.c.v) به موش هاي تحت درمان با PCPA با دوز (۱۰۰ µg/rat, i.c.v.) تزريق گرديد. نتايج نشان داد كه تجويز سروتونين به صورت وابسته به دوز مي تواند اثرات ضدالتهاب pCPA را معكوس نمايد. با دوز 0.35 nmol/10µl/rat كاهش ادم ايجاد شده توسط pCPA در ساعات ۱ و ۲ معكوس شد ولي هنوز در ساعات ۳ و ۴ معني دار بود (P<۰/۰۵). سروتونين با دوز 0.70 nmol/10µl/rat توانست اثر ضدالتهاب pCPA را به صورت كامل بازگرداند (شكل ۴A). در شكل ۴B پاسخ التهابي كل به صورت AUC گروههاي درمان و كنترل با يكديگر مقايسه گرديده است.

اثرتجويز سروتونين بصورت i.c.v. بر ادم ناشي از كاراژنين در موشهاي صحرايي

به منظور تعيين اثر افزايش غلظت سروتونين مركزي بر شروع و شدت التهاب و همچنين تاثير "زمان تجويز" بر اين اثرات، تزريق سروتونين (5HT) به بطن مغز (0.70 nmol/10µl/rat, i.c.v) در سه برنامه زماني انجام گرفت: ۳۰ دقيقه پيش از القاي التهاب (5HT/-30)، هم زمان با القاي التهاب (5HT/0) و ۳۰ دقيقه پس از القاي التهاب (5HT/+30). تجويز سروتونين در گروه (5HT/0) هيچ گونه اثرات التهاب زايي يا ضد التهابي از خود نشان نداد. در صورتي كه تزريق آن در گروه (5HT/-30) باعث كاهش حجم پا در ساعات ۲ (P<۰/۰۱)، ۳ و ۴ (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه كنترل (sham-operated) شد. اين كاهش در زمان هاي ذكر شده به ترتيب برابر ۴۳/۹، ۴۶/۵ و ۴۳/۶% بودند. برخلاف تصور ما تزريق سروتونين به گروه (5HT/+30) نيز باعث كاهش ادم در ساعات ۲ (P<۰/۰۱)، ۳ و ۴ (P<۰/۰۰۱) به ترتيب به ميزان ۴۵/۷، ۵۵/۶ و ۴۵/۱% گشت (شكل ۵A). پاسخ التهابي كل نيز به صورت معني داري در گروه هاي (5HT/-30) و (5HT/+30) به ميزان ۴۹/۷ و ۴۵/۳% كاهش يافت (شكل ۵B).



نمودار ۵- اثرات سروتونين (0.70 nmol/10µl/rat, i.c.v) بر ادم ناشي از كاراژنين. تزريق سروتونين (5HT) ٣٠ دقيقه پيش از القاي التهاب (5HT/-30)، همزمان با القاي التهاب (5HT/0) و ٣٠ دقيقه پس از القاي التهاب (5HT/+30) انجام گرفت. در شكل (A) نتايج حاصل از درصد تغيير حجم پا نسبت به پاي كنترل مربوط به ۶ موش در هر گروه نشان داده شده است. در شكل (B) پاسخ التهابي كل بصورت AUC گروههاي درمان و كنترل با يكديگر مقايسه گرديده است. نتايج بصورت mean±s.e.m. براي گروههاي ۶ تايي از موشها بيان گرديده است. (P<٠/٠١)** و(P<٠/٠٠١)*** در مقايسه با گروه كنترل.

بحث و نتيجه گيري

التهاب ناشي از كاراژنين از دوفاز متمايز تشكيل شده است كه فاز اول از دقايق ابتدايي تزريق آغاز شده و در عرض يك ساعت كامل مي گردد. در حالي كه فاز دوم پس از ساعت اول آغاز شده و حداقل به مدت ٣ ساعت ادامه مي يابد (١٢). همچنين مشخص شده است كه غلظت سروتونين مغزي در طي ادم ناشي از كاراژنين در پاي موش صحرايي تغييرات دوفازي دارد؛ در شروع واكنش التهابي افزايش سريع و بدنبال آن افت مقادير سروتونين مغزي به زير مقدار طبيعي مشاهده مي شود (١٣). در اين بررسي ما نشان داديم كه بدنبال تخليه سروتونين مغزي و يا تخليه كل سروتونين بدن توسط pCPA (مهار كننده آنزيم تريپتوفان هيدروكسيلاز) كاهش كاملا معني داري در شدت التهاب پا نسبت به گروه كنترل ديده مي شود. كاهش در فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز بعنوان شاخص تجمع نوتروفيلي و نتايج بدست آمده از مطالعات بافتي در بافت ملتهب دليل ديگري بر اين مطلب است كه تخليه سيستم سروتونرژيك منجر به ايجاد اثرات ضدالتهابي مي گردد. مشابه نتايج بدست آمده از اين تحقيق در مدل التهابي مزمن آرتريت ناشي از آجووانت نيز نشان داده شده است (۴). نتايج بدست آمده مشخص مي كند كه سروتونين مغزي در ايجاد التهاب محيطي مي تواند نقش داشته باشد. اثرات ضدالتهابي بيشتر pCPA به هنگام تجويز .i.p در ادم پا و فعاليت ميلوپراكسيداز را مي توان به تخليه ذخاير محيطي سروتونين (پلاكت ها) در صورت تجويز داخل صفاق pCPA نسبت داد.

به منظور اطمينان هرچه بيشتر از دخالت سروتونين مركزي در تنظيم التهاب محيطي، به موشهايي كه pCPA در آنها اثرات ضدالتهابي ايجاد كرده بود سروتونين را بصورت داخل بطن مغزي تجويزنموديم. تزريق سروتونين در فاز اول التهاب توانست بطور كامل اثرات pCPA را برگرداند و اين نتيجه احتمال دخالت موثر سروتونين مركزي در التهاب محيطي را تاييد مي نمايد. نقش سروتونين بعنوان يك رابط بين سيستم ايمني و سيستم عصبي در آرتريت مزمن مطرح شده است و مكانيسم آن تحريك توليد mRNAs يكسري از سايتوكاين ها مانند IL-6, TNFα, TGFβ عنوان شده است (١۴). در التهاب حاد با توجه به عدم وجود زمان كافي براي اثرات القايي سروتونين بر توليد mRNAs توجيه

اثرات با مكانيسم تحريك توليد mRNAs منطقي به نظر نمي رسد. اين حقيقت مشخص شده است كه التهاب نوروژنيك منجر به آزاد شدن substance P (SP) و ديگر نوروپپتيدهاي التهابي از انتهاي اعصاب حسي مي شود (۱۶-۱۵). انواع مختلفي از گيرنده هاي سروتونيني در اعصاب حسي وجود دارند كه مي توانند اثرات مهاري يا تحريكي بر آزادسازي substance P اعمال كنند (۱۷). نشان داده شده است كه آزاد شدن سروتونين و تحريك گيرنده هاي $5HT_3$ براي اثر گيرنده هايSP در التهاب آلرژيك ضروري است (۱۸). با توجه به اين دلايل احتمال داده مي شود كه حداقل قسمتي از اثرات مركزي سروتونين بر التهاب محيطي از طريق تاثير بر آزاد سازيSP از انتهاي اعصاب حسي واسطه گري شود.

با توجه به اثرات التهاب زايي سروتونين، ما اين فرضيه را مطرح نموديم كه افزايش در غلظت سروتونين مركزي مي تواند اثرات تشديد كننده بر شروع و شدت التهاب بگذارد. ولي بر خلاف اين فرضيه تزريق سروتونين ۳۰ دقيقه قبل و يا ۳۰ دقيقه بعد از القاي التهاب منجر به كاهش معني داري در شدت التهاب شد؛ در صورتي كه تزريق همزمان آن با كاراژنين هيچ گونه اثرضدالتهابي/التهاب زايي ايجاد ننمود. اثرات ضدالتهاب در عرض يكساعت شروع شده و در عرض ۳ ساعت پس از القاي التهاب به حداكثر ميزان خود مي رسيد. پيش تر هم نشان داده شده بود كه تزريق i.c.v. سروتونين، نيم ساعت قبل از كاراژنين، باعث كاهش ادم مي گردد (۱۳). تناقض بين نتايج بدست آمده از تزريق سروتونين به موشهاي تخليه شده از سروتونين توسط pCPA و تزريق سروتونين اگزوژن به موشهاي دست نخورده ۳۰ دقيقه قبل و يا بعد از كاراژنين را مي توان با اثرات زنگوله اي شكل (bell-shaped) سروتونين توجيه نمود. نشان داده شده است كه هم سروتونين و هم آنتاگونيست هاي آن باعث مهار مهاجرت لوكوسيت هاي منونوكلئار مي شوند (۱۹). همچنين ديده شده است كه سروتونين با غلظت هاي خوني بسيار پايين و بسيار بالا اثرات تضعيف كنندگي بر فعاليت ضد باكتريايي پلي مورفونوكلئارها دارد در صورتي كه در غلظت هاي متوسط باعث افزايش قدرت دفاعي پلي مورفونوكلئارها مي شود (۲۰). اثرات سروتونين اگزوژن بر تجمع ونولي پلي مورفونوكلئارها نيز از پاسخ زنگوله اي شكل (bell-shaped) تبعيت مي نمايد (۲۱). مكانيسم احتمالي براي تناقض ديده شده مي تواند اين مطلب باشد كه در موشهاي تخليه شده از سروتونين، تجويز سروتونين اگزوژن منجر به اتصال سروتونين به دسته اي از گيرنده ها مي شود كه اثرات التهاب زايي را واسطه گري مي كنند ولي با افزايش غلظت سروتونين مركزي ساير گيرنده هاي سروتونيني كه اثرات ضد التهاب را واسطه گري ميكنند فعال شوند. كاهش فعاليت سيستم ايمني با مواد آزاد كننده سروتونين (مشتقات آمفتامين) نيز نشان داده شده است (۲۲). وابستگي اثرات ايمونولوژيك سروتونين به غلظت آن توسط Mössner و همكارانش مورد بررسي قرار گرفته است (۲۳).

بطور خلاصه نتايج بدست آمده از اين مطالعه نشان داد كه سيستم سروتونرژيك مركزي مي تواند بر التهاب محيطي تاثير داشته باشد. طبيعت پيچيده اثرات سروتونين و گوناگوني گيرنده هاي آن تجزيه و تحليل نقش دقيق سروتونين در التهاب را مشكل مي سازد. وجود گيرنده هاي متفاوت سروتونيني در اعصاب حسي مي تواند توجيهي براي اثرات پيچيده سروتونين در التهاب باشد.

تشكر و قدرداني

اجراي اين تحقيق بدون حمايت مالي شوراي محترم پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي تبريز ميسر نبود. بدينوسيله از معاونت محترم پژوهشي و اعضاي بزرگوار شوراي پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي تبريز و دانشكده داروسازي سپاسگزاري مي نماييم.

Refrences :

1. Carlsson A, Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission. Annu. Rev Neurosci 1987; 10:19-40.
2. Sandyk R, L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. Int J Neurosci 1992; 67:122-144.
3. Serafeim A, Gordon J, The immune system gets nervous. Curr Opinion Pharmacol 2001; 1; 398-403.
4. Harbuz MS, Perveen-Gill Z, Lalies MD, Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS, The role of endogenous serotonin in adjuvant-induced arthritis in the rat. Br J Rheumatol 1996; 35:112-116.
5. Harbuz MS, Marti O, Lightman SL and Jessop DS. Alteration of central serotonin modifies onset and severity of adjuvant-induced arthritis in the rat. Br J Rheumatol 1998; 37**:**1077-1083.
6. Bhattacharya SK, Das N, Mohan Rao PJR. Brain monoamines during carrageenan-induced acute paw inflammation in rats. J Pharm Pharmacol 1988; 40:518-520.
7. Zhang YQ, Gao X, Zhang LM, Wu GC, The release of serotonin in rat spinal dorsal horn and periaqueductal gray following carrageenan inflammation. Neuroreport 2000; 11: 3539-3543.
8. Abdel-salam OME, Baiuomy AR, Arbid MS, Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat. Pharmacol Res 2004; 49:119-131.
9. Paxinos G, Watson C, The rat brain in sterotaxic coordinates. Academic press, Sydney, 1982.
10. Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Eftekhar Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N, Potent Anti-Inflammatory activities of Hydroalcoholic Extract from Aerial Parts of Stachys Inflata on Rats. J Ethnopharmacol 2001; 75:213-218.
11. Bodnar RJ, Kordower JH, Reches A, Wallace MM, Fahn S, Reductions in pain thresholds and morphine analgesia following intracerebroventricularly para-chlorophenylalanine. Pharmacol Biochem Behav 1984; 21(1):79-84.
12. Van Arman CG, Oedema and increased vascular permeability. In: Vane JR, Ferreira SH, editors. Handbook of experimental pharmacology. New York: Springer-Verlag, 1979; p.75-91.
13. Bhattacharya SK, Das N, Central serotonergic modulation of carrageenan-induced pedal inflammation in rats. Pharm Res 1985; 85:315-318.
14. Pousset F, Fournier J, Legous P, Effect of serotonin on cytokine mRNA expression in rat hippocampal astrocytes. Mol Brain Res 1996; 38:54-62.
15. Meggs WJ, Neurogenic inflammation and sensitivity to environmental chemicals. Environ Health Perspect 1993; 101:234-238.

16. Meggs WJ, Neurogenic switching: A hypothesis for a mechanism for shifting the site of inflammation in allergy and chemical sensitivity. Environ Health Perspect 1995; 103:54-56.
17. Chen JJ, Vasko MR, Wu X, Staeva ThP, Baez M, Zgombick JM, Nelson DL, Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. J Pharmacol Exp Ther 1998; 287(3):1119-1127.
18. Moore KA, Oh EJ, Weinreich D, 5-HT3 receptors mediate inflammation-induced unmasking of functional tachykinin responses in vitro. J Appl Physiol 2002; 92:2529-2534.
19. Bondesson L, Nordlind K, Lidén S, Sundström E, Inhibiting effects of serotonin and serotonin antagonists on the migration of mononuclear leukocytes. Immunopharmacol Immunotoxicol 1993; 15:243-250.
20. Schuff-Werner P, Splettstowsser W, Antioxidative properties of serotonin and the bactericidal function of polymorphonuclear phagocytes. Adv Exp Med Biol 1999; 467:321-325.
21. Yamaki K, Thorlacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P, Raud J, Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentry. Br J Pharmacol 1998; 123:390-399.
22. Conner ThJ, Kelly JP, Leonard BE, An assessment of the acute effects of the serotonin releasers methylenedioxymethamphetamine, methylenedioxyamphetamine and fenfluramine on immunity in rats. Immunopharmacol 2000; 46:223-235.
23. Mössner R, Lesch KP, Role of serotonin in immune system and in neuroimmune interactions. Brain Behav Immun 1998; 12:249-271.