

مهار خیز ناشی از سوختگی یا کاراگینین توسط تری فلوثوپرازین و تیودی فنیل آمید کلراید در رت

محمد خاکساری (Ph.D.)*

علی خوش باطن (Ph.D.)**

چکیده

سابقه و هدف : کالمودولین، یک پروتئین متصل شونده به کلسیم است که بسیاری از اعمال داخل یاخته ای کلسیم را واسطه‌گری می‌نماید. مهارکننده‌های کالمودولین که دارای اعمال ضد روان‌پریشی هستند، اعمال غیر مغزی آنها کمتر مطالعه شده است؛ بنابراین در پژوهش حاضر اثر ضد التهابی سه مهار کننده فنوتیازینی کالمودولین روی خیز التهابی ناشی از سوختگی یا کاراگینین بررسی شده و این اثرات با اثرات ضد التهابی ایبوپروفن مقایسه شد.

مواد و روش‌ها : این مطالعه مداخله‌ای-تجربی روی رت‌های بالغ نر انجام شد. دو سری سوختگی درجه دو در پشت رت‌ها ایجاد شد و همچنین التهاب حاد پنجه توسط تزریق داخل کف پنجه ۱ میلی‌متر محلول کاراگینین ۰/۵ درصد ایجاد شد. تری فلوثوپرازین (TFP)، تیودی فنیل آمید کلراید (TDPAC) و کلروفنوتیازین با دوزهای ۸ mg/kg و ۳۲ mg/kg و ایبوپروفن با غلظت ۱۲ mg/kg به صورت i.p. و بعد از ایجاد سوختگی یا بعد از تزریق کاراگینین مصرف شدند. میزان خیز التهابی با اندازه‌گیری محتوای آب، مقدار رنگ آبی ایوانز (Evans Blue) خارج عروقی در بافت ملتهب و اندازه‌گیری تغییرات حجم پنجه تعیین گردید.

نتایج : تجویز دوز ۳۲ mg/kg TFP محتوای رنگ آبی ایوانز و همچنین محتوای آب را در پوست سوخته تحت درمان با این دارو در مقایسه با گروه کنترل (گروه سوخته درمان نشده) به طور معنی‌داری به میزان ۲۹ درصد کاهش داد، در حالی که دو داروی دیگر بی‌اثر بودند. اثر TFP روی محتوای رنگ یا نشت پروتئین در پوست سوخته قابل مقایسه با ایبوپروفن است؛ اگرچه، TFP، محتوای آب را در پوست سوخته به طور معنی‌داری به میزان ۲۲/۲ درصد بیشتر از ایبوپروفن مهار کرده است. TFP و TDPAC افزایش حجم پنجه ناشی از کاراگینین را به ترتیب به میزان ۳۸/۲ درصد و ۵۵/۳ درصد مهار نمودند. و همچنین TFP محتوای رنگ را در پنجه ملتهب به میزان ۴۵/۸ درصد مهار نمود. اثر ایبوپروفن بر روی مهار افزایش حجم پنجه بیشتر از اثر TFP بود ولی تفاوت معنی‌داری برای اثر مهار این دو دارو روی کاهش رنگ آبی مشاهده نشد.

استنتاج : این نتایج پیشنهاد می‌کنند که مصرف مهار کننده کالمودولین (TFP) خیز التهابی حاد بعد از سوختگی و خیز ناشی از تزریق کاراگینین را کاهش می‌دهد، به طوری که اثر مهار آن قابل مقایسه با اثر ایبوپروفن است.

واژه‌های کلیدی : سوختگی، کاراگینین، خیز التهابی، مهارکننده‌های کالمودولین، تری فلوثوپرازین

* دانشیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان

✉ رفسنجان- میدان انقلاب- دانشکده پزشکی رفسنجان- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی

** استادیار گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه...

مقدمه

تجمع موضعي مابع يا خيز يكي از ويژگي‌هاي بارز التهاب حاد است و از سوي ديگر در بيماري‌هاي التهابي از قبيل ورم مفاصل، آسم، و كهير، پيدايش خيز بافتي تعيين كننده است، به طوري كه داروهاي ممانعت كننده تشكيل خيز بافتي، داراي توان درماني در التهاب مي‌باشند (۱). همچنين تشكيل خيز در بافت‌هاي خيلي نرم در بعد از سوختگي رخ مي‌دهد و اگر اين خيز شديد باشد، بهبودي زخم بعد از سوختگي را دچار اختلال مي‌كند و كمك به تبديل جراحت سوختگي با ضخامت نسبي به جراحت سوختگي با ضخامت كامل مي‌نمايد (۲). اگرچه فرآيند تشكيل خيز در ظرف ۶۰ سال گذشته به ميزان زيادي مطالعه شده است، اما راجع به پاتولوژي و سازوكارهاي تشكيل خيز خصوصاً خيز سوختگي اطلاعات اندكي در دسترس است؛ اگرچه اين موضوع مورد قبول همه است كه اكثر جنبه‌هاي التهاب حاد (مانند التهاب بعد از سوختگي و التهاب ناشي از كاراگنين) از طريق رهايش ميانجي‌هاي مختلف التهابي از قبيل هيستامين، سروتونين، برادي كينين، سيتوكين‌ها، كمپلمان‌ها، ايكوزانويدها، ماده P، NO، و CGRP از بافت‌هاي ميزبان رها مي‌شوند و وجود اين ميانجي‌ها براي فرآيند التهاب حاد ضروري است (۳).

حركت كلسيم، احتمالاً يك عامل مهم در فعال شدن ياخته‌هاي دخیل در التهاب است. كلسيم اين عمل خود را يا از طريق رهايش دانه‌هاي ترشحي از ياخته‌هاي تيرك‌دار و ساير ياخته‌هاي دخیل در التهاب اعمال مي‌كند (۴،۳)؛ يا از طريق فعال كردن آنزيم‌هاي داخل ياخته‌اي (۵) و يا به عنوان واسطه براي ايجاد اثرات ميانجي‌هاي التهابي و پيدايش پاسخ براي تركيبات فوق (۶) عمل مي‌نمايد. با توجه به شواهد فوق فرض مي‌شود كه كلسيم در پيدايش التهاب يا خيز بافتي نقش دارد.

اگرچه سازوكار داخل ياخته‌اي عمل كلسيم به تازگي شناخته شده است، يك مسير براي عمل كلسيم از طريق يك گروه از پروتئين‌هاي متصل شونده به كلسيم مطرح شده است كه مستقيماً آنزيم‌هاي داخل ياخته‌ها را فعال مي‌كنند. كالمودولين يك پروتئين متصل شونده به كلسيم است كه به فراواني در داخل ياخته‌ها وجود دارد و در سال ۱۹۷۰ توسط كاليوچي و يامازاكي (Yamazaki ، Kakiuchi) كشف شد (۷). اين پروتئين بعد از اتصال به كلسيم توانايي دارد كه تعداد زيادي از آنزيم‌ها را در *in vitro* فعال كند. مجموعه كلسيم- كالمودولين مي‌تواند پروتئين كينازهاي معيني را فعال كند كه منجر به فسفريلاسيون و دفسفريلاسيون آنزيم‌ها شده و فعاليت آنزيم‌ها را تحت تاثير قرار مي‌دهد. همچنين ابتدا نشان داده شده كه اين مجموعه فعال كننده فسفودي استراز است (۹،۸). با توجه به بيان فوق كه كالمودولين بسياري از اعمال وابسته به كلسيم را در انواعي از ياخته‌ها واسطه مي‌نمايد، بنا بر اين، يكي از راه‌هاي آزموون فرضيه نقش كلسيم در التهاب، مهار كالمودولين توسط مهار كننده‌ها يا آنتاگونيست‌هاي كالمودولين است. از سوي ديگر گزارش شده است كه مهار كننده‌هاي كالمودولين توانايي مهار PLA₂ و توليد پروستاگلاندين‌ها (۱۱،۱۰، ۱۳، ۱۲، ۱۱، ۱۰)، مهار PLC (۱۱، ۱۰)، مهار فسفودي استراز فعال شده توسط كالمودولين (۱۵، ۱۴، ۱۰، ۸)، مهار آنزيم‌هاي مختلف ديگر (۱۷، ۱۶) و همچنين ترميم زخم سوختگي را دارا هستند، كه همه اين اثرات تاكيد بر نقش فيزيولوژيك بيشتر براي كالمودولين و مؤثر بودن احتمالي مهار كننده‌هاي كالمودولين در درمان التهاب حاد است.

اولين بار در سال ۱۹۷۶، لوين و وايس (Levin ، Weiss) مطرح نمودند كه داروهاي نورولپتيك به

آلبینون ماری با وزن ۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم انجام گرفت. رت‌ها در قفس‌هایی ۵ تایی در حیوانخانه دانشکده پزشکی رفسنجان، با درجه حرارت ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند، آب و غذا آزادانه در اختیار آنها بود.

روش ایجاد سوختگی: ابتدا حیوان‌ها وزن شده و سپس با تزریق داخل صفاقی (i.p.) تیوپنتال سدیم به میزان ۴۰ mg/kg بیهوش شدند. پس از کوتاه کردن موهای پشت آنها، با استفاده از یک فلز آهنی با سطح ۴ سانتی‌متر مربع که تا ۱۰۵ درجه سانتیگراد توسط یک heater گرم شده بود و برای مدت دو ثانیه با سطح پوست تماس داده شد، سوختگی ایجاد گردید. این روش ایجاد سوختگی تقریباً مشابه روش الکساندر (Alexander) (۲۰) است. با این فلز آهنی دو سری سوختگی تجربی درجه دو در طرف چپ ستون مهره‌های حیوان و با فاصله دو سانتی‌متری از آن ایجاد شد. بعد از ایجاد سوختگی به حیوان‌ها سالی‌ن تزریق شد. سوختگی‌ها به حد کافی کوچک بودند تا پاسخ سیستمیک ایجاد نکنند (۲۱). از آنجایی که مطالعه قبلی ما (۲۱) و همچنین گزارش پژوهشگران دیگر (۲۲) حاکی از حداکثر خیز یا التهاب ایجاد در ساعت سوم بعد از سوختگی است؛ بنابراین در ساعت سوم بعد از القاء سوختگی، حیوان‌ها کشته شده و قطعاتی از پوست آنها (تقریباً ۲ سانتی‌متر مربع) از جایگاه‌های سوخته برش داده شد و جهت انجام آزمایش‌های مربوط به نفوذ پذیری و همچنین مطالعات بافت‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند.

روش ایجاد التهاب پنجه: ابتدا حیوان‌ها وزن شده و سپس با تزریق داخل صفاقی (i.p.) تیوپنتال سدیم به میزان ۴۰ mg/kg بیهوش شدند. خیز التهابی در پنجه موش‌ها با تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ درصد کاراگینین (Sigma Co.Uk) به داخل کف پای چپ

کالمودولین متصل شده و فعالیت آن را مهار می‌کنند (۱۸). این مشاهدات منجر به انجام تحقیقات روی عمل کالمودولین در سیستم‌های سلولی ایزوله در *in vitro* گردید. در حال حاضر یک حجم روبه رشد از مشاهدات معرف این است که داروهای ضد روان‌پریشی (ضدجنون) و فنوتیازینی عمل کالمودولین را در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلف مهار می‌کنند (۱۵،۹،۸). تری‌فلوئوپرازین (TFP) یکی از همین داروهاست که یک مهار کننده قوی کالمودولین است که بعد از تشکیل کمپلکس با کالمودولین، باعث ناتوانی مجموعه کلسیم-کالمودولین می‌شود (۱۵،۱۲،۱۱،۱۰،۸). در مطالعات دیگر، نقش مهار کنندگی ترکیبات فنوتیازینی دیگر از قبیل تیودی‌فنیل‌آمد کلرید (TDPAC) و ۲-کلروفنوتیازین (CPT) نیز مشخص شد (۱۹،۱۵). از آنجایی که بعضی از اعمال داروهای فنوتیازینی در *In vitro*، بیانگر نقش آنها مهار کارمودولین در *in vitro*، می‌باشد و همچنین از طرف دیگر، اگرچه امروزه راه‌های درمانی مختلفی برای کنترل خیز التهابی اعمال می‌شود، اما هیچ کدام به درمان کامل و قطعی بیماری منتهی نگردیده است؛ بنابراین برای پژوهش راجع به اثر احتمالی بعضی از مهارکننده‌های کالمودولین روی خیز التهابی، ما اثر سه داروی فوق (CPT, TDPAC, TEP) را روی خیز ناشی از سوختگی و خیز ناشی از تزریق کاراگینین در موش صحرائی مورد آزمون قرار دادیم، که شاید اولاً به طور مستقیم نقش مجموعه کلسیم-کالمودولین را در خیز التهابی نشان دهیم، ثانیاً کاربرد فارماکولوژیک جدیدی برای این داروها مطرح نماییم و ثالثاً کمکی به درمان سوختگی و درمان بیماری‌های التهابی کرده باشیم.

مواد و روش‌ها

حیوان‌ها: این مطالعه مداخله‌ای- تجربی دوسوکور روی رت (rat) بالغ از جنس نر از نژاد

مهاریکننده‌های فوق با دوزهای ۸ mg/kg (۸ mg/ml) و ۳۲ mg/kg (۳۲ mg/ml) و ب- ایبوپروفن (Ibuprofen Sigma Co.Uk) به میزان ۱۲ mg/kg (۱۲ mg/ml) به صورت داخل صفاقی (i.p.) بعد از ایجاد سوختگی و همچنین بعد از تزریق کاراگینین مورد استفاده قرار گرفتند. محلول تمامی داروهای فوق در سرم فیزیولوژیک تهیه شده، به جزء TDPAC و ایبوپروفن که در الکل تهیه شدند. همچنین همه داروها بلافاصله قبل از استفاده آماده می‌شدند.

روش آماری: اطلاعات به دست آمده توسط آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن استفاده از آزمون Tukey و در برخی از موارد با استفاده از آزمون unpaired t-test تجزیه و تحلیل شدند. نتایج همه آزمایش‌ها به صورت Mean \pm SEM گزارش شد و با طرح $P < 0.05$ اختلاف معنی‌دار منظور گردید.

نتایج

بررسی بافت‌شناسی نشان داد که سوختگی ایجاد شده باعث تخریب اپیدرم و قسمت سطحی درم شده است، یعنی سوختگی درجه دو سطحی توسط این روش ایجاد شده است.

اثر مهاریکننده‌های کالمودولین بر روی محتوای رنگ در پوست سوخته در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود محتوای رنگ آبی ایوانز در پوست سوخته درمان نشده $(21/2 \pm 2/1)$ به طور معنی‌داری بیشتر از پوست سالم $(1/7 \pm 0/1)$ است ($P < 0/001$). همچنین مهاریکننده‌های کالمودولین ۱- تری‌فلوئوپرازین (TFP)، ۲- کلروفنوتیازین (CPT) و تیودی فنیل آمید کلراید (TDPAC) که با دوز ۸ mg/kg و به طریق داخل صفاقی پس از سوختگی مصرف شده‌اند، محتوای رنگ آبی را در مقایسه با پوست سوخته

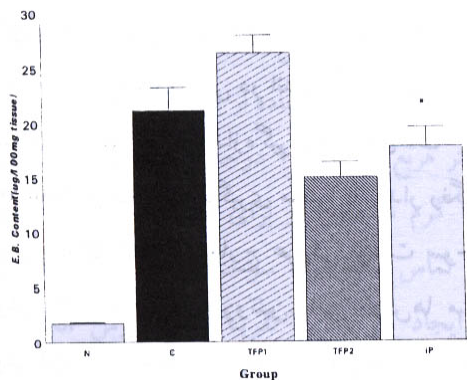
حیوان ایجاد شد و به پای راست حیوان، همین حجم (۰/۱ میلی‌لیتر) سرم فیزیولوژیک تزریق گردید (۲۴،۲۳). کاراگینین، یک پاسخ التهابی حاد مشابه با آنچه که در آسیب‌های مفاصل انسانی رخ می‌دهد (همراه با مهاجرت دایم گلبول‌های سفید به محل التهاب است) ایجاد می‌کند (۲۴).

روش اندازه‌گیری خیز یا التهاب ناشی از سوختگی: برای بررسی تغییرات در نفوذپذیری عروق از دو روش ساده، اما معتبر (۲۵) و کمی در اندازه‌گیری خیز سوختگی استفاده کردیم: الف- اندازه‌گیری محتوای آب (water content)، و ب- اندازه‌گیری محتوا یا مقدار رنگ آبی ایوانز (Evans blue) خارج عروقی پوست سوخته، یا روش نشان‌دار کردن پروتئین. این روش‌ها مشابه با روش‌های مورد استفاده در مطالعه قبلی ما است (۲۱).

روش اندازه‌گیری التهاب پنجه: میزان التهاب پنجه به وسیله دو روش اندازه‌گیری شد: الف- روش پلتیسموگرافی مایع، که در این روش، در ساعت چهارم بعد از تزریق کاراگینین (که حداکثر خیز ایجاد می‌شود) حجم پنجه‌های راست و چپ که به آن کاراگینین تزریق شده بود از حجم پنجه راست که به آن سرم فیزیولوژیک تزریق شده بود، کسر گردید و افزایش حجم (ml) پنجه چپ معادل با ایجاد خیز التهابی به وسیله کاراگینین در نظر گرفته شد (۲۷،۲۶). ب- روش نشان‌دار کردن پروتئین، که این روش با روش ب اندازه‌گیری خیز سوختگی مشابه است. اندازه‌گیری‌ها در ساعت معین و توسط فرد مشخصی انجام شد.

داروها: داروهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند: الف- مهاریکننده‌های کالمودولین: ۱. تری‌فلوئوپرازین (TFP), Sigma [Trifluoprazine (TFP), Sigma Co.Uk]، ۲. تیودی فنیل آمید کلراید [Thiodiphenamide chloride (TDPAC), Sigma Co.Uk]، ۳. ۲- کلروفنوتیازین [2-Chloro phenothiazine (CPT), Sigma Co.Uk]، همه

ایبوپروفن (۱۲ mg/kg) محتوای رنگ آبی را به میزان ۱۷/۴ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش داد (نمودار شماره ۲). محتوای رنگ آبی ایوانز در گروه ایبوپروفن (۱۷/۵ ± ۱/۳) به طور معنی داری کمتر از اثر دوز اندک TFP (۲۶/۷ ± ۱/۳) است (P < ۰/۰۵)، در حالی که اختلاف معنی داری بین ایبوپروفن و اثر دوز زیاد TFP (۱۵ ± ۱/۴) وجود ندارد.

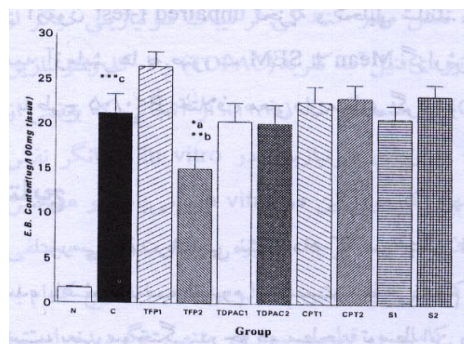


نمودار شماره ۲: مقایسه اثر فلوئوپرازین با اثر ایبوپروفن بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). N: گروه سالم، TFP₁ تری فلوپرازین با دوز ۴ mg/kg، TFP₂ تری فلوپرازین با دوز ۳۲ mg/kg، IP: ایبوپروفن. * اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با TFP₁ و کنترل با P < ۰/۰۵ نشان می دهد.

اثر مهارکننده های کالمودولین بر روی محتوای آب در پوست سوخته و مقایسه آنها با اثر ایبوپروفن در نمودار شماره ۳ مشاهده می شود که میزان محتوای آب در پوست سوخته درمان نشده (کنترل) به میزان ۳۰/۴ درصد بیشتر از این میزان در پوست سالم یا طبیعی است (P < ۰/۰۵). تجویز داخل صفاقی mg/kg ۳۲ تری فلوئوپرازین (TFP) محتوای آب را به میزان ۲۹ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده کاهش داده است (P < ۰/۰۱). همچنین اختلاف معنی داری بین

درمان نشده یا کنترل کاهش نمی دهند؛ اگر چه در ظاهر افزایش در محتوای رنگ برای TFP (۲۶/۷ ± ۱/۳) در مقایسه با کنترل (۲۱/۲ ± ۲/۱) مشاهده می شود ولی این تفاوت معنی دار نیست.

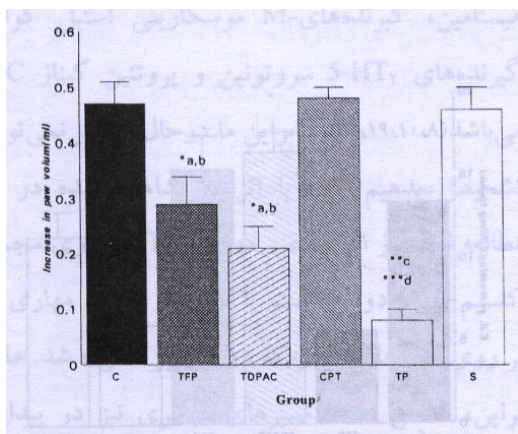
همچنین TFP با دوز ۳۲ mg/kg محتوای رنگ را به میزان ۲۹ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش می دهد (P < ۰/۰۵) و همچنین به میزان ۳۵/۶ درصد در مقایسه با گروه Sham (حلال) میزان رنگ را کاهش داده است (P < ۰/۰۱). علاوه بر این اختلاف معنی داری بین دوز ۳۲ mg/kg TFP و سایر مهارکننده های کالمودولین وجود دارد (P < ۰/۰۱). برای ایجاد این پاسخ دو آنتاگونیست دیگر کالمودولین بی اثر بودند.



نمودار شماره ۱: نمایش اثر مهارکننده های مختلف کالمودولین بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). N: گروه سالم، TFP₁ و TFP₂: گروه های تری فلوئوپرازین به ترتیب با دوزهای ۸ و ۳۲ میلی گرم. TDPAC₁ و TDPAC₂: گروه های تیودی فیل آمید کلراید به ترتیب با دوزهای ۸، ۲۳. CPT₁ و CPT₂: گروه های ۲-کلروفنوتیازین به ترتیب با دوزهای ۸، ۳۲. S₁: حلال TFP و CPT، S₂: حلال TDPAC. a: اختلاف معنی دار TFP₂ را با گروه کنترل نشان می دهد. b: اختلاف معنی دار TFP₂ را با گروه های دیگر و همچنین S₁ نشان می دهد. c: اختلاف معنی دار کنترل را با گروه سالم نشان می دهد. *P < ۰/۰۵، **P < ۰/۰۱، ***P < ۰/۰۰۱.

مقایسه اثر TFP با ایبوپروفن بر روی محتوای رنگ در پوست سوخته

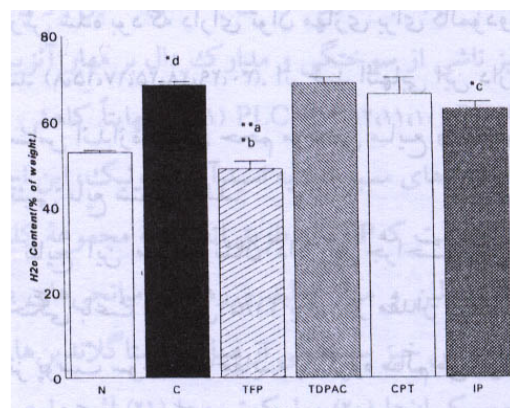
مقایسه اثر مهارکننده های کالمودولین بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از کاراگینین در نمودار شماره ۴، مشاهده می شود که تزریق کاراگینین حجم پنجه را به میزان 0.47 ± 0.04 ml در گروه کنترل افزایش داده است. این افزایش حجم به ترتیب به میزان $38/2$ درصد و $55/3$ درصد توسط دوز 32 mg/kg تری فلونوپرازین (TFP) و تیودی فنیل آمید کلراید (TDPAC) مهار شده است ($P < 0.05$). 2 - کلروفنوتیازین اثری بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از تزریق کاراگینین نداشت. تجویز ایبوپروفن (12 mg/kg) افزایش حجم پنجه ناشی از تزریق کاراگینین را به میزان 83 درصد مهار نموده است که این اثر مهار را دارای اختلاف معنی دار با اثر مهار TFP و TDPAC ($P < 0.01$) است و همچنین در مقایسه با گروه کنترل و sham ($P < 0.01$) می باشد و در مقایسه با گروه کنترل و sham (حلال) و گروه کلروفنوتیازین افزایش حجم پنجه را کاهش داده است ($P < 0.001$).



نمودار شماره ۴: مقایسه اثر مهارکننده های مختلف کالمودولین با اثر ایبوپروفن بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از تزریق کاراگینین. C: گروه کاراگینین، TFP: گروه تری فلونوپرازین، TDPAC: گروه تیودی فنیل آمید، CPT: گروه کلروفنوتیازین، IP: گروه ایبوپروفن، S: گروه Sham، a,b: اختلاف معنی دار TFP و TDPAC را با گروه های کاراگینین، کنترل و sham نشان می دهد. C: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با TFP و TDPAC و d: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را

اثر TFP با سایر مهارکننده های کالمودولین (کلروفنوتیازین و تیودی فنیل آمید) وجود دارد ($P < 0.05$). بدین معنی که TFP محتوای آب را کاهش داده است، در حالی که سایر مهارکننده های کالمودولین بی اثر می باشند. علاوه بر این بین Sham (حلال) و TFP اختلاف معنی دار وجود دارد ($P < 0.01$).

ایبوپروفن [12 mg/kg، (i.p.)] محتوای آب در پوست سوخته را به میزان $8/7$ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش داد. محتوای آب در گروه TFP (تری فلونوپرازین) با غلظت 32 mg/kg به میزان $1/8 \pm 49$ است، که به طور معنی داری کمتر از محتوای آب در گروه ایبوپروفن ($1/7 \pm 63$) است و بین آنها اختلاف معنی دار وجود دارد ($P < 0.05$)؛ یعنی این که TFP به میزان $22/2$ درصد محتوای آب در پوست سوخته را بیشتر از ایبوپروفن مهار کرده است.



نمودار شماره ۳: نمایش اثر مهارکننده های مختلف کالمودولین بر روی محتوای آب در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). هر یک از مهارکننده ها به میزان 32 mg/kg تزریق شده اند. N: گروه سالم، TFP: گروه تری فلونوپرازین، TDPAC: گروه تیودی فنیل آمید کلراید، CPT: گروه کلروفنوتیازین، IP: ایبوپروفن، a: اختلاف معنی دار TFP را با TDPAC و کنترل نشان می دهد. b: اختلاف معنی دار TFP را با ایبوپروفن نشان می دهد. c: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با کنترل نشان می دهد. d: اختلاف معنی دار کنترل را با گروه سالم نشان می دهد $P < 0.05$ ، $**P < 0.01$.

گروه‌های کاراگینین و Sham نشان می‌دهد. C: اختلاف معنی‌دار ایوپروفن را با سایر گروه‌ها به جزء گروه TFP نشان می‌دهد. $**P<0/01$ ، $*P<0/01$

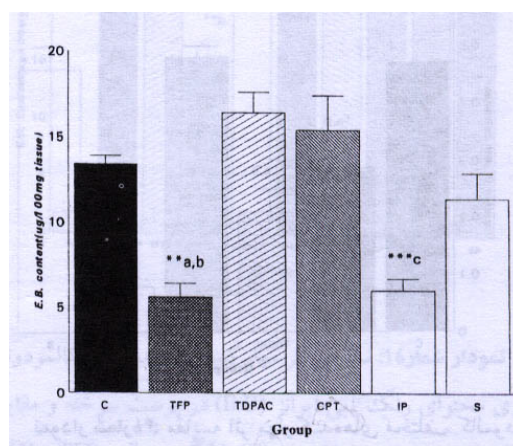
بحث

مشخص شده است که داروهای ممانعت کننده تشکیل خیز بافتی در التهاب حاد، دارای توان درمانی هستند (۱). همچنین اگر خیز در بعد از سوختگی شدید باشد و درمان نشود، بهبودی زخم سوختگی را به تأخیر می‌اندازد (۲). تصور بر این است که کلسیم در پیدایش خیز التهابی نقش دارد (۶،۴،۳) و کالمودولین اعمال داخل یاخته‌ای کلسیم را واسطه‌گری می‌نماید (۱۴،۱۰،۹،۸). مصرف داروهای فنوتیازینی در *in vitro* باعث مهار مجموعه کلسیم - کالمودولین می‌شوند (۱۵،۱۲،۱۱،۱۰،۸). بنابراین، این احتمال وجود دارد که مصرف آنها در *in vitro* موجب مهار خیز ناشی از کاراگینین گردد، لذا به منظور تعیین نقش کالمودولین در خیز بافتی در پژوهش حاضر دوزهایی از داروهای مهارکننده‌های فنوتیازینی کالمودولین استفاده شد که در *in vivo* و *in vitro* گزارش شده بود که دارای توان مهار برای کالمودولین هستند (۳۰،۲۹،۲۸،۲۵،۱۷،۱۵،۸). اثر ضد التهابی این داروها براساس اندازه‌گیری حجم موضعی مایع و محتوای پروتئینی مایع سنجیده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که جراحی ناشی از سوختگی باعث افزایش ۱۱/۵ برابر در مقدار رنگ آبی ایوانز پوست سوخته در مقایسه با گروه سالم می‌شود، به عبارت دیگر سوختگی نشت پروتئین را از عروق ۱۱/۵ برابر افزایش داده است. دوز اندک سه داروی فنوتیازینی مصرف شده (TFP، TDPAC و CPT)، بر روی کاهش این نشت پروتئین افزایش یافته ناشی از سوختگی بی‌اثر است؛ تجویز دوز زیاد این مهار کننده‌های کالمودولین نشان داد که فقط TFP مؤثر است، به طوری که بعد از سوختگی مقدار رنگ آبی

با گروه‌های کاراگینین، Sham و CPT نشان می‌دهد. $*P<0/05$ ، $**P<0/01$ ، $***P<0/001$.

مقایسه اثر مهارکننده‌های کالمودولین بر روی محتوای رنگ پنجه ناشی از کاراگینین محتوای رنگ آبی ایوانز در پنجه ملتهب در اثر تزریق کاراگینین به میزان $13/4 \pm 0/5$ است (نمودار شماره ۵). در اثر تجویز داخل صفاقی 32 mg/kg تری‌فلوئوپرازین (TFP) محتوای رنگ آبی ایوانز در پنجه ملتهب کاهش یافته و به میزان $5/6 \pm 0/8$ می‌رسد که دارای اثر معنی‌دار با گروه کنترل (گروه تزریق کاراگینین) و Sham (حلال) است ($P<0/01$). ایوپروفن (12 mg/kg) نیز محتوای رنگ آبی را به میزان $55/2$ درصد در پنجه ملتهب در مقایسه با گروه کنترل مهار نموده است ($P<0/001$)، که این اثرمهارى اختلاف معنی‌داری با اثر مهارى TFP ندارد، اگر چه دارای اختلاف معنی‌داری با سایر مهارکننده‌های کالمودولین [تیودی‌فنیل‌آمید (TDPAC) و ۲-کلروفنوتیازین (CPT)] و گروه Sham (حلال) است ($P<0/001$).



نمودار شماره ۵: مقایسه اثرمهارکننده‌های مختلف کالمودولین

با اثر ایوپروفن بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) پنجه ناشی از تزریق کاراگینین. C: گروه کاراگینین، TFP: گروه تری‌فلوئوپرازین، TDPAC: گروه تیودی‌فنیل‌آمید، CPT: گروه کلروفنوتیازین، IP: گروه ایوپروفن، S: گروه Sham، a,b: اختلاف معنی‌دار TFP را با

گلیکولیز در پوست آسیب دیده جلوگیری می‌کنند (۲۸،۱۹،۱۷،۱۶)، لذا، این احتمال نیز قابل طرح است که شاید TFP از طریق کاهش پروستاگلاندین‌ها و افزایش تولید ATP، تثبیت غشاء یاخته را موجب شده که نتیجه این تثبیت، کاهش جراحی بافتی و عروقی و کاهش التهاب است. از آنجایی که مشخص شده است مه‌ار کننده‌های کالمودولین فعالیت آنزیم فسفودی استراز مربوط به cAMP را مه‌ار و نتیجتاً افزایش cAMP را موجب می‌شوند (۸،۱۵،۱۴،۱۰) شاید TFP از طریق افزایش cAMP در یاخته درون پوش وریدها، شل شدن این یاخته‌ها و کاهش شکاف بین این یاخته‌ها را موجب شده است (۲۱) و از این طریق خیز بافتی را کاهش داده است. دلیل احتمالی دیگر اثر مه‌اری TFP روی التهاب، تعدیل پاسخ ایمنی توسط این دارو است (۱۳،۳۱). TFP شاید از طریق مه‌ار رهایش میانجی‌های دیگر دخیل در تشکیل خیز التهابی از قبیل سروتونین (۱۳) یا برادی‌کینین (۱۷) خیز سوختگی را مه‌ار نموده است.

علی‌رغم دلایل احتمالی فوق، از آنجایی که TFP نه فقط مه‌ار کننده کالمودولین است، بلکه دارای اثر مه‌اری بر روی گیرنده‌های D_2 دوپامین، گیرنده‌های H_1 هیستامین، گیرنده‌های M_3 موسکارینی استیل‌کولین، گیرنده‌های $5-HT_2$ سروتونین و پروتئین کیناز C نیز می‌باشد (۳۲،۱۹،۱۰،۸). بنابراین ما در حال حاضر نمی‌توانیم تشخیص بدهیم که آیا اثرات مشاهده شده در این مطالعه ناشی از اثر مستقیم مه‌اری TFP بر روی مجموع کلسیم-کالمودولین است یا ناشی از اثرات مه‌اری آن بر روی مسیرهای دیگر که در فوق بر شمرده شد. علاوه بر این، ممکن است مسیرهای دیگری نیز در پیدایش اثرات TFP دخالت داشته باشند. در هر مورد آن جالب خواهد بود تا در پژوهش‌های آینده با استفاده از مه‌ار کننده‌های اختصاصی تر کالمودولین و هم‌چنین مصرف مه‌ار کننده‌های اختصاصی گیرنده‌های فوق، مکانیسم

ایوانز را در بافت سوخته در مقایسه با کنترل به میزان ۲۹ درصد کاهش داد و اثر مه‌اری TFP دارای اختلاف معنی‌داری با اثرات TDPAC و CPT است. نتایج حاصل از بخش دیگر این پژوهش بیانگر این است که سوختگی باعث افزایش ۳۰/۴ درصدی در محتوای آب پوست سوخته در مقایسه با گروه سالم می‌شود. TFP در دوز زیاد به میزان ۲۹ درصد افزایش در محتوای آب پوست سوخته را نیز مه‌ار نموده است، در حالی که دوز داروی دیگر فنوتیازینی معرف این است که فعال شدن کالمودولین در بافت سوخته در پیدایش خیز نقش دارد. نتایج حاصل از این مطالعه، با نتایج مطالعات پژوهشگران دیگر که نشان داده‌اند TFP، مؤثرترین مه‌ار کننده کالمودولین است (۱۹،۱۷،۱۶،۸)، موافق می‌باشد و همچنین با گزارش بایتنر (Beither) که اعلام نمود TFP در درمان آسیب‌های پوستی ناشی از سوختگی (۱۶) و سرمازدگی (۱۷) مؤثر است، مطابقت دارد. با توجه به مطالعه حاضر می‌توان پیشنهاد نمود که اثر TFP روی تسریع درمان سوختگی که بایتنر گزارش نموده است، شاید از طریق کاهش خیز سوختگی باشد.

با توجه به سازوکارهای احتمالی دخیل در پیدایش خیز ناشی از سوختگی و مدارک دال بر مه‌ار آنزیم‌های $PILA_2$ (۱۳،۱۲،۱۱،۱۰)، PLC (۱۱) و نهایتاً کاهش تولید متابولیت‌های مسیر تجزیه اسیدآراشیدونیک، این احتمال مطرح است که TFP از طریق اتصال به مجموعه کلسیم-کالمودولین و مه‌ار تولید و رهایش میانجی‌های دخیل در پیدایش خیز سوختگی از قبیل پروستاگلاندین‌ها (۱۲)، ترومبوکسان‌ها (۲۰) و لوکوترین‌ها (۲۱) اثر مه‌اری خود را اعمال نموده است. همچنین از آنجایی که گزارش شده است مجموع کلسیم-کالمودولین آسیب به غشاء یاخته را واسطه‌گری می‌نمایند و از سوی دیگر گزارش شده است که آنتاگونیست‌های کالمودولین از کاهش ATP و کاهش فعالیت بعضی از آنزیم‌های مسیر

مولکولی دقیق، اثرات مهارى TFP را بر روی خیز التهابی مشخص کنیم.

از آنجایی که داروهای فنوتیازینی خصوصاً تریفلوئوپرازین از طریق مهار گیرنده‌های D₂ پس سیناپسی در سطح هیپوفیز، موجب افزایش ترشح پرولاکتین می‌شوند (۳۲)، این احتمال نیز مطرح می‌شود، که شاید اثر ضد التهابی مشاهده شده برای تریفلوئوپرازین مربوط به افزایش سطح پرولاکتین در خون باشد، اما به علت این که پرولاکتین باعث افزایش ترشح سیتوکین‌های التهاب‌زا (۳) از قبیل IL-1 و IL-6 می‌شود (۳۳) و همچنین از سوی دیگر گزارش شده است که در بیمارانی که آرتريت روماتوئید دارند و پاسخ‌های التهابی آنها تشدید شده است، سطح پرولاکتین پلاسما در آنها افزایش نشان می‌دهد (۳۴)، بنابراین پرولاکتین یک ماده التهاب‌زا محسوب می‌شود تا این که ضد التهابی باشد و بدین علت اثر ضد التهابی TFP نمی‌تواند با واسطه پرولاکتین اعمال شده باشد.

نتایج حاصل از سنجش اثر ضد التهابی TFP، TDPAC و CPT بر روی حجم مایع موضعی پنجه ملتهب شده از تزریق کاراگینین، نشانگر این است که تجویز ۳۲ mg/kg از TFP و TDPAC به ترتیب افزایش حجم پنجه را به میزان ۳۸/۲ درصد و ۵۵/۳ درصد مهار نموده است و همچنین TFP محتوای رنگ آبی ایوانز را در پنجه ملتهب ناشی از کاراگینین به میزان ۴۵/۸ درصد کاهش داده است. اثرات مهارى TFP و TDPAC روی خیز التهابی ناشی از کاراگینین معرف نقش داشتن کالمودولین در پیدایش این نوع التهاب نیز می‌باشد. دلیل احتمالی گوناگونی نتایج به دست آمده برای TFP در دو آزمایش خیز سوختگی و خیز التهابی ناشی از تزریق کاراگینین، این می‌باشد که مطالعات قبلی گزارش نموده‌اند که در پیدایش التهاب ناشی از کاراگینین، هم مسیر نوروزنیک نقش دارد و هم مسیر هورمونی (۳۵،۱۳) و

این که کالمودولین هم در رهائش میانجی‌های عصبی از انتهای اعصاب (۱۲،۱۳،۳۰،۳۶) و هم در رهائش هورمون‌ها از غدد درون‌ریز (۱۳،۳۷) دخالت می‌کند، لذا شاید گوناگونی سازوکارهای ایجادى در دو نوع التهاب، بیانگر پاسخ متفاوت مهارى به TFP و TDPAC در این دو آزمایش باشد.

همچنین دلیل مشاهده اثر TDPAC و حتی بیشتر بودن اثر آن از TFP در این نوع التهاب شاید این باشد که نقش کالمودولین در این نوع التهاب بیشتر از خیز سوختگی می‌باشد، زیرا گزارش شده است که اثر مهارکنندگی TDPAC روی کالمودولین و فعالیت آنزیمی وابسته به کالمودولین، بیشتر از TFP است (۱۵).

اثر ضد التهابی مشاهده شده در این مطالعه برای مهارکننده‌های کالمودولین، با اثر ضد التهابی مشاهده شده برای داروهای ضد افسردگی سه حلقه‌ای (۳۲،۳۷،۳۸) هماهنگی دارد.

در مقایسه‌ای که بین اثر ضد التهابی TFP و ایوپروفن روی خیز سوختگی و خیز ناشی از کاراگینین انجام شد، آشکار گردید که اثر TFP بر روی محتوای رنگ یا نشت پروتئین در پوست سوخته قابل مقایسه با اثر ایوپروفن است، در حالی که اثر آن بر روی محتوای آب در پوست سوخته بیشتر از ایوپروفن می‌باشد؛ همچنین مشابه با همین نتایج برای محتوای رنگ در پنجه ملتهب ناشی از کاراگینین بدست آمده است، اگرچه اثر ایوپروفن در این نوع التهاب بر روی مهار افزایش حجم بیشتر از TFP است. گوناگونی اثر متفاوت دو داروی فوق بر روی نشت پروتئین و نشت آب نشانگر گوناگونی ساز و کارهای دخیل در پیدایش این دو پدیده است (۲۱). قابل مقایسه بودن اثر TFP با ایوپروفن حاکی از این است که شاید یکی از مکانیسم‌های اصلی عمل ضد التهابی مهارکننده‌های کالمودولین مهار مسیر تولید متابولیت‌های اسید آراشیدونیک باشد، همچنان که مهار این مسیر

استفاده از داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی یا استروئیدی اثرات ناخواسته‌ای را ایجاد می‌کند، جایگزینی یا مصرف داروهای فنوتیازینی خصوصاً TFP پیشنهاد می‌شود. اگر از نظر پاتوفیزیولوژی این اثرات در انسان تأیید شود، ممکن است این ترکیبات برای درمان بیماری‌های التهابی انسان نیز مفید باشند.

سپاسگزاران

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند که از پژوهشکده مهندسی و علوم پزشکی جانبازان تهران و همچنین جناب آقای دکتر غلامعلی نادری به خاطر راهنمایی ارزشمندشان در جهت انجام این پژوهش قدردانی و تشکر به عمل آورند.

توسط ایوپروپرفن رخ می‌دهد. علاوه بر این، مطالعه حاضر ممکن است این احتمال را افزایش دهد که عمل مهارکنندگی ایوپروپرفن و سایر داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی فعالیت کالمودولین را در *in vitro* مهار می‌کنند (۴۰،۳۹).

در مجموع پژوهش حاضر نشان داد که مصرف مهارکننده کالمودولین (TFP) خیز التهابی حاد بعد از سوختگی و خیز التهابی حاد ناشی از تزریق کاراگینین را مهار می‌نماید. علاوه بر این، پژوهش حاضر تأییدی برای گزارش‌های دیگران راجع به اثرات غیر مغزی داروهای فنوتیازینی است و این که داروهای فوق که امروزه در کلینیک برای درمان استفاده می‌شوند، احتمالاً در درمان خیز التهابی نیز مؤثر می‌باشند. بنابراین در شرایطی که

فهرست منابع

1. Warren JB. Vascular control of inflammatory oedema. *Clin. Sci. Colch.* 1993; 84(6): 581-4.
2. Demling RH. The effect of immediate and delayed cold immersion on burn oedema formation and resorption. *J. Trauma.* 1974; 19(1): 56-60.
3. Scott DT, Lam FY. Acute joint inflammation-mechanisms and mediators. *Gen. Pharmacol.* 1994; 25(7): 1285-96.
4. De Vries GW, Mclaughlin A. The antiinflammatory activity of topically applied novel calcium channel antagonists. *Inflammation.* 1995; 19(2): 261-75.
5. Southan GJ, Szabo C. Selection pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 51(4): 383-94.
6. Fujishima Y, Hara H. The effects of a novel Ca^{2+} channel blocker, KB-2760, on 5-HT-induced responses. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1994; 104(1): 19-29.
7. Kakiuchi S, Yamazaki R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochem-Biophys. Res. Commun.* 1970; 41: 1104-10.
8. Norman JA, et al. CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol. Pharmacol.* 1987; 31: 538-40.
9. Prozialeck WC, Weiss B. Inhibition calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; 22(3): 504-16.
10. Walenga RW, Opas EE. Differential effects of calmodulin antagonists on

- phospholipase A and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 1981; 265(23): 12523-8.
11. Craven PA, DeRubertis FR. Ca^{2+} calmodulin- dependent release of arachidonic acid for renal medullary prostaglandin synthesis. *J. Biol. Chem.* 1983; 258(8): 4814-23.
 12. Guarner V, Hernandez EH, Huerto R, Gorostiza P, Valenzuela F. Trifluoperazine inhibition of insulin-induced increase in skeletal muscle glucose uptake. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 237: 139-41.
 13. Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AE, Berti F. Effects of chlomipramine and fluoxetine on subcutaneous carrageenin- induced inflammation in the rat. *Inflamm. Res.* 1995; 44: 466-9.
 14. Farzami B, Moosavi Movahedi AA, Naderi GA. Elucidation of Pka values for Ca^{2+} binding sites in calmodulin by spectrofluorometry. *Int. J. Biol. Macromol.* 1994; 16(4): 181-6.
 15. Naderi GA, Farzami B, Moosavi Movahedi AA. Spectroscopic studies of inhibition of calmodulin activity by some drugs. *Acta Medica Iranica.* 1996; 34(182): 20-5.
 16. Beitner R, et al. Therapeutic and prophylactic treatment of skin burns with several calmodulin antagonists. *Gen. Pharmacol.* 1989; 20(2): 165-73.
 17. Beitner R, Chen Zion M, Sofer Bassukevitz. Treatment of frostbite with the calmodulin antagonists thioridazine and trifluoperazine. *Gen. Pharmacol.* 1989; 20(5): 651-6.
 18. Levin RM, Weiss B. Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3', 5' monophosphate phosphodiesterase of brain. *Mol. Pharmacol.* 1976; 12: 581-9.
 19. Beitner R, Chen-zion M, Bassukevitz Y. Effect of the calmodulin antagonist CGS 9343B on skin burns. *Gen Pharmacol.* 1991; 22(1): 67-72.
 ۲۰. خاکساری، محمد. اثر ایوپروفن و متیمازول بر خیز ناشی از سوختگی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۴، دوره دوم، شماره ۳، ۱۳۷۴: ۷-۱۲۰.
 21. Alexander F, Mathieson M, Teoh KH. Arachidonic acid metabolites mediate early burn edema. *J. Trauma.* 1984; 24(8): 706-12.
 22. Sitting K, Deitch EA. Effect of bactriema on mortality after thermal injury. *Arch. Surg.* 1998; 123: 1367-70.
 23. Wirth KJ, Alpermann HG. The bradykinin antagonist hoe 140 inhibits carrageenan and thermicallly induced paw eodema in rats. *Recent Progress on Kinins.* 1992; 428-31.
 24. Gilligan JP, Lovato Sj. Modulation of carrageenan-Induced hind paw edema by substance p. *Inflammation* 1994; 18(3): 285-92.
 25. Waymack JP, Yurt RW. Effect of prostaglandin E on immune function in

- multiple animal models. *Arch Surg.* 1988; 123(11): 1429-39.
26. Hanaha S, Sertie JA. Miconazole as inflammatory agent-I cellular and pathophysiological effects. *Gen. Pharmacol.* 1994; 25(4): 713-7.
27. Amorim CZ, Sergio R. Interference of PCA 4248, a novel PAF receptor antagonist, with antigen-induced paw edema in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 236: 301-4.
28. Frucht H, Kaplansky M, Beitner R. Increase in glucose 1.6 biphosphate levels, activation of phosphofructokinase and phosphoglucosmutase and inhibition of glucose 1.6 Biphosphatase in muscle induced by trifluoperazine. *Bio. Med.* 1984; 31: 122-9.
29. Bruna RD, Pinet F, Corvol P, Kurtz A. Calmodulin antagonists stimulate renin secretion and inhibit renin synthesis in vitro. *Am. J. Physiol.* 1992; 262(31): 397-402.
30. Menendez HL, Perez Vallina JR, Cantabrana B, Hidalgo A, Badmonde A. Calmodulin inhibitors induce spinal analgesia in rats. *Brain Res.* 1996; 731: 114-21.
31. Bianchi M, Sacerdote P, Panerai AE. Fluoxetine reduces inflammatory edema in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 263(1-2): 81-4.
32. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. 6th.ed. *Lange medical book.* 1995: 432-47.
33. Zhu XH, Zellweger R, Wichmann MW. Effect of prolactin and expression in late sepsis. *Cytokines.* 1997; 9(6): 437-46.
34. Chikanza IC, Grossman As. Hypothalamic-pituitary-mediated immunomodulation: arginine vasopressin is a neuroendocrine immune mediator. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37(2): 131-6.
35. Scott DT, Lam FY. Acute inflammation enhances substance p and plasma protein extravasation in the rat knee joint. *Regulatory Peptides.* 1992; 39: 227-35.
36. Moskowitz N, Shapiro L, Schook W, Puszin S. Phospholipase A₂ modulation by calmodulin, prostaglandins and cyclic nucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 115(1): 94-9.
37. Bianchi M, Sacerdote P, Panerai AE. Chlomidipramine differently affects inflammatory edema and pain in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994; 48(4): 1037-40.
38. Michelson D, Misiewicz Poltorak B, Raybourne RB, Gold PW. Imipramine reduces the local inflammatory responses to carrageenin. *Agents Actions.* 1994; 42(1-2): 25-8.
39. Cantabrana B, Perez Vallina JR, Menendez L, Hidalgo A. Spasmolytic and calmodulin inhibitory effect on

- non-steroidal anti-inflammatory drugs
in vitro. *Life Sci.* 1995; 57(14): 1333-41.
40. McCormack K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain.* 1994; 59(1): 9-43.