

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
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 لیپوپلی ساکارید سالمونلا انتریکا در موش آزمایشگاهی

نیما حسینی جزنی: دانشیار میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران، n_jazani@yahoo.com*
مینا مهدی شیشوان: کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران، minamehdishishavan@yahoo.com
شهرام شهابی: دانشیار ایمنی‌شناسی، 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 پیش‌برنده 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 لیپوپلی ساکارید در موش است.

مواد و روش‌ها: ابتدا دوز کشنده ۸۰ درصد لیپوپلی ساکارید در موش تعیین و سپس دوز مناسب دارو به منظور کاهش میزان مرگ و میر مشخص شد. در نهایت دارو به همراه لیپوپلی 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 لیپوپلی 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 ($P \text{ value} = 0/032$)؛ ولی در گروه‌های دریافت کننده دارو نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود.

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

واژه‌های کلیدی: لیپوپلی ساکارید، کاربنوکسولون دی سدیم، عامل نکروز توموری آلفا، التهاب

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، لیپوپلی ساکارید 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 مواجهه بعدی با لیپوپلی 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، می‌تواند 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).

کاربنو کسولون 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). کاربنو کسولون 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 (۱۰ و ۱۱)، آنتی اکسیدانی (۱۲) و محافظت بخش کبدی^۱ است (۱۳). همچنین، این دارو بیان ژن و پروتئین شوک حرارتی 70^{HSP} را افزایش می‌دهد. القا پروتئین‌های شوک حرارتی به دنبال تجویز کاربنو کسولون به غلظت دارو و رده سلولی مورد استفاده بستگی دارد. اگرچه هدف مستقیم کاربنو کسولون معلوم نیست ولی احتمال دارد القا استرس اکسیداتیو در میتو کندری‌ها به وسیله کاربنو کسولون، به افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی منجر شود (۱۴). در حال حاضر، استراتژی‌های درمانی برای درمان شوک آندوتوکسیک شامل کمک به خنثی سازی لیپوپلی ساکارید یا سایتوکاین‌های القا شده به وسیله آن است. مطالعات نشان می‌دهد که خنثی سازی سایتوکاین‌های پیش برنده التهاب مانند عامل

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 هفته‌ای در محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۵ گرم به سه گروه تقسیم شدند. به تمام گروه‌ها محلول رینگر لاکتات حاوی لیپوپلی ساکارید به میزان ۷ میکروگرم به هر موش و د-گالاکتوز آمین به میزان ۱۸ میلی گرم به هر موش به عنوان بهترین دوز کشته لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین به طور هم زمان، همراه با به ترتیب غلظت‌های ۱۰ (گروه اول)، ۲۰ (گروه دوم) و ۳۰ (گروه سوم) میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن از داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت از طریق ورید دم موش تزریق شد. در همه گروه‌ها پس از ۲۴ ساعت درصد مرگ و میر محاسبه شد و دوز مناسب دارو به عنوان دوزی که تجویز آن باعث بیشترین کاهش در میزان مرگ و میر ناشی از تجویز لیپوپلی 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 هفته‌ای به وزن ۱۸ تا ۲۵ گرم به ۶ گروه ده تایی تقسیم و طبق برنامه زمانی ارائه شده در جدول ۱ تزریق شدند.

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 لیپوپلی ساکارید را مهار می‌کنند (۱۶). هدف از این پژوهش، بررسی اثر تجویز داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت در کاهش شدت التهاب عمومی ناشی از لیپوپلی ساکارید سالمونلا تیفی موریوم در موش آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

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

برای مشخص کردن دوز کشته لیپوپلی ساکارید، به منظور حساس نمودن موش‌ها نسبت به این ماده، لیپوپلی ساکارید سالمونلا انتریکا، سروتایپ تیفی موریوم^۳ (Sigma Aldrich) (LPS L6511) در همراهی با د-گالاکتوز آمین هیدروکلراید (Merck) تجویز شد. برای این منظور ۲۰ سر موش BALB/c جنس ماده، ۶ الی ۸ هفته‌ای به وزن‌های ۱۸ تا ۲۵ گرم، در چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با محلول رینگر لاکتات حاوی لیپوپلی ساکارید به میزان ۵۰ و ۵ میکروگرم به کیلوگرم وزن بدن و ۷ میکروگرم/موش و به ترتیب در همراهی با د-گالاکتوز آمین به میزان ۴۰۰ میلی گرم به کیلوگرم و یا ۱۸، ۱۸ و ۱۵ میلی گرم/موش از این 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 کشته برای انجام آزمایش‌های بعدی مشخص شد (۱۸).

جدول ۱- زمان بندی تزریق لیپوپلی ساکارید-د-گالاکتوز آمین و کاربنوکسولون دی سدیم سالت در گروه‌های مختلف

نام‌گذاری گروه	مقدار کاربنوکسولون دی سدیم سالت دریافتی mg/Kg	مقدار د-گالاکتوز آمین دریافتی mg/mouse	مقدار لیپوپلی ساکارید دریافتی $\mu\text{g}/\text{mouse}$	زمان بندی تزریق
LPS	-	۱۸	۷	تجویز لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین در بافر رینگر لاکتات و به شکل همزمان به طریقه داخل وریدی انجام شد.
LPSCarb	۲۰	۱۸	۷	تجویز لیپوپلی ساکارید، د-گالاکتوز آمین و کاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طور همزمان به طریقه داخل وریدی انجام شد.
Carb6LPS	۲۰	۱۸	۷	ابتدا داروی کاربنوکسولون و پس از ۶ ساعت لیپوپلی ساکارید همراه با د-گالاکتوز آمین در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.
LPS1Carb	۲۰	۱۸	۷	ابتدا لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین و پس از ۱ ساعت داروی کاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.
LPS1Carbi.p.	۲۰	۱۸	۷	ابتدا لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین به طریقه داخل وریدی و پس از یک ساعت داروی کاربنوکسولون در بافر رینگر لاکتات به طریقه داخل صفاقی تجویز شد.
Control	-	-	-	فقط محلول رینگر لاکتات به طریقه داخل وریدی تجویز شد.

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 زمان بندی ذکر شده، دوباره تزریق شدند. در هر گروه سه ساعت پس از تزریق، نمونه‌های سرم جمع‌آوری شده و مقادیر عامل نکروز توموری آلفا با استفاده از کیت 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.

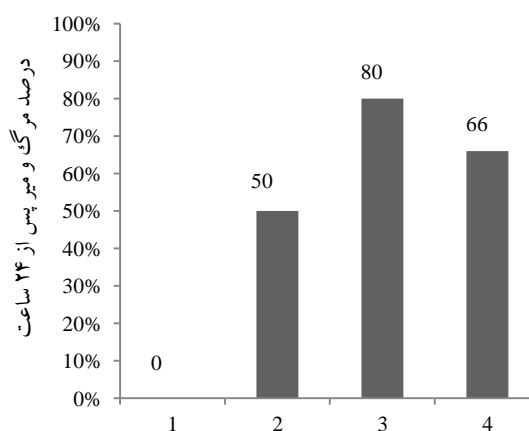
در موارد تزریق داخل وریدی کلیه تزریق‌ها از طریق ورید دم انجام شد. حجم بافر رینگر لاکتات تزریق شده در تمام موش‌ها ۲۰۰ میکرولیتر است.

پس از گذشت ۲۴ ساعت، درصد مرگ و میر در گروه‌ها محاسبه و کبدها، 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 کبدها 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

نتایج

نتایج تعیین دوز کشنده لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین هیدروکلراید

نتایج مربوط به تعیین بالاترین دوز کشنده لیپوپلی ساکارید همراه با د-گالاکتوز آمین با تجویز چهار دوز مختلف در چهار گروه پنج تایی از موش های Balb/c تحت تزریق مشخص شد. همچنان که شکل ۱ نشان می دهد، بالاترین میزان مرگ و میر در گروهی از موش ها که ۷ میکروگرم لیپوپلی ساکارید همراه با ۱۸ میلی گرم د-گالاکتوز آمین را دریافت نموده بودند، مشاهده شد. بنابراین، این دوز به عنوان بهترین دوز تجویز لیپوپلی ساکارید / د-گالاکتوز آمین تعیین و برای بررسی اثر تجویز داروی کاربنوکسولون متعاقب تجویز لیپوپلی ساکارید / د-گالاکتوز آمین استفاده شد.

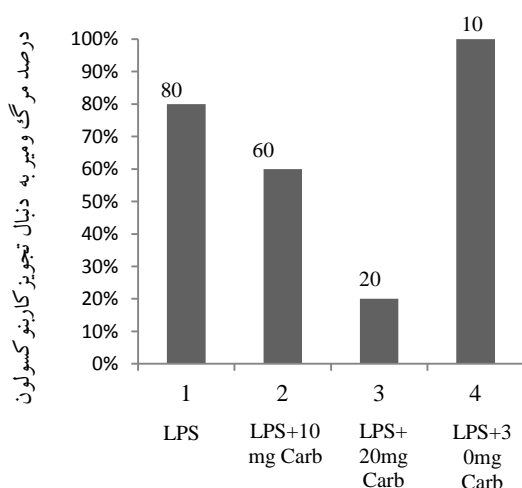


شکل ۱- نمودار تعیین دوز کشنده لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین هیدروکلراید

حداکثر میزان مرگ و میر در گروه سوم (گروهی که ۷ میکروگرم لیپوپلی ساکارید و ۱۸ میلی گرم/موش د-گالاکتوز آمین دریافت نمود) ایجاد شد. در گروه اول، دوم و چهارم میزان مرگ و میر به ترتیب صفر، ۵۰ و ۶۶ 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 لیپوپلی ساکارید به میزان ۷ میکروگرم و د-گالاکتوز آمین به میزان ۱۸ میلی گرم به هر موش و کاربنوکسولون به مقدار ۲۰ میلی گرم به کیلو گرم را دریافت نمود. بنابراین، دوز مناسب داروی کاربنوکسولون برای انجام آزمایش های بعدی ۲۰ میلی گرم/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. گروه های دوم و سوم و چهارم به ترتیب ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم/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 میلی گرم/کیلوگرم از داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت را متعاقب

ساکارید و د- گالاکتوز آمین تزریق شود. همچنین هنگامی که داروی کاربنوکسولون با دوز ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم یک ساعت پس از تجویز ۷ میکروگرم لیپوپلی ساکارید و ۱۸ میلی گرم/موش د- گالاکتوز آمین به طریقه داخل صفاقی تجویز شود، نتیجه مطلوبی می‌دهد.

تجویز دوز ۸۰ درصد کشنده لیپوپلی ساکارید- دگالاکتوز آمین دریافت نمود) مشاهده شد.

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

همچنان که با مراجعه به جدول ۲ مشخص می‌شود، تجویز داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت بهترین اثر را هنگامی داشته است که هم زمان با لیپوپلی

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

زمان بندی تزریق	نام‌گذاری گروه	درصد مرگ و میر پس از ۲۴ ساعت
۱	LPS	۸۰
۲	LPSCarb	۲۰
۳	Carb6LPS	۷۰
۴	LPS1Carb	۹۰
۵	LPS1Carbi.p.	۵۰
۶	Control	صفر

زمان‌های مختلف دریافت کرده اند (گروه‌های LPSCarb، Carb6LPS و LPS1Carbi.p) شدت نکرروز کبدی کاهش یافت و از سه گروه تحت درمان با کاربنوکسولون، گروه LPSCarb (دریافت هم زمان لیپوپلی ساکارید، د- گالاکتوز آمین و کاربنوکسولون)، کم‌ترین شدت نکرروز دریافت کبدی (نکرروز خفیف در برخی نقاط) را نشان داد. در گروه LPS1Carb به علت آن که تنها یک موش از آزمایش قبلی زنده مانده بود، نتایج قابل اعتماد نبوده و در شکل ۳ ذکر نشد.

در گروه‌های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید د- گالاکتوز آمین، دوز تزریقی به ترتیب ۷ میکروگرم و ۱۸ میلی گرم/موش و در کلیه گروه‌های دریافت کننده کاربنوکسولون دوز تزریقی ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم بوده است.

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

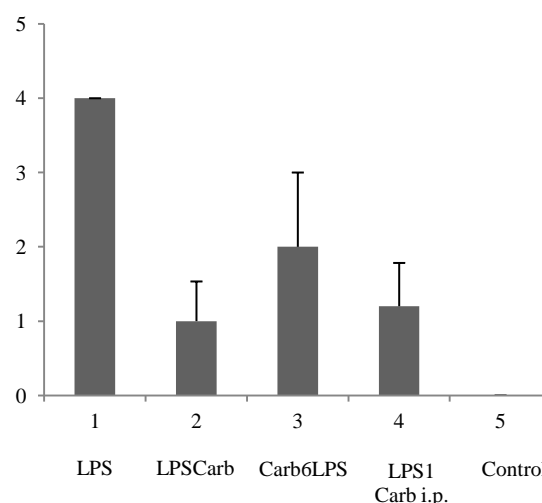
گروه دریافت کننده لیپوپلی ساکارید و د- گالاکتوز آمین (گروه LPS) در مقایسه با دیگر گروه‌ها، بیش‌ترین شدت نکرروز کبدی را نشان داد. در گروه کنترل (بافر رینگر لاکتات) آسیب کبدی مشاهده نشد. در سه گروهی که داروی کاربنوکسولون را در

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 و د 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 گروه Carb6LPS مشاهده شد.

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

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

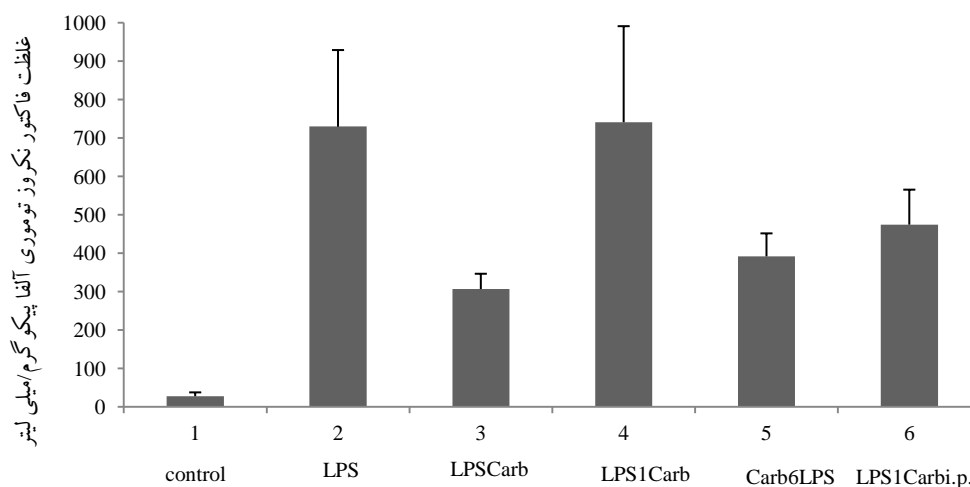
برای بررسی اختلاف میانگین غلظت عامل نکروز توموری آلفا با سایر گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد. این آزمون با ($P \text{ value} < 0.05$) اختلاف معنی داری را در میانگین بین برخی گروه‌ها نشان می‌دهد. آزمون مقایسه چند گانه Tukey نشان می‌دهد که اختلاف در میانگین غلظت عامل نکروز توموری آلفا مشاهده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



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 در مقایسه با گروه LPS کاهش در شدت نکروز کبدی را نشان 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 صورتی که 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 در خور توجهی در میزان نکروز توبولی مشاهده شد. به طوری که با بررسی لام پاتولوژی تهیه شده از کلیه موش‌های گروه LPS1Carb.i.p، هیچگونه تغییری در سلول‌های کلیه مشاهده نشد و همچنین شدت نکروز در سایر گروه‌های دریافت کننده کاربنوکسولون نیز به شدت کاهش یافت به طوری که در گروه Carb6LPS، در برخی از نقاط از



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

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 و د-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 بیوانرژتیک 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 از حد شیرین بیان اثرات سمی بر روی کبد و سیستم

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 معنی داری نشان نمی‌دهد.

بحث و نتیجه گیری

در این بررسی، نتیجه گرفته شد که تجویز لیپوپلی ساکارید سالمونلا تیفی موریوم به میزان ۷ میکروگرم و د-گالاکتوز آمین هیدروکلراید به مقدار ۱۸ میلی‌گرم باعث مرگ ۸۰ درصد موش‌ها می‌شود. می‌ون داین^۹ و همکاران وی نیز برای ایجاد مدل آزمایشگاهی شوک اندوتوکسیک، لیپوپلی ساکارید را 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).

نموده و بروز نکروز هموراژیک در بافت کبدی رامشاهده نمودند. این محققان نشان دادند که آسیب‌های کبدی القا شده تحت تاثیر لیپوپلی 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 (شکل ۳).

جوانسن و همکاران نشان دادند که در موش‌هایی که به طور سیستمیک با لیپوپلی ساکارید تجویز شدند، عملکرد توبول‌های کلیه دچار اختلال شده، میزان فیلتراسیون گلومرولی و فشار خون کاهش یافته، سیستم‌های انتقال آب و نمک 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 لیپوپلی ساکارید 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 تجویز داروی کاربنوکسولون دی سدیم سالت در زمان‌های مختلف کاهش در خور توجهی در میزان 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 لیپوپلی ساکارید باعث القا تولید عامل نکروز توموری

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 لیپوپلی ساکارید و د-گالاکتوز آمین، میزان مرگ و میر را کاهش می‌دهد. به طوری که 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 و میر کاهش یافته و از ۸۰ به ۵۰ درصد رسید.

در گروه LPS بررسی لام‌های آسیب‌شناسی موش‌های زنده نکروز شدید کبدی (شدت چهار مثبت) را نشان داد در صورتی که 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 لیپوپلی ساکارید به طور داخل صفاقی به موش‌های بالغ سی تزریق کردند و ۹ ساعت پس از تزریق شدت نکروز کبدی را بررسی

آسیب ناشی از شوک آندوتوکسیک با واسطه کاهش در میزان عامل نکروز توموری آلفا، کاهش شدت نکروز در کبد و کلیه و نیز کاهش میزان مرگ و میر 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.
- آلفا شده است. این سیتوکین نقش مهمی در القا آسیب‌های کشنده کبدی ایفاء می‌کند.
- مقدار عامل نکروز توموری آلفا در گروه دست آمد. این مقادیر در مقایسه با گروه LPS Carb (741.46±250.23 پیکوگرم/میلی‌لیتر به 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 لیپولی ساکارید می‌شود، تفاوت مشاهده شده شاید به این دلیل است که موش‌هایی که به دنبال تزریق لیپولی ساکارید دچار شوک آندوتوکسیک شده اند به علت تحریک شدید سیستم عصبی سمپاتیک، عروق محیطی تنگ شده‌ای دارند و بنابراین تزریق دوم داخل وریدی در این موش‌ها به شدت استرس‌زا است، در حالی که تزریق داخل صفاقی باعث چنین استرسی نمی‌شود. همچنین در حالی که 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 دریافت‌کننده دارو با کنترل معنی‌دار نیست، که این رویداد نشان‌دهنده نقش موثر تجویز دارو با روش مناسب در جلوگیری از افزایش غلظت عامل نکروز توموری آلفا است (۲۷ و ۲۶). در مجموع، مطالعه پیش‌روی نشان داد که تزریق داروی کاربنوکسولون دی‌سدیم سالت باعث کاهش التهاب و

- (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-arthritis properties of glycyrrhetic 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 glycyrrhizin, 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 inflata*. *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.

- (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

Investigation of the effect of Carbenoxolone in reduction of inflammation severity induced by *Salmonella enterica* LPS in a mouse model

Nima Hosseini Jazani *

Associate Professor of Microbiology, Urmia University of Medical Sciences, Iran, n_jazani@yahoo.com

Mina Mehdi Shishavan

M.Sc of Microbiology, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, minamehdishishavan@yahoo.com

Shahram Shahabi

Associate Professor of Immunology, Urmia University of Medical Sciences, Iran, shahabirabori@yahoo.com

Behrouz Ilkhanizadeh

Associate Professor of Pathology, Urmia University of Medical Sciences, Iran, ilkhani_b@yahoo.com

Babak Mansourafshar

MD., Urmia University of Medical Sciences, Iran, babi13662003@yahoo.com

Abstract

Introduction: Heat shock proteins (HSPs) inhibit production of pro-inflammatory cytokines. Carbenoxolone is regarded to induce the production of HSPs. The aim of this study was the evaluation of the effect of Carbenoxolone in reduction of the severity of systemic inflammation induced by LPS in a murine model.

Materials and methods: %80 lethal dose of LPS was determined in balb/C mice, also appropriate dose of drug for efficient reduction in mortality was determined. LPS+D-GalN with drug were injected to different groups, in different times, after 24 hours the mortality rate was calculated and the severity of necrosis measured in the kidney and livers of the survived mice. After 3 hours serum samples were collected and the concentrations of TNF- α were measured in each group.

Results: Administration of Carbenoxolone with LPS reduced the lethality rate from 80 to %20. The severity of necrosis in the liver and kidney of drug administrated groups decreased significantly in comparison with the positive control group. The concentration of TNF- α in mice received LPS increased significantly in comparison with the control group ($P=0.032$), but in drug received groups no significant differences were seen with respect to the control.

Discussion and conclusion: Carbenoxolone significantly reduced the severity and damage due to endotoxic shock.

Key words: LPS, Carbenoxolone disodium salt, TNF- α , Inflammation

* Corresponding Author

Received: August 13, 2012/ **Accepted:** February 11, 2013