بررسی اثر نوسکاپین بر التهاب حاصل از برادی‌کینین و هیستامین در کف پای موش صحرایی

نسرین شیری[۱]، معصومه شفیعی[۲]، شاهرخ پاشایی‌راد[۳]، مسعود محمودیان[٤]*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی، موسسه تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

٤- استاد، گروه فارماکولوژی، موسسه تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

* آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، صندوق پستی: ٦١٨٣- ١٤١٥٥

تلفن: ٨٨٠٥٨٦٩٦ (٠٢١)، نمابر: ٨٨٠٥٨٧١٩ (٠٢١)

پست الکترونیک: masmah99@iums.ac.ir

تاریخ دریافت: ٨٣/٤/٢٦ **تاریخ تصویب:** ٨٤/٧/٢٤

چکیده

مقدمه: نوسکاپین یک آلکالویید ایزوکینولینی است که از گیاه خشخاش به دست می‌آید. خاصیت ضدسرفه این دارو به خوبی شناخته شده است. مطالعات قبلی نشان داده است که نوسکاپین یک مهارکننده غیررقابتی برادی‌کینین می‌باشد.

هدف: با توجه به این که برادی‌کینین و هیستامین از مهم‌ترین واسطه‌های التهابی می‌باشند، اثرات نوسکاپین بر التهاب حاصل از برادی‌کینین و هیستامین در کف پای موش سفید صحرایی نر سالم مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: التهاب حاد کف پا توسط تزریق زیر جلدی ۰/۱ میلی‌لیتر محلول برادی‌کینین (۳ nmol) یا محلول هیستامین ۱ درصد ایجاد شد. نوسکاپین در دوزهای (۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)به عنوان استاندارد یک ساعت قبل از تزریق برادی‌کینین یا هیستامین به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. ضخامت کف پای موش‌های صحرایی قبل از تزریق برادی‌کینین و بعد از ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه و در مورد هیستامین قبل از تزریق و ٦۰، ۱۲۰ و ۱۸۰دقیقه بعد از آن به کمک کولیس اندازه‌گیری و با گروه کنترل مقایسه گردید.

یافته‌ها: تجویز نوسکاپین به طور معنی‌داری باعث کاهش التهاب حاصل از برادی‌کینین گردید. بیشترین اثر ضدالتهابی در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آمد که مشابه اثر ضدالتهابی ایندومتاسین بود. نوسکاپین بر التهاب ناشی از هیستامین اثر مهارکننده دارد و ماکزیمم این اثر در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید که با اثر ایندومتاسین قابل مقایسه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که نوسکاپین همانند داروی ضدالتهاب می‌تواند پاسخ التهابی ناشی از برادی‌کینین و هیستامین را در کف پای موش صحرایی مهار کند.

گل‌واژگان: نوسکاپین، التهاب، برادی‌کینین، هیستامین، موش سفید صحرایی

مقدمه

سیستم کینین یکی از سیستم‌های پروتئینی پلاسما است که در ایجاد واکنش‌های التهابی نقش دارد. برادی‌کینین به عنوان مهم‌ترین محصول این سیستم باعث شروع واکنش‌های التهابی، فعالیت نورن‌های مسیر عصبی درد و شروع ادم در بخش آسیب‌دیده می‌شود [۱،۲]. البته برادی‌کینین مسؤول تمام فازهای التهاب نیست، در واقع برادی‌کینین از سایر واسطه‌های التهابی که شامل ایکوزانوییدها، هیستامین، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ماده p می‌باشند، محرک قوی‌تری محسوب می‌شود [۳]. برادی‌کینین یکی از مهمترین میانجی‌های اندوژن دخیل در التهاب و ترشح پلاسما می‌باشد، بنابراین قطعاً نقش موثری در بیماری‌های التهابی دارد [٤،٥،٦].

نوسکاپین یک آلکالویید ایزوکینولینی مشتق از اپیوم است که اثر ضدسرفه آن به خوبی شناخته شده است [۷،۸]. این ترکیب فاقد خاصیت‌های تضعیف تنفسی، ضددرد و اعتیادآوری است که از طریق اثر برگیرنده‌های اپیوییدی ایجاد می‌شود [۹]. تحقیقات نشان داده است که انقباضات حاصل از برادی‌کینین در ایلئوم خوکچه هندی توسط نوسکاپین به صورت وابسته به دوز کاهش می‌یابد [۱۰]. در مطالعات اخیر نوسکاپین در موارد متعددی پاسخ‌های ناشی از برادی‌کینین را آنتاگونیزه نموده است [۱۱،۱۲،۱۳]. با توجه به موارد فوق بر آن شدیم که با ایجاد یک مدل التهابی اثر نوسکاپین را به طور مستقیم بر التهاب حاصل از برادی‌کینین بررسی نماییم. جهت بررسی بهتر اثرات ضدالتهابی نوسکاپین اثر آن بر یکی از میانجی‌های مهم التهابی دیگر یعنی هیستامین نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موش‌های سفید آزمایشگاهی نر از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ – ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند و در گروه‌های شش تایی در قفس در شرایط دوره نوری کنترل شده و دمای ۲۲ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند و به آب و غذای مخصوص دسترسی داشتند.

داروها

در این پژوهش از نوسکاپین (هدیه از شرکت تماد) ایندومتاسین، برادی‌کینین و هیستامین (تهیه شده از شرکت سیگما) استفاده گردید. حلال نوسکاپین اسید استیک خالص به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر برای ۱۰ – ۵ میلی‌گرم نوسکاپین می‌باشد. پس از حل شدن نوسکاپین از سالین برای تهیه دوزهای مورد نظر استفاده گردید. برای تهیه ایندومتاسین، بعد از توزین، پودر خشک در محلول ۰/۱ میلی‌مولار کربنات سدیم به صورت سوسپانسیون درآمد و یک قطره توین ۸۰ به آن اضافه شد تا رسوب نکند. به منظور تهیه محلول برادی‌کینین و هیستامین نیز از سالین استفاده شد. هنگام اندازه‌گیری ضخامت کف پا حیوانات با اتر بی‌هوش می‌شدند.

مراحل آزمایش

۱) ایجاد التهاب توسط برادی‌کینین

برای این مرحله آزمون، موش‌های صحرایی نر به شش گروه تقسیم شدند که شامل یک گروه کنترل و یک گروه حامل (Vehicle) و چهار گروه آزمون بودند. در هر گروه هشت سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت. در گروه‌های آزمون ابتدا نوسکاپین با دوزهای (۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا ایندومتاسین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. در همه گروه‌ها التهاب حاد کف پا به وسیله تزریق زیر جلدی ۰/۱ میلی‌لیتر محلول برادی‌کینین (۳ nmol) به کف پای چپ حیوان ایجاد می‌شد. تمامی تزریق‌های درون صفاقی یک ساعت قبل از ایجاد التهاب در کف پای حیوانات انجام شده و ضخامت کف پای حیوانات قبل از تزریق برادی‌کینین و در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق برادی‌کینین اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ضخامت پا از کولیس استفاده گردید [۱٤]. در گروه حامل، سالین به صورت درون صفاقی تزریق شد. گروه کنترل هیچ‌گونه تزریق درون صفاقی نداشت.

۲) ایجاد التهاب توسط هیستامین

در این مرحله نیز حیوانات در شش گروه مورد آزمایش قرار گرفتند. التهاب حاد کف پا با تزریق زیر جلدی ۰/۱ میلی‌لیتر محلول هیستامین ۱ ایجاد شد. نوسکاپین با دوزهای

(۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و یا ایندومتاسین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مانند مرحله اول یک ساعت قبل از القای التهاب به صورت درون صفاقی تزریق شد. ضخامت کف پای حیوانات قبل از تزریق هیستامین و ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه بعد از آن با کولیس اندازه‌گیری گردید. گروه‌های کنترل و حامل مثل مرحله اول تیمار شدند. در هر گروه ۱۰ سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت.

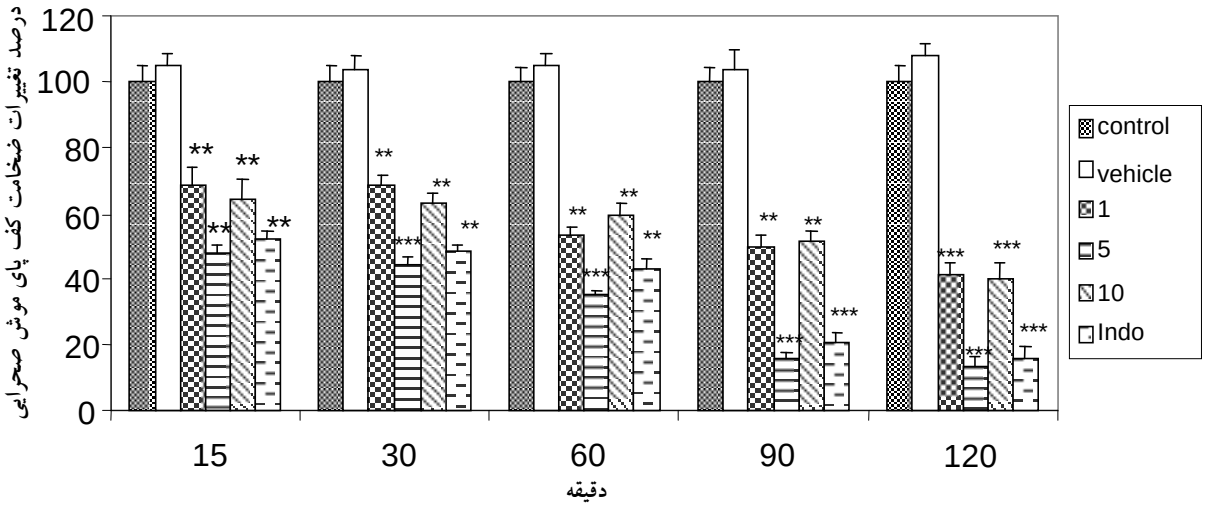
تجزیه و تحلیل آماری

نرم‌افزارهای استفاده شده برای تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها SPSS و Excel و آزمون به کار رفته student's t – test بوده است. تفاوت بین میانگین‌ها در سطح p<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار گزارش شده است.

نتایج

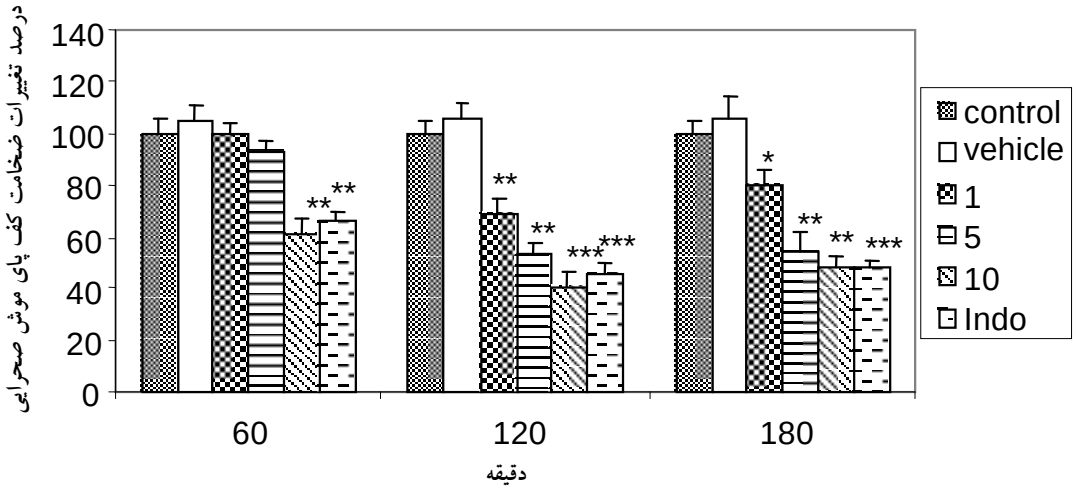
در مرحله اول آزمایش تزریق برادی‌کینین موجب القای التهاب حاد در کف پای موش صحرایی گردید. با بررسی اثر نوسکاپین بر کاهش التهاب کف پا در این مدل حیوانی مشاهده گردید که در تمام زمان‌های اندازه گیری (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و۱۲۰ دقیقه) همه دوزهای نوسکاپین باعث کاهش معنی‌دار ضخامت کف پا نسبت به گروه کنترل می‌گردد. بیشترین کاهش التهاب مربوط به دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که مشابه اثر ایندومتاسین (ضدالتهاب استاندارد) می‌باشد. افزایش دوز نوسکاپین به ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش التهاب کمتری نسبت به دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گردید (نمودار شماره ۱). گروه حامل که به جای نوسکاپین، سالین دریافت کرد، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (نمودار شماره ۱).

در مرحله دوم آزمایش در ساعت اول پس از تزریق هیستامین تنها در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش التهاب معنی‌دار مشاهده شد که قابل مقایسه با اثر ایندومتاسین در این ساعت است. ولی در ساعت دوم و سوم در تمامی گروه‌های آزمون کاهش التهاب معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین کاهش التهاب در ساعت دوم و سوم، مربوط به دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که مشابه اثر ضدالتهابی ایندومتاسین در این ساعت‌ها می‌باشد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱– اثر نوسکاپین بر التهاب حاصل از برادی کینین ومقایسه آن با ایندومتاسین. اثر تزریق درون صفاقی مقادیر مختلف نوسکاپین (۱،۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با اندازه‌گیری ضخامت کف پای موش‌های صحرایی در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق زیر جلدی برادی‌کینین بررسی شد و با داروی ضد التهاب استاندارد ایندومتاسین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مقایسه گردید. نتایج = میانگین ± خطای معیار، (n = ۸). ***p<۰/۰۰۱، **p<۰/۰۱، *p< ۰/۰۵

Indo = ایندومتاسین



نمودار شماره ۲- اثر نوسکاپین بر التهاب حاصل از هیستامین و مقایسه آن با ایندومتاسین. اثر تزریق درون صفاقی مقادیر مختلف نوسکاپین (۱،۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با اندازه‌گیری ضخامت کف پای موش‌های صحرایی در زمان‌های ۶۰،۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه بعد از تزریق زیر جلدی هیستامین بررسی شد و با داروی ضد التهاب استاندارد ایندومتاسین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مقایسه گردید. نتایج = میانگین ± خطای معیار، (n = ۱۰). $^{***}p<۰/۰۰۱$، $^{**}p<۰/۰۱$، $^{*}p<۰/۰۵$ ایندومتاسین = Indo

بحث

در مطالعه حاضر اثر ضد التهابی نوسکاپین بر التهاب حاصل از برادی کینین و هیستامین در دو مرحله جداگانه مورد بررسی قرار گرفته و با اثر ضد التهابی ایندومتاسین که یک داروی ضد التهاب استاندارد می‌باشد مقایسه شد.

تزریق زیر جلدی برادی کینین یک تورم وابسته به دوز در کف پای موش ایجاد می‌کند [۱۵]. نتایج حاصل ازآزمایش‌های ما حاکی ازآن است که نوسکاپین می‌تواند مانع از پیشرفت التهاب حاصل از برادی‌کینین در کف پای موش صحرایی شود، به نحوی که افزایش دوز نوسکاپین تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش اثر ضد التهابی آن گردید. اما دوز بالاتر یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر ضد التهابی کمتری نسبت به دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داد. شاید بتوان این گونه اظهارنظر کرد که این کاهش اثر ضد التهابی در دوز بالاتر به دلیل تغییر در آزادسازی میانجی‌های التهابی مختلف و یا تمایل متفاوت نوسکاپین در اتصال به گیرنده‌ها در دوز بالاتر می‌باشد.

برادی‌کینین نیمه عمر بسیار کوتاهی داشته و به سرعت به پپتیدهای غیرفعال تجزیه می‌شود [۱۶]. با وجود این به علت توانایی سیستم کینین بر القای تولید برادی‌کینین این ماده قوی‌ترین عامل در شروع التهاب شناخته شده است. همچنین برادی‌کینین به صورت مستقیم و غیرمستقیم سایر مدیاتورهای التهابی که نیمه عمر طولانی‌تری دارند را فعال می‌کند [۱۷].

از طرفی مطالعات اخیر روی نوزاد موش‌های صحرایی نشان داده است که نوسکاپین با مهار پاسخ‌های ناشی از برادی‌کینین آسیب مغزی متعاقب ایسکمی را کاهش داده است [۱۳]. از آنجایی که برادی کینین در ادم مغزی نقش اساسی دارد مطالعات بالینی روی بیمارانی که دچار سکته مغزی بودند نشان‌دهنده کاهش مرگ و میر در اثر مصرف نوسکاپین بود [۱۲]. بر اساس همین یافته‌ها در این کار تحقیقی از مدل ایجاد التهاب به وسیله برادی‌کینین استفاده شد که نتایج به دست آمده تایید کننده اثر ضد التهابی نوسکاپین، ناشی از تداخل عمل آن با برادی‌کینین می‌باشد.

در مرحله دوم تحقیق به منظور بررسی اثر نوسکاپین بر سایر واسطه‌های التهابی اثر این دارو بر التهاب حاصل از هیستامین در کف پای موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. هیستامین در تنظیم پاسخ‌های مختلف التهابی و ایمنی نقش دارد، همچنین بعد از تخریب بافتی، هیستامین آزاد شده موجب اتساع عروق خونی و نشت پلاسمای حاوی واسطه‌های

آماس حاد، پادتن‌ها و سلول‌های آماسی می‌شود [۱۸]. نوسکاپین بر التهاب حاصل از هیستامین نیز اثر مهارکنندگی وابسته به دوز داشت که ماکزیمم اثر در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. هیستامین در سلول‌های مختلف باعث آزاد شدن اسید آراشیدونیک می‌شود و به این ترتیب هیستامین آزاد شده در حوزه التهاب می‌تواند از طریق تولید پروستاگلاندین‌ها یا لوکوترین‌ها بر واکنش موضعی اثر بگذارد.برادی‌کینین نیز یک محرک قوی در تولید ایکوزانوییدها بوده و سیستم کینین از عمده‌ترین سیستم‌هایی است که در فعال‌سازی آبشار اسید آراشیدونیک دخالت دارد [۱۹،۲۰]. بنابراین احتمالاً نوسکاپین اثرات ضد التهابی خود را در مهار مسیر فعال شدن آبشار اسید آراشیدونیک اعمال می‌دارد.

اثر ضدالتهابی نوسکاپین در برابر هیستامین و برادی‌کینین با اثر ایندومتاسین که یکی از قوی‌ترین داروهای ضد التهاب غیراستروییدی و مهارکننده سیکلواکسیژناز (مولد پروستاگلاندین) می‌باشد برابری می‌کرد. در مطالعات قبلی نیز ایندومتاسین در کاهش التهاب ناشی از آگونیست گیرنده B2برادی‌کینین موثر بوده است [۱۵]. بنابراین بر اساس نتایج مطالعه حاضر احتمالاً نوسکاپین با آنتاگونیزه کردن پاسخ ناشی از برادی‌کینین می‌تواند مانع پیشرفت التهاب حاصل از برادی‌کینین در کف پای موش صحرایی شود. در مطالعات قبلی نوسکاپین به عنوان آنتاگونیست غیر رقابتی برادی‌کینین شناخته شده است [۱۰]، ولی از آنجایی که نوسکاپین به طور معنی‌داری باعث کاهش التهاب ناشی از هیستامین نیز گردید بنابراین ممکن است اثر نوسکاپین بر روی برادی‌کینین اختصاصی نباشد. شناخت مکانیسم دقیق اثر این دارو احتیاج به تحقیقات بیشتر و مخصوصاً مطالعات بایندینگ روی گیرنده‌های برادی‌کینین و هیستامین دارد.

منابع

1. Aksoy MO, Harakal C, Smith JB, Stewart GJ and Zerweck CP. Mediation of bradykinin-induced contraction in canine veins via thromboxane /prostaglandin endoperoxide erceptor activation. *Br. J. Pharmacol*. 1990; 99: 461- 466.

2. Northover AM. Modification by some antagonists of the shape changes of venous endothelial cells in response to inflammatory agent *in vitro. Agents Action*. 1990; 29: 184 - 188.

3. Ishizaka T, Iwata M and Ishizaka K. Release of histamine and archidonate from mouse mast cells induced by glycosylation enhancing facter and bradykinin. *J. Immonol*. 1985; 134: 1880-1887.

4. Colman RW and Wong PY. Kallikerin-kinin system in pathologic conditions: In Handbook of Experimental Pharmacology Vol 25, Supple Bradykinin Kalidin and Kallikerin. Edited by Erdos EG. Springer. Berlin 1979; pp: 569 - 607.

5. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 1980; 32: 1-46.

6. Proud D and Kaplan AP. Kinin formation mechanisms and role in inflammatory disorders. Annv. Rev. Immunol. 1988; 6: 49 - 83.

7. Karlsson MO, Dahlstorrn B, Eckerans SA, Johanson M, Alm AT. Pharmacokinetics of oral noscapine. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 1990; 39: 275 - 579.

8. Ke Y, Ye K,Grossniklaus HE,Archer DR, Joshi HC and Kappa JA. Noscapine inhibits tumor growth with little toxicity to normal tissues or inhibition of immune responses. *Cancer immunol Immunother*. 2000; 49: 217 - 225.

9. Idanpaan- Heikkila JE, Jalonen K and Vartianinen Am. Evaluation of the antitussive effect of noscapine and codeine on citric acid-induced cough in guinea pigs. *Acta Pharmacol. Toxicol*. 1976; 25: 333-338.

10. Mahmoudian M and Mojaverian N. Effect of noscapine the antitussive opioid alkaloid on bradykinin- induced smooth muscle contraction in the isolated ileum of the guinea- pig. *Acta Physiol. Hung*. 2001; 88: 231-237.

11. Ebrahimi SA, Zareie MR, Rostami P and Mahmoudian M. Interaction of noscapine with bradykinin mediation of cough response. *Acta Physiol. Hung*. 2003; 90: 147 - 155.

12. Mahmoudian M, Mehrpour M, Benissa F and Siadatpour Z. A preliminary report on the application of noscapine in the treatment of stroke. *Eur. J. Clin. pharmacol*. 2003; 59: 579-581.

13. Mahmoudian M, Siadatpour Z, Ziai SA, Mehrpour M, Benissa F and Nobakht M. Reduction of the prenatal hypoxic-ischemic brain edema with noscapine. *Acta Physiol Hung*. 2003; 90: 313-318.

14. Wei F, Zous S, Young A, Dubner R and Ren K. Effect of four herbal extracts on adjuvant-induced inflammation and hyperalgesia in rats. *J. Altern complemented*. 1999; 5: 429-436.

15. Ueno A, Naraba H, Kojima F, Morita E and Oh-ishi S. FR190997, a novel bradykinin B2 agonist expresses longer action than bradykinin in paw edema formation and hypotensive response. *Immunopharmacology*. 1999; 45: 89-93.

16. Vane GR. The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Br. J. Pharmacol.* 1969; 35: 209 - 242.

17. Oneill LA and Lewis GP. Interleukin-1 potentiates bradykinin – and TNF alfa-induced PGE2 release. *Eur. J. Pharmacol*. 1989; 166: 131-137.

18. Katzung BG. Histamine, serotonin & the Ergot Alkaloid In: Basic and clinical pharmacology. 9 th ed, prentice Hall International Inc. Landon. 2004; pp: 259-280.

19. Adam A and Damas J. The kallikerin-kininogen- kinin system: Current concepts and perspectives. *Ann. Biol. Clin*. 1987; 45: 289 - 395.

20. Kontos HA, Wel EP, Kukreia RC, Ellis EF. Hess ML.Differences in endothelium-dependent cerebral dilation by bradykinin and acetylcholine. *Am. J. Physiol*. 1990; 258: 1261 - 1266.