

اثر داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) منتخب، فلونیکسین و کتوپروفن، بر التهاب حاصل از پروکسی نیتريت و سطح سرمی کورتیزول و قند خون

مینو ایلخانی پور^۱ (Ph.D)، ایرج مقدمی^{۱*} (M.Sc)، گودرز صادقی هاشجین^۲ (Ph.D)

۱- دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

۲- دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه فیزیولوژی، فارماکولوژی و سم‌شناسی

چکیده

سابقه و هدف: پروکسی نیتريت متابولیت حاصل از واکنش نیتريك اکساید و آنیون سوپراکساید است که، در کنار اثرات مخرب آن بر میکروارگانسیم‌ها، ممکن است در مقادیر زیاد موجب انهدام سلولی و التهاب نیز گردد. داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) به طور وسیع در درمان التهاب، درد و تب مورد استفاده قرار می‌گیرند. در عین حال، این داروها اثرات جانبی قابل توجه و تأثیرات چندی بر عملکرد هورمون‌ها از خود نشان می‌دهند. هدف از پژوهش حاضر عبارت بودند از: ۱) ایجاد یک مدل تجربی حیوانی از التهاب ناشی از پروکسی نیتريت، ۲) مطالعه اثرات احتمالی دو داروی منتخب از گروه NSAIDs، ۳) مطالعه اثر عوامل فوق بر سطوح سرمی کورتیزول (به‌عنوان یکی از شاخص‌های پاسخ به التهاب) و قند خون (به‌عنوان یک فاکتور جانبی).

مواد و روش‌ها: ۲۴ قطعه خوکچه هندی نر در ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. به گروه‌های یک، دو و سه پروکسی نیتريت و به گروه چهارم (شاهد) سرم فیزیولوژی تزریق شد. پس از ایجاد التهاب دو داروی فلونیکسین مگلو مین و کتوپروفن به ترتیب در گروه‌های ۲ و ۳ به مدت ۵ بار با فاصله ۱۲ ساعت و به گروه‌های یک و چهار نیز سرم فیزیولوژی تزریق شد. سپس حیوان‌ها با استفاده از تیوپنتال سدیم بی‌هوش و به‌طور مستقیم از قلب آن‌ها خون‌گیری شد. میزان قند و کورتیزول در خون کلیه حیوان‌ها اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: میزان قند خون در گروهی که فقط پروکسی نیتريت دریافت کرده بودند، از گروه کنترل پایین‌تر و در گروه‌هایی که دارو دریافت نمودند به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. میزان کورتیزول در گروه‌های آزمون به‌نسبت پایین‌تر بود، لیکن اختلاف موجود از نظر آماری به سطح معنی‌داری نرسید.

نتیجه‌گیری: میزان کورتیزول در حیوانات درمان شده با پروکسی نیتريت و هم‌چنین در استفاده از NSAIDs نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود؛ این امر نشان داد که پروکسی نیتريت و نیز NSAIDs میزان کورتیزول را پایین می‌آورند. این مشاهده ممکن است حاکی از این مسأله باشد که در بیماران مبتلا به آنژین صدری که نیتروگلیسرین (دهنده نیتريك اکساید) دریافت می‌کنند و هم‌چنین در بیماران دچار استئوآرتروز که به‌طور وسیع از NSAIDs استفاده می‌کنند، ممکن است هورمون کورتیزول افت نماید. میزان قند خون نیز در این پژوهش در حیوانات مورد مطالعه که از دارو استفاده می‌کردند، بالاتر از گروه کنترل بود.

واژه‌های کلیدی: پروکسی نیتريت، فلونیکسین مگلو مین، قند خون، کتوپروفن، کورتیزول

مقدمه

از مهم‌ترین مدیاتورهای بیوزنیک که در سال‌های اخیر مورد توجه خاص قرار گرفته است، نیتریک اکساید (NO) است که توسط سه ایزوform آنزیم سنتزکننده آن در شرایط فیزیولوژیک یا پاتولوژیک تولید می‌شود. این سه ایزوform عبارتند از: (eNOS) نیتریک اکسید سنتتاز اندوتلیالی، (nNOS) آنزیم نورونی و (iNOS) آنزیم قابل القا. دو ایزوform اول در مقادیر کم همیشه موجود و فعالند، در حالی که ایزوform سوم در پاسخ به انواع محرک‌های التهابی مانند سیتوکین‌ها و لیپولی‌ساکاریدها بیان می‌شود [۱]. سوپراکسیدهای تولید شده به وسیله نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و حتی سلول‌های اندوتلیال می‌توانند با NO درون‌زاد واکنش داده منجر به تشکیل ماده شدیداً اکسیدان‌ثالی به نام پروکسی‌نیتریت (ONOO-) گردند. این واکنش به واسطه اینترلوکین ۱ (IL-1) و اینترلوکین ۶ (IL-6) تشدید می‌گردد. نیتریک‌اکساید و پروکسی‌نیتریت از عوامل مهم در ایجاد التهاب هستند. بعلاوه ماست‌سل‌های فاقد گرانول مهم‌ترین نمود التهاب نوروژنیک می‌باشند که، به واسطه نیتریک‌اکساید و پروکسی‌نیتریت تحریک می‌گردند [۲]. گزارش گردیده است که پروکسی‌نیتریت می‌تواند موجب بیان ژن‌های CD11b و CD18 و افزایش لوکوسیت‌های چند هسته‌ای و اتصال آن‌ها به آندوتلیوم گردد [۳]. این اثرات خود می‌توانند بخشی از اثرات التهاب‌زای این ماده اکسیدان‌ت را توجیه نمایند.

عمده اثرات داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) اعمال می‌گردند. این آنزیم، اسیدآراشیدونیک حاصل از تجزیه فسفولیپیدهای غشای سلولی را به پروستاگلندین‌ها و ترومبوکسان‌ها تبدیل می‌کند. ایزوآنزیم‌های COX-1 و COX-2 از لحاظ نقش و قرار گرفتن در جایگاه‌های مخصوص به خود متفاوت هستند. COX-1 در شبکه اندوپلاسمیک و پوشش هسته قرار دارد، در حالی که محل تمرکز COX-2 در پوشش هسته است. از نقش‌های سودمند

COX-1 در CNS، قلب، محافظت در برابر آلرژن‌ها، ترشح موکوس معده و کمک به بهبود شکستگی استخوان را می‌توان نام برد [۴]. برعکس، COX-2 می‌تواند موجب التهاب و افزایش بی‌رویه پروستاگلندین‌ها گردد که اثرات پاتولوژیکی مانند التهاب، درد و تب را به دنبال خواهد داشت. در حالی که اکثر NSAIDs (از جمله دو داروی مورد استفاده در این تحقیق)، به‌طور غیرانتخابی بر روی هر دو ایزوآنزیم اثر می‌کنند. تعداد محدودی از آن‌ها با اثر انتخابی بر COX-2، موجب مهار آن و اثرات سوء ناشی از فعالیت این ایزوآنزیم می‌گردند بدون آن‌که COX-1 را مهار نمایند [۵].

کورتیزول، از مهم‌ترین گلوکوکورتیکوئیدهاست که به‌طور طبیعی از کورتکس غده فوق‌کلیه ترشح می‌شود. این هورمون برای فعالیت طبیعی تمام انواع سلول‌ها در حیوانات ضرورت دارد. نیاز به افزایش کورتیزول پایه پلازما و غلظت ACTH در شرایط تب، تروما، جراحت و درد به وضوح نشان داده شده است [۶].

هدف از انجام این تحقیق عبارتند از: (۱) ایجاد یک مدل حیوانی جدید برای مشاهده اثر التهاب‌زایی پروکسی‌نیتریت، (۲) اندازه‌گیری مقادیر کورتیزول و گلوکز خون (که از مواد حیاتی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک می‌باشند)، در این مدل تجربی، (۳) مطالعه نقش درمانی داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی (که در پزشکی و دامپزشکی به وفور مصرف می‌شوند)، بر اثرات حاصل از پروکسی‌نیتریت. به این منظور، دو داروی مختلف با اثر غیرانتخابی بر روی هر دو ایزوآنزیم سیکلواکسیژناز (COX) یعنی کتوپروفن (با مصرف عمدتاً انسانی) و فلونیکسین مگلو مین (با مصرف صرفاً دامی)، مورد استفاده واقع گردیدند. وجود شکل دارویی تزریقی و مصرف روزمره آن‌ها در ایران، از دلایل دیگر انتخاب این داروها بودند.

مواد و روش‌ها

از ایجاد و حصول یقین از بروز التهاب، دو داروی فلونیکسین مگلو مین و کتوپروفن (به میزان ۰/۵ mg / ۰/۵ ml) به ترتیب در گروه‌های دو و سه به تعداد ۵ بار با فواصل ۱۲ ساعت و به گروه‌های یک و چهار نیز به همان ترتیب سرم فیزیولوژی تزریق شد. پس از سه روز با مشاهده اثرات التهاب مانند قرمزی و آماس در محل مورد نظر، ۵ بار با فاصله ۱۲ ساعت، به گروه‌های ۱ و ۲ سرم فیزیولوژی (۰/۵ میلی‌لیتر) و به گروه‌های ۳ و ۴ به ترتیب فلونیکسین و کتوپروفن با دوز ۰/۵ میلی‌گرم (با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر) به‌طریقه زیرجلدی تزریق شد. دوازده ساعت پس از آخرین تزریق، حیوانات با تیوپنتال سدیم (با دوز ۶۰ mg/kg در حجم ۱ mL/kg) به‌صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند. خون تازه بلافاصله پس از اخذ مستقیم از قلب حیوان وارد لوله‌های جداگانه شده جهت اندازه‌گیری قند و کورتیزول در سانتیفیوژ قرار داده شدند (۳۰۰۰ rpm). هورمون کورتیزول با روش الیزا با دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) مدل LTI ۵ کاناله با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون و قند خون نیز توسط دستگاه اتوآنالایزر با استفاده از روش آنزیمی متداول گلوکز اکسیداز، اندازه‌گیری شدند.

۴) ارائه نتایج و آنالیز آماری داده‌ها. کار آماری توصیفی و مقایسه‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گردید. ابتدا میانگین نتایج گروه‌های چهارگانه با روش ANOVA ارزیابی و هر جا که مجاز بود نتایج هر گروه به‌صورت انفرادی با گروه‌های دیگر با استفاده از آنالیز Post Hoc موسوم به آزمون Scheffe مقایسه و در صورتی که $P < 0/05$ بود، تفاوت از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

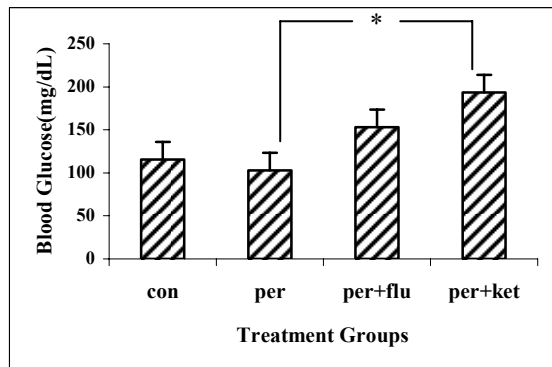
نتایج

معاینه بالینی حیوانات نشان داد که در کلیه حیواناتی که در آن‌ها پروکسی‌نیتريت در کف پا تزریق شده بود التهاب مشخصی با علائم قرمزی و تورم موضعی مشاهده گردید. در

۱) سنتز پروکسی‌نیتريت. برای سنتز این ماده شیمیایی از یک رآکتور Quenched flow استفاده گردید. محلول‌های الف) $0/6 \text{ NaNO}_2$ (نرمال، ب) $0/6 \text{ HCl}$ (نرمال، ج) H_2O_2 $0/7$ نرمال به داخل رآکتور شیشه‌ای با اتصالی T با سرعت ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه پمپ شدند و در داخل لوله شیشه‌ای مخلوط گردیدند. محلول حاصله، نیتروز اسید بود که با افزوده شدن $1/5$ مولار هیدروکسید سدیم با همان سرعت و از لوله شیشه‌ای سوم در اتصالی T دیگر در انتهای لوله شیشه‌ای به اسید پروکسی‌نیتروز تبدیل گردید. محلول نهایی به مدت یک هفته در فریزر 20°C - نگه‌داری شد. به‌دلیل تفاوت در نقطه انجماد، پروکسی‌نیتريت یک لایه زرد رنگ را در بالایی‌ترین بخش محلول منجمد شده تشکیل داد. این بخش تراشیده شد و برای آنالیز بعدی و استفاده از آن، در فریزر نگه‌داری گردید. غلظت پروکسی‌نیتريت در این لایه با استفاده از اسپکتروفتومتر نوری در نقطه جذب 302 nm با استفاده از فرمول $\epsilon_{302} = 1.67 \times 10^3 / \text{m/cm}$ تعیین گردید. محلول‌های استاک (غلظت) پروکسی‌نیتريت در فریزر و در محیط قلبایی نگه‌داری، و غلظت آن‌ها هر بار پیش از استفاده تعیین گردید [۷]. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

۲) حیوانات. برای این تحقیق ۲۴ قطعه خوکچه هندی نر با وزن متوسط ۵۰۰ گرم که از خانه حیوانات دانشگاه ارومیه تهیه شده بود استفاده شد. حیوانات، به مدت یک هفته در شرایط یک‌سان نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دما (21 ± 2 درجه سلسیوس) نگه‌داری شدند. پس از سازگاری با محیط و با رعایت میانگین وزن بدن یک‌سان در هر گروه، تحقیق به شرحی که می‌آید انجام گردید.

۳) پروتکل تحقیق. بیست و چهار قطعه خوکچه هندی با مشخصات فوق در ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. به سه گروه پروکسی‌نیتريت (میزان ۷۲ میکرولیتر از پروکسی‌نیتريت خالص در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی) و به گروه چهارم (شاهد منفی) سرم فیزیولوژی به‌طریقه زیرجلدی در کف پا تزریق شد. پس



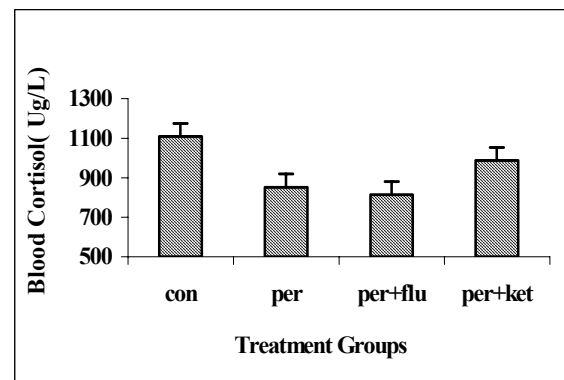
نمودار ۲. تغییرات سطوح گلوکز خون در ۴ گروه از خوکچه‌های هندی. میله‌ها از چپ به راست به ترتیب معرف گروه‌های کنترل (con)، درمان شده با پروکسی‌نیتريت و سرم فیزیولوژی (per)، پروکسی‌نیتريت و فلونیکسین (per+flu) و پروکسی‌نیتريت و کتوپروفن (per+ket) می‌باشند. میزان گلوکز در گروه چهارم در مقایسه با گروه دوم افزایش معنی‌داری را نشان داد (* P=0.029).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تجویز زیرجلدی پروکسی‌نیتريت در کف پای خوکچه هندی التهاب مشخصی را ایجاد نمود. بعلاوه، در طی فرایند التهاب بافتی ناشی از پروکسی‌نیتريت، از سطح خونی کورتیزول به میزانی قابل توجه (اگر چه غیر معنی‌دار از نظر آماری) کاسته شد. تأثیر کاهنده این اکسیدان بر قند خون بسیار جزیی بود. کتوپروفن از اثر پروکسی‌نیتريت بر سطح کورتیزول جلوگیری کرد، در حالی که فلونیکسین فاقد چنین اثری بود. جالب این‌که هر دو داروی ضدالتهاب تأثیر افزایش چشم‌گیری بر میزان قند خون از خود نشان دادند. در این رابطه نیز تأثیر کتوپروفن بیش‌تر از فلونیکسین بود.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که NO باعث کاهش سطح CRH شده و آن نیز به‌نوبه خود منجر به تقلیل آزاد شدن کورتیزول از غده فوق‌کلیوی خواهد گردید [۸]. با توجه به این‌که پروکسی‌نیتريت از متابولیت‌های این رادیکال آزاد می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که در مطالعه فوق نیز ممکن است کاهش CRH و در نتیجه کورتیزول حاصل تبدیل نیتريك‌اکساید به پروکسی‌نیتريت بوده است. با توجه به مصرف فراوان NSAIDها در اقصی نقاط جهان، محققین انتظار دارند

گروه کنترل مثبت (پروکسی‌نیتريت بدون دارو)، غلظت کورتیزول در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش یافته به میزان ۲۳/۲٪ را نشان داد.



نمودار ۱. تغییرات سطوح هورمون کورتیزول در ۴ گروه از خوکچه‌های هندی. میله‌ها از چپ به راست به ترتیب معرف گروه‌های کنترل (con)، درمان شده با پروکسی‌نیتريت و سرم فیزیولوژی (per)، پروکسی‌نیتريت و فلونیکسین (per+flu) و پروکسی‌نیتريت و کتوپروفن (per+ket) می‌باشند. علی‌رغم کاهش در گروه‌های دوم و سوم، تغییرات مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود.

فلونیکسین اثر کاهش‌دهندگی فوق را تحت تأثیر قرار نداد، لیکن کتوپروفن از اثر پروکسی‌نیتريت تا حدودی جلوگیری نمود؛ در این گروه، سطح کورتیزول به میزان ۱۶٪ در مقایسه با گروه دوم بالاتر بود (نمودار ۱). همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، تجویز پروکسی‌نیتريت کاهش مختصری را در میزان قند خون (حدود ۱۱/۳٪) به دنبال داشت که از نظر آماری معنی‌دار نبود. تجویز فلونیکسین و کتوپروفن نه تنها از این کاهش جلوگیری ننمود، بلکه موجب افزایش سطوح قند خون در مقایسه با گروه کنترل نیز گردید. افزایش قند خون در گروه درمان شده با فلونیکسین در مقایسه با گروه‌های اول و دوم به ترتیب ۳۳٪ و ۵۰٪ بود. در گروه درمان شده با کتوپروفن در مقایسه با گروه‌های اول و دوم، قند خون به ترتیب به میزان ۶۷/۸٪ و ۸۹/۲٪ افزایش نشان داد که در مورد اخیر از نظر آماری به سطح معنی‌داری رسید (P=۰/۰۲۹).

از دارویی به دارویی دیگر در این گروه میزان افزایش قند خون متفاوت است و ثالثاً برخی از این داروها ممکن است دیابتوزنیک باشند یا حداقل در بیماران مستعد به دیابت موجب تسریع در بروز شکل بالینی بیماری گردند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان پروفسور حیدری و مهندس جامعی (از دانشکده علوم) و آقایان مانوکزاده و دکتر تهرانی (از دانشکده دامپزشکی) که در مراحل مختلف این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

- [1] Costa B, Conti S, Giagnoni G, Colleoni M. Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclooxygenase systems. *Br J Pharmacol*, 2002; 137(4):413-20.
- [2] Pall ML. Elevated nitric oxide/peroxynitrite theory of multiple chemical sensitivity: central role of N-methyl-D-aspartate receptors in the sensitivity mechanism. *Environ Health Perspect*, 2003; 111(12):1461-4.
- [3] Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(20):13266-71.
- [4] Coruzzi G, Menozzi A, Dobrilla G. Novel non-steroidal anti-inflammatory drugs: what we have learned from animal studies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2004; 3(1):43-61.
- [5] Oyugi C. Medication use in the geriatric population. *Geriatrics Aging*, 2002; 5:33-8.
- [6] Singhi SC. Adrenal insufficiency of critical illness. *Indian Pediatr*, 2002; 39(11):1011-6.
- [7] Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, Verheyen AK, van der Linde HJ, van Ark I, et al. Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 153(5):1697-701.
- [8] Ni X, Chan EC, Fitter JT, Smith R. Nitric oxide inhibits corticotropin-releasing hormone exocytosis but not synthesis by cultured human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82(12):4171-5.
- [9] Di Luigi L, Guidetti L, Romanelli F, Baldari C, Conte D. Acetylsalicylic acid inhibits the pituitary response to exercise-related stress in humans. *Med Sci Sports Exerc*, 2001; 33(12):2029-35.
- [10] Koh KK, Son JW, Ahn JY, Lee SK, Hwang HY, Kim DS, et al. Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. *Int J Cardiol*, 2001; 81(1):43-50.
- [11] Erdogan HM, Gunes V, Gokce HI, Uzun M, Citil M, Yuksek N. Effects of prolonged intravenous Flunixin Meglumine in healthy dogs. *Acta Vet Brno*, 2003; 72:71-8.

این داروها از طریق تداخل با تولید یا عمل هورمون‌ها، اثرات فراوان مفید یا مضر بر سلامت، توانایی یا بهبودی اعمال نمایند [۹]. در مطالعه حاضر، کتوپروفن که یک داروی انسانی است توانست از کاهش کورتیزول ناشی از پروکسی‌نیتريت جلوگیری نماید، که پاسخی به انتظار فوق می‌باشد. لیکن، فلونیکسین که یک داروی دامی است از چنین خاصیتی برخوردار نبود. این دوگانگی و تفاوت در عملکرد، حاکی از این است که یافته‌های حاصل از مطالعه یک NSAID، قابل تعمیم دادن به سایر داروها در این گروه نمی‌باشد.

یکی دیگر از پارامترهایی که در این تحقیق بررسی گردید، اثر پروکسی‌نیتريت بر میزان قند خون و مهار احتمالی آن توسط NSAIDs بود. نتایج کار محققان نشان می‌دهد که میزان قند خون نرمال در خوکچه هندی 125 ± 13 میلی‌گرم در دسی‌لیتر است [۱۰]. در پژوهش حاضر میزان متوسط قند خون در گروه کنترل $15/5$ mg/dl بود که تفاوت کمی را با یافته محققان فوق نشان می‌دهد. مطالعه محققان اثر فلونیکسین را در پارامترهای خون و میزان گلوکز خون نشان می‌دهد که اگر میزان $1/1$ و $2/2$ میلی‌گرم فلونیکسین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۵ بار با فاصله دوازده ساعت به سگ تزریق شود، افزایش معنی‌داری در گلوکز خون ایجاد می‌گردد [۱۱]. نتایج حاصله نشان داد که تجویز پروکسی‌نیتريت اثر کاهنده اندکی روی سطوح گلوکز پلاسما داشت، ولی نکته جالب این بود که هر دو داروی مورد استفاده، قند خون را به میزان قابل توجهی افزایش دادند که در مورد کتوپروفن به سطح معنی‌داری آماری رسید ($P < 0/05$). غلظت گلوکز بعد از درمان با کتوپروفن در حدی بود که با دیابت شیرین بالینی قابل مقایسه بود. بنابراین، یافته جانبی و در عین حال بسیار مهم این تحقیق را می‌توان در این نکته یافت که اولاً داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی قند خون را افزایش می‌دهند، ثانیاً