

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

علی خوش باطن (Ph.D.)\*\*

محمد خاکساری (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 موضعی مایع یا خیز یکی از ویژگی‌های بارز التهاب حاد است و از سوی دیگر در بیماری‌های التهابی از قبیل ورم مفاصل، آسم، و کبیر، پیدایش خیز بافتی تعیین کننده است، به طوری که داروهای ممانعت کننده تشکیل خیز بافتی، دارای توان درمانی در التهاب می‌باشند (۱). همچنین تشکیل خیز در بافت‌های خیلی نرم در بعد از سوختگی رخ می‌دهد و اگر این خیز شدید باشد، بهبودی زخم بعد از سوختگی را دچار اختلال می‌کند و کمک به تبدیل جراحی سوختگی با ضخامت نسبی به جراحی سوختگی با ضخامت کامل می‌نماید (۲). اگرچه فرآیند تشکیل خیز در ظرف ۶۰ سال گذشته به میزان زیادی مطالعه شده است، اما راجع به پاتولوژی و سازوکارهای تشکیل خیز خصوصاً خیز سوختگی اطلاعات اندکی در دسترس است؛ اگرچه این موضوع مورد قبول همه است که اکثر جنبه‌های التهاب حاد (مانند التهاب بعد از سوختگی و التهاب ناشی از کاراگینین) از طریق رهایش میانجی‌های مختلف التهابی از قبیل هیستامین، سروتونین، برادی کینین، سیتوکین‌ها، کمپلمان‌ها، ایکوزانوییدها، ماده P، NO، و CGRP از بافت‌های میزبان رها می‌شوند و وجود این میانجی‌ها برای فرآیند التهاب حاد ضروری است (۳).

حرکت کلسیم، احتمالاً یک عامل مهم در فعال شدن یاخته‌های دخیل در التهاب است. کلسیم این عمل خود را یا از طریق رهایش دانه‌های ترشحی از یاخته‌های تیرک‌دار و سایر یاخته‌های دخیل در التهاب اعمال می‌کند (۴،۳)؛ یا از طریق فعال کردن آنزیم‌های داخل یاخته‌ای (۵) و یا به عنوان واسطه برای ایجاد اثرات میانجی‌های التهابی و پیدایش پاسخ برای ترکیبات فوق (۶) عمل می‌نماید. با توجه به شواهد فوق فرض می‌شود که کلسیم در پیدایش التهاب یا خیز بافتی نقش دارد.

اگرچه سازوکار داخل یاخته‌ای عمل کلسیم به تازگی شناخته شده است، یک مسیر برای عمل کلسیم از طریق یک گروه از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم مطرح شده است که مستقیماً آنزیم‌های داخل یاخته‌ها را فعال می‌کنند. کالمودولین یک پروتئین متصل شونده به کلسیم است که به فراوانی در داخل یاخته‌ها وجود دارد و در سال ۱۹۷۰ توسط کالیوچی و یامازاکی (Yamazaki, Kakiuchi) کشف شد (۷). این پروتئین بعد از اتصال به کلسیم توانایی دارد که تعداد زیادی از آنزیم‌ها را در *in vitro* فعال کند. مجموعه کلسیم-کالمودولین می‌تواند پروتئین کینازهای معینی را فعال کند که منجر به فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون آنزیم‌ها شده و فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین ابتدا نشان داده شده که این مجموعه فعال کننده فسفودی استراز است (۹،۸). با توجه به بیان فوق که کالمودولین بسیاری از اعمال وابسته به کلسیم را در انواعی از یاخته‌ها واسطه می‌نماید، بنابراین، یکی از راه‌های آزمودن فرضیه نقش کلسیم در التهاب، مهار کالمودولین توسط مهار کننده‌ها یا آنتاگونیست‌های کالمودولین است. از سوی دیگر گزارش شده است که مهار کننده‌های کالمودولین توانایی مهار  $PLA_2$  و تولید پروستاگلاندین‌ها (۱۱،۱۰، ۱۳، ۱۲، ۱۱، ۱۰)، مهار PLC (۱۱، ۱۰)، مهار فسفودی استراز فعال شده توسط کالمودولین (۱۵، ۱۴، ۱۰، ۸)، مهار آنزیم‌های مختلف دیگر (۱۷، ۱۶) و همچنین ترمیم زخم سوختگی را دارا هستند، که همه این اثرات تأکیدی بر نقش فیزیولوژیک بیشتر برای کالمودولین و مؤثر بودن احتمالی مهار کننده‌های کالمودولین در درمان التهاب حاد است. اولین بار در سال ۱۹۷۶، لوین و وایس (Levin, Weiss) مطرح نمودند که داروهای نورولپتیک به

کالمدولین متصل شده و فعالیت آن را مهار می کنند (۱۸). این مشاهدات منجر به انجام تحقیقات روی عمل کالمدولین در سیستم های سلولی ایزوله در *in vitro* گردید. در حال حاضر یک حجم روبه رشد از مشاهدات معرف این است که داروهای ضد روان پریشی (ضدجنون) و فنوتیازینی عمل کالمدولین را در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلف مهار می کنند (۱۵،۹،۸). تری فلوتوپرازین (TFP) یکی از همین داروهاست که یک مهار کننده قوی کالمدولین است که بعد از تشکیل کمپلکس با کالمدولین، باعث ناتوانی مجموعه کلسیم-کالمدولین می شود (۱۵،۱۲،۱۱،۱۰،۸). در مطالعات دیگر، نقش مهار کنندگی ترکیبات فنوتیازینی دیگر از قبیل تیودی فنیل آمد 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 کارمدولین در *in vitro*، می باشد و همچنین از طرف دیگر، اگرچه امروزه راه های درمانی مختلفی برای کنترل خیز التهابی اعمال می شود، اما هیچ کدام به درمان کامل و قطعی بیماری منتهی نگردیده است؛ بنابراین برای پژوهش راجع به اثر احتمالی بعضی از مهارکننده های کالمدولین 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-کالمدولین را در خیز التهابی نشان دهیم، ثانیاً کاربرد فارماکولوژیک جدیدی برای این داروها مطرح نماییم و ثالثاً کمکی به درمان سوختگی و درمان بیماری های التهابی کرده باشیم.

## مواد و روش ها

حیوان ها: این مطالعه مداخله ای- تجربی دوسوکور روی رت (rat) بالغ از جنس نر از نژاد

آلبینون ماری با وزن ۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم انجام گرفت. رت ها در قفس هایی 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 حیوان ها 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 سانتی متر 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 مهره های حیوان و با فاصله دو سانتی متری از آن ایجاد شد. بعد از ایجاد سوختگی به حیوان ها سالی ن تزریق شد. سوختگی ها 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، حیوان ها کشته شده و قطعاتی از پوست آنها (تقریباً ۲ سانتی متر مربع) از جایگاه های سوخته برش داده شد و جهت انجام آزمایش های مربوط به نفوذ پذیری و همچنین مطالعات بافت شناسی مورد استفاده قرار گرفتند.

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

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 بافت شناسی 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

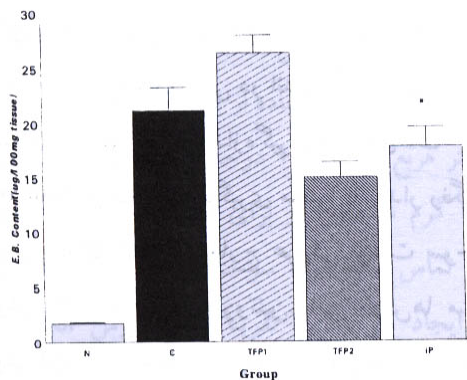
حیوان ایجاد شد و به پای راست حیوان، همین حجم (۰/۱ میلی‌لیتر) سرم فیزیولوژیک تزریق گردید (۲۴،۲۳). کاراگینین، یک پاسخ التهابی حاد مشابه با آنچه که در آسیب‌های مفاصل انسانی رخ می‌دهد (همراه با مهاجرت دائم گلبول‌های سفید به محل التهاب است) ایجاد می‌کند (۲۴).

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.

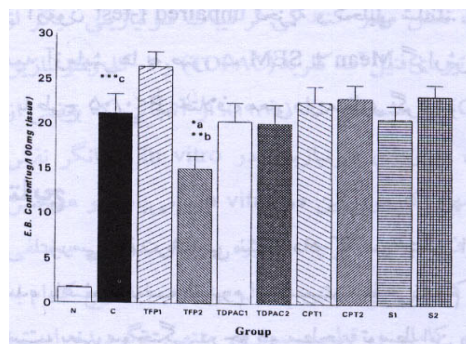


**نمودار شماره ۲:** مقایسه اثر تری فلونوپرازین با اثر ایبوپروفن بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). N: گروه سالم، TFP<sub>1</sub> تری فلونوپرازین با دوز ۴ mg/kg، TFP<sub>2</sub> تری فلونوپرازین با دوز ۳۲ mg/kg، IP: ایبوپروفن. \* اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با TFP<sub>1</sub> 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 ۳۲ mg/kg تری فلونوپرازین (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.

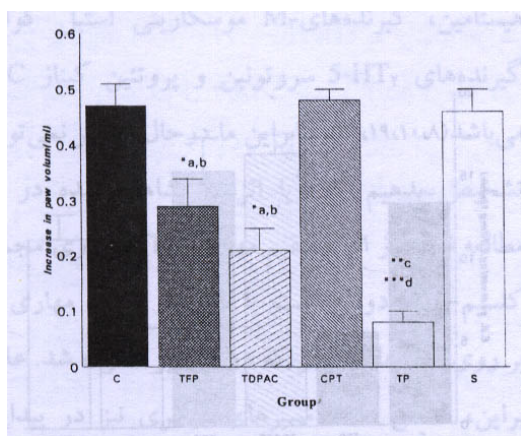
همچنین TFP با دوز ۳۲ mg/kg محتوای رنگ را به میزان ۲۹ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش می دهد (P < ۰/۰۵) و همچنین به میزان ۳۵/۶ درصد در مقایسه با گروه Sham (حلال) میزان رنگ را کاهش داده است (P < ۰/۰۱). علاوه بر این اختلاف معنی داری بین دوز ۳۲ mg/kg TFP و سایر مهارکننده های کالمودولین 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، TFP<sub>1</sub> و TFP<sub>2</sub>: گروه های تری فلونوپرازین به ترتیب با دوزهای ۸ و ۳۲ میلی گرم. TDPAC<sub>1</sub> و TDPAC<sub>2</sub>: گروه های تیودی فیل آمید کلراید به ترتیب با دوزهای ۸، ۲۳. CPT<sub>1</sub> و CPT<sub>2</sub>: گروه های ۲-کلروفنوتیازین به ترتیب با دوزهای ۸، ۳۲. S<sub>1</sub>: حلال TFP و CPT، S<sub>2</sub>: حلال TDPAC. a: اختلاف معنی دار TFP<sub>2</sub> را با گروه کنترل نشان می دهد. b: اختلاف معنی دار TFP<sub>2</sub> را با گروه های دیگر و همچنین S<sub>1</sub> 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

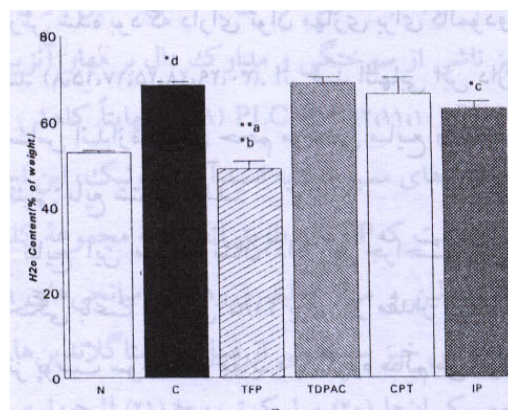
مقایسه اثر مهارکننده های کالمودولین بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از کاراگینین در نمودار شماره ۴، مشاهده می شود که تزریق کاراگینین حجم پنجه را به میزان  $0.47 \pm 0.04$  ml در گروه کنترل افزایش داده است. این افزایش حجم به ترتیب به میزان  $38/2$  درصد و  $55/3$  درصد توسط دوز  $32$  mg/kg تری فلونوپرازین (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 ایوپروفن ( $12$  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 ایوپروفن 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 ایوپروفن، 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 ایوپروفن را با TFP و TDPAC و d: اختلاف معنی دار ایوپروفن 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 ( $P < 0.01$ ).

ایوپروفن [ $12$  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 ایوپروفن ( $1/7 \pm 63$ ) 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 ایوپروفن 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: ایوپروفن، a: اختلاف معنی دار TFP را با TDPAC و کنترل نشان می دهد. b: اختلاف معنی دار TFP را با ایوپروفن نشان می دهد. c: اختلاف معنی دار ایوپروفن 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.  $*P < 0/01$ ،  $**P < 0/001$

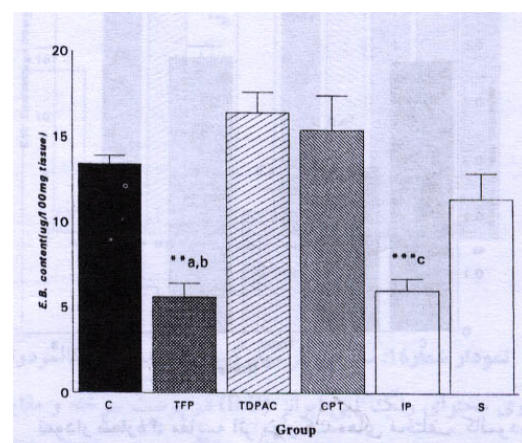
### بحث

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  $32 \text{ mg/kg}$  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 ( $12 \text{ mg/kg}$ ) 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 اثرمهار اختلاف معنی‌داری با اثر مهار 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 می کنند (۲۸،۱۹،۱۷،۱۶)، لذا، این احتمال نیز قابل طرح است که شاید TFP از طریق کاهش پروستاگلاندین ها 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 مهاری کننده های کالمودولین فعالیت آنزیم فسفودی استراز مربوط به cAMP را مهار و نتیجتاً افزایش cAMP را موجب می شوند (۸،۱۵،۱۴،۱۰) شاید TFP از طریق افزایش cAMP در یاخته درون پوش و ریدچه ها، شل شدن این یاخته ها و کاهش شکاف بین این یاخته ها 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 میانجی های دیگر دخیل در تشکیل خیز التهابی از قبیل سروتونین (۱۳) یا برادی کینین (۱۷) خیز سوختگی را مهار نموده است.

علی رغم دلایل احتمالی فوق، از آنجایی که TFP نه فقط مهاری کننده کالمودولین است، بلکه دارای اثر مهاری بر روی گیرنده های  $D_2$  دوپامین، گیرنده های  $H_1$  هیستامین، گیرنده های  $M_3$  موسکارینی استیل کولین، گیرنده های  $5-HT_2$  سروتونین و پروتئین کیناز C نیز می باشد (۳۲،۱۹،۱۰،۸). بنابراین ما در حال حاضر نمی توانیم 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 پژوهش های آینده با استفاده از مهاری کننده های اختصاصی تر کالمودولین و هم چنین مصرف مهاری کننده های اختصاصی گیرنده های فوق، مکانیسم

ایوانز را در بافت سوخته در مقایسه با کنترل به میزان ۲۹ درصد کاهش داد و اثر مهاری TFP دارای اختلاف معنی داری 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 می شود. 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 داده اند TFP، مؤثرترین مهاری کننده کالمودولین است (۱۹،۱۷،۱۶،۸)، موافق می باشد و همچنین با گزارش بایتر (Beither) که اعلام نمود TFP در درمان آسیب های پوستی ناشی از سوختگی (۱۶) و سرمازدگی (۱۷) مؤثر است، مطابقت دارد. با توجه به مطالعه حاضر می توان پیشنهاد نمود که اثر TFP روی تسریع درمان سوختگی که بایتر 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 مهاری آنزیم های  $PILA_2$  (۱۳،۱۲،۱۱،۱۰)، PLC (۱۱) و نهایتاً کاهش تولید متابولیت های مسیر تجزیه اسید آراشیدونیک، این احتمال مطرح است که TFP از طریق اتصال به مجموعه کلسیم-کالمودولین و مهار تولید و رهایش میانجی های دخیل در پیدایش خیز سوختگی از قبیل پروستاگلاندین ها (۱۲)، ترومبوکسان ها (۲۰) و لوکوترین ها (۲۱) اثر مهاری خود را اعمال نموده است. همچنین از آنجایی که گزارش شده است مجموع کلسیم-کالمودولین آسیب به غشاء یاخته را واسطه گری می نمایند و از سوی دیگر گزارش شده است که آنتاگونیست های کالمودولین از کاهش ATP و کاهش فعالیت بعضی از آنزیم های مسیر

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

از آنجایی که داروهای فنوتیازینی خصوصاً تریفلوئوپرازین از طریق مهار گیرنده‌های D<sub>2</sub> 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.

### سپاسگزارى

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 ایوپروفن رخ می‌دهد. علاوه بر این، مطالعه حاضر ممکن است این احتمال را افزایش دهد که عمل مهارکنندگی ایوپروفن 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

- Warren JB. Vascular control of inflammatory oedema. *Clin. Sci. Colch.* 1993; 84(6): 581-4.
- Demling RH. The effect of immediate and delayed cold immersion on burn oedema formation and resorption. *J. Trauma.* 1974; 19(1): 56-60.
- Scott DT, Lam FY. Acute joint inflammation-mechanisms and mediators. *Gen. Pharmacol.* 1994; 25(7): 1285-96.
- De Vries GW, Mclaughlin A. The antiinflammatory activity of topically applied novel calcium channel antagonists. *Inflammation.* 1995; 19(2): 261-75.
- Southan GJ, Szabo C. Selection pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 51(4): 383-94.
- 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.
- Kakiuchi S, Yamazaki R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochem-Biophys. Res. Commun.* 1970; 41: 1104-10.
- Norman JA, et al. CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol. Pharmacol.* 1987; 31: 538-40.
- Prozialeck WC, Weiss B. Inhibition calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; 22(3): 504-16.
- 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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 phosphofructokinas 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. 6<sup>th</sup>.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 A<sub>2</sub> modulation by calmodulin, prostaglandins and cyclic nucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 115(1): 94-9.
37. Bianchi M, Sacerdote P, Panerai AE. Chlomipramine 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.