مقاله پژوهشی

اثر محافظتی آلبوترول، اپی نفرین و کرومولین بر ضد مسمومیت زیستی ناشی از اوالبومین در ریه‌های موش صحرایی

رحام آرمند[۱]، محمد کاظم کوهی[۲*]، گودرز صادقی هشجین[۲]، وهاب باباپور[۲]، نسیم خان خواجه[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران
۲- گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: آسم یک بیماری است که در آن راه‌های تنفسی تنگ و متورم و با افزایش میزان ترشحات مخاطی و سلول‌های آماسی در مجاری هوایی همراه می‌شود. اثر محافظتی آلبوترول، اپی نفرین و کرومولین بر ضد مسمومیت زیستی ناشی از اوالبومین در ریه‌های موش صحرایی در مدل حیوانی بیماری آسم است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۸ گروه؛ کنترل منفی (سالم)، کنترل مثبت (حساس)، سالم-آلبوترول، سالم- اپی نفرین، سالم-کرومولین، حساس-آلبوترول، حساس- اپی نفرین و حساس-کرومولین دسته‌بندی شدند. حساس سازی در روز ۱ با تزریق داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول سالین حاوی اوآلبومین (۱۰۰ میکروگرم) و هیدروکسید آلومینیوم (۸ میلی‌گرم) به گروه‌های چهارگانه حساس صورت گرفت. گروه‌های سالم فقط نرمال سالین دریافت کردند. میزان پروتئین تام، تعداد سلول‌های آماسی، مقادیر پلاکت (PC) و پلاتوکریت (PCT) و تعداد گلبول‌های قرمز در مایع خارج‌شده اندازه‌گیری شد.

نتایج: در گروه حساس درمان‌نشده (کنترل مثبت)، تعداد سلول‌های آماسی و پلاکت‌ها از دو برابر گروه کنترل منفی هم تجاوز نمود. هر سه داروی استفاده‌شده (آلبوترول، کرومولین و اپی نفرین) مقدار پایه نشت پروتئین را در حیوانات سالم به‌طور معنی‌داری کاهش دادند ($p<0/05$). از بین داروهای مورداستفاده، کرومولین سدیم هم در گروه‌های حساس و هم در گروه‌های غیر حساس از نشت سلول‌های آماسی به‌طور کامل جلوگیری کرده، مقادیر پلاکت و نشت پروتئینی را به‌صورت معنی‌داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: درمجموع، این مطالعه کارایی چشمگیر سدیم کرومولین را در مقایسه با داروهای آگونیست بتا در جلوگیری از علائم و تظاهرات اختلالات آماسی در حیواناتی که مبتلا به ازدیاد حساسیت تنفسی هستند نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آسم، پروتئین تام، سلول‌های آماسی، پلاکت، پلاتوکریت

مقدمه

آسم به‌صورت بیماری التهابی مزمن مجاری هوایی تعریف‌شده و با افزایش پاسخ‌دهی درخت تراکئوبرونشیال (Tracheobronchial tree) به گروهی از تحریکات مشخص می‌گردد. مشخصه فیزیولوژیک بیماری، تنگ شدن منتشر مجاری هوایی است که ممکن است خودبه‌خود یا با درمان بهبود یابد (۱).

آسم درنتیجه یک التهاب تحت حاد مداوم مجاری هوایی ایجاد می‌شود (۲). محرک‌هایی که منجر به شروع دوره حاد آسم می‌شوند را می‌توان به هفت گروه عمده تقسیم‌بندی نمود: آلرژن، دارویی، محیطی، شغلی، عفونی، مرتبط با ورزش و عاطفی (۳). مطالعات بافت‌شناسی نشانگر هیپرتروفی عضله صاف برونشی، هیپرپلازی (Hyperplasia) عروق مخاطی و زیر مخاطی، ادم مخاطی، برهنگی سطح اپی‌تلیوم، افزایش ضخامت غشای پایه و ارتشاح ائوزینوفیلی (Eosinophilic infiltration) در دیواره

*نویسنده مسئول: محمد کاظم کوهی، گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
Email: mkkoohi@ut.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-8598-3824

برونش‌ها است (۳). تظاهرات فیزیولوژیک و بالینی آسم از تداخل عمل سلول‌های التهابی موجود و ارتشاحی درراه‌های هوایی و اپی تلیوم سطحی، همچنین مدیاتورهای التهابی و سایتوکاین‌ها ناشی می‌گردد. سلول‌هایی که تصور می‌شود نقش مهمی بازی می‌کنند ماست سل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های اپی تلیال مجاری هوایی هستند. نقش نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها و دیگر سلول‌های تشکیل‌دهنده مجاری هوایی کمتر شناخته‌شده است (۲). داروهای در دسترس برای درمان آسم را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد: داروهایی که از انقباض عضلات صاف جلوگیری می‌کنند یعنی به‌اصطلاح داروهای سریع‌الاثر (آگونیست‌های بتا آدرنرژیک، متیل گزانتین‌ها و آنتی‌کولینرژیک‌ها) و عواملی که از التهاب جلوگیری کرده و یا آن را برمی‌گردانند، یعنی «داروهای کنترل درازمدت» (گلوکوکورتیکوئیدها، بتادو- آگونیست‌های طولانی اثر، درمان‌های ترکیبی، عوامل پایدارکننده ماست‌سل‌ها، تعدیل‌کننده‌های لکوترین‌ها و متیل‌گزانتین‌ها) (۴). در طی ۲۰ سال گذشته، اثر ضدالتهابی داروی سدیم کرومولین به شیوه‌ی وابسته به دوز از طریق مهار رهاسازی مدیاتورهای ماست‌سل‌هایی که با IgE حساس شده‌اند در انسان نشان داده‌شده است. سایر مطالعات اخیر آثار ایمونو ساپرسیو سدیم کرومولین را به‌طور انتخابی بر ماکروفاژها و ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها نشان می‌دهد (۵). اثرات کاتکولامین‌ها بر سطح سلولی اعمال می‌شود. انواع گیرنده‌ها شامل گیرنده‌های آلفا، بتا و گیرنده‌های دوپامین هستند. فعال شدن گیرنده β سبب شل شدن عضلات صاف می‌گردد که ممکن است فسفریلاسیون کیناز زنجیره سبک میوزین و ایجاد فرم غیرفعال در آن دخیل باشد. آگونیست‌های گیرنده آدرنرژیک چندین عمل فارماکولوژیک دارند که در درمان آسم اهمیت دارند. این داروها عضلات صاف راه‌های هوایی را شل کرده و آزاد شدن واسطه‌های تنگ‌کننده برونش‌ها از ماست‌سل‌ها را مهار می‌کند. همچنین داروها ممکن است نشت از عروق ریز را مهار کنند و با افزایش فعالیت مژک‌ها، انتقال مخاطی-مژکی را افزایش دهند. شاخص‌ترین عمل آگونیست‌های گیرنده‌ی آدرنرژیک درراه‌های هوایی، شل کردن عضلات صاف راه‌های هوایی است. شواهد کافی مبنی بر وجود گیرنده‌های آدرنرژیک در سطح عضلات صاف راه‌های هوایی موجود است. به‌طورکلی، آگونیست‌های گیرنده آدرنرژیک از راه استنشاقی بهترین اثر را دارند زیرا این روش موجب حداکثر تأثیر موضعی بر عضلات صاف راه‌های هوایی و حداقل عوارض سیستمیک می‌شود. داروهای آگونیست انتخابی گیرنده‌های β_2 آدرنرژیک مخصوصاً آلبوترول، در حال حاضر پرکاربردترین مقلدهای سمپاتیک در درمان تنگی برونش‌ها در مبتلایان به آسم هستند. هدف از این پژوهش، ارزیابی آثار داروهای مذکور بر نفوذ سلولی و نشت پروتئین در مایع لاواژ برونکوآلوئولار در مدل حیوانی بیماری آسم است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام طرح تعداد ۴۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با متوسط وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم از انستیتو رازی تهران خریداری‌شده و به حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷روز جهت تطابق با شرایط جدید نگهداری شدند. حیوانات در طول دوره تطابق و همچنین مطالعه به جیره غذایی تجاری (پلت مخصوص رت) و آب آشامیدنی شهری به‌صورت آزاد دسترسی داشتند. حیوانات در قفس‌های مخصوص رت از جنس پلی کربنات شفاف نگهداری شده و تمیز کردن قفس‌ها و تعویض بستر هفته‌ای ۳ بار صورت گرفت. پس از طی دوره سازش‌پذیری و اطمینان از سلامت ظاهری، این حیوانات به‌طور تصادفی در گروه‌های زیر تقسیم‌بندی شدند: گروه شاهد-سالم (کنترل منفی)، گروه شاهد-آلرژیک (کنترل مثبت) سدیم، گروه شاهد-اپی نفرین، گروه آلرژیک-آلبوترول، گروه آلرژیک- کرومولین سدیم و گروه آلرژیک- اپی نفرین، لازم به ذکر است که در طول دوره آزمون و نیز در تمام مراحل نمونه‌گیری اصول اخلاقی بر پایه مقررات دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در مورد نحوه برخورد و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

القاء آلرژی تنفسی و چالش با آلرژن در رت: ایجاد حساسیت با استفاده از تزریق داخل صفاقی ۰/۱۵ میلی‌لیتر از محلول سالین استریل حاوی ۱۰۰ میکروگرم اوآلبومین و ۸ میلی‌گرم هیدروکسید آلومینیوم (به‌عنوان ادجوانت (Adjuvant)) صورت گرفت. با توجه به اینکه معمولاً برای بروز ازدیاد حساسیت حدود ۲ هفته زمان لازم است برای انجام حساسیت‌زایی، ۱۴ روز پس از تزریق، موش های حساس شده در یک محفظه پلاستیکی شفاف قرار داده‌شده و ۲ بار پشت سرهم در معرض چالش با محلول نبولیزه شده اوالبومین که توسط دستگاه نبولایزر تولیدشده بود، قرار گرفتند. بار اول ۱۰۰ میلی‌گرم از اوآلبومین در ۱۰ میلی‌لیتر سالین و بار دوم ۵۰۰ میلی‌گرم اوآلبومین در

همین حجم از سالین نبولیزه (nebulized) شد. در هر بار، مدت‌زمان نبولیزه کردن ۳۰ دقیقه بود (۶). داروی اوآلبومین که گرفته‌شده از اوآلبومین تخم‌مرغ است به‌عنوان یک آلرژن در شرایط آزمایشگاهی از راه‌های مختلف استنشاقی و تزریقی برای ایجاد آلرژی و شرایط التهابی استفاده می‌شود. گروه شاهد با پروتکلی مشابه تزریقاتی را دریافت نمودند که فاقد اوالبومین بود و تحت چالش با سالین قرار گرفتند. سایر گروه‌های تحت درمان یک‌بار بلافاصله بعد از دریافت اوآلبومین در گروه‌های حساس و سالین در گروه‌های سالم، به مدت ۳۰ دقیقه در معرض داروی موردنظر با دوز ۱mg/ml و به میزان ۱۰ میلی‌لیتر قرار گرفتند. مجدداً به فواصل ۱۲ ساعت، گروه‌ها در معرض داروهای موردنظر به مدت‌زمان ۳۰ دقیقه قرار گرفتند.

لاواژ برونکوآلوئولار (Bronchoalveolar Lavage) **و جداسازی نای:** پس از چالش و استنشاق آئروسل، سپس توسط گاز CO_2 مرگ با ترحم ایجاد شد و لاواژ برونکوآلوئولار با تزریق ۱۰ میلی‌لیتر نرمال سالین به درون نای انجام شد. مایع لاواژ به‌دست‌آمده با دور ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق سانتریفیوژ گردید. سپس، مایع رویی برای پروتئین سنجی جدا شد و رسوب آن برای شمارش کلی سلول‌ها نگهداری شد.

آنالیز آماری: پاسخ‌دهی مجاری هوائی به آلبوترول، کرومولین سدیم و اپی نفرین ارزیابی گردید. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بیان شدند. میانگین‌های ۸ گروه تحت آزمایش توسط آنالیز واریانس طرفه واریانس (One way ANOVA) مقایسه شدند. در آنالیز داده‌ها از برنامه‌های نرم‌افزاری Exel 2003 و PrimerStatistics استفاده شد.

نتایج

الف- نشت عروقی در دستگاه تنفسی: مقدار پروتئین در مایع برونکوآلوئولار در هر دو گروه حیوانات شاهد (کنترل منفی) و آلرژیک (کنترل مثبت) ۰/۲g/dl بود و درنتیجه هیچ‌گونه تفاوتی از این نظر وجود نداشت. جالب اینکه هر سه داروی استفاده‌شده (آلبوترول، کرومولین و اپی نفرین) مقدار پایه نشت پروتئین را در حیوانات سالم به‌طور معنی‌داری کاهش دادند ($p<۰/۰۵$). در شرایط آلرژیک تنها کرومولین سدیم چنین اثری را در حد معنی‌دار به دنبال داشت (جدول ۱).

جدول ۱- نشت عروقی در دستگاه تنفسی

	Animal 1	Animal 2	Animal3	Animal 4	Animal 5	Mean	SEM
C-	۰/۳	۰/۲	۰/۱	۰/۳	۰/۱	۰/۲۰±۰/۱۰	۰/۰۵
C+	۰/۳	۰/۲	۰/۱	۰/۲	۰/۲	۰/۲۰±۰/۰۷	۰/۰۴
C-A	۰/۲	۰/۴	۰	۰/۲	۰/۱	۰/۱۸±۰/۱۵	۰/۰۷
C-C	۰	۰/۱	۰	۰	۰	۰/۰۲±۰/۰۴$	۰/۰۲
C-E	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰	۰/۰۸±۰/۰۴$	۰/۰۲
C+A	۰/۱	۰/۳	۰/۲	۰/۵	۰/۳	۰/۲۸±۰/۱۵	۰/۰۷
C+C	۰/۴	۰/۱	۰/۲	۰/۲	۰/۱	۰/۲۰±۰/۱۲	۰/۰۶
C+E	۰/۲	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۱	۰/۱۸±۰/۰۸	۰/۰۴

-C: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت، C-A: سالم- آلبوترول، C-C: سالم-کرمولین، C-E: سالم- اپی نفرین، C+A: حساس- آلبوترول، C+C: حساس- کرمولین، C+E: حساس- اپی نفرین

ب- فراخوانی سلول‌های آماسی در دستگاه تنفسی: در هر میکرولیتر از مایع برونکوآلوئولار در حیوانات سالم (کنترل منفی) تعداد $۱/۲\times۱۰^{۲}$ سلول آماسی وجود داشت که حیوانات

آلرژیک (کنترل مثبت) به ۲/۸×۱۰۲ عدد افزایش یافت (p<۰/۰۵). هر سه داروی مورداستفاده، تعداد سلول‌ها را در حیوانات سالم کاهش دادند به‌نحوی‌که در مورد کرومولین تعداد آن‌ها عملاً به صفر رسید (p<۰/۰۰۱). در حیوانات آلرژیک، تنها کرومولین باعث کاهش حضور سلول‌های فوق گردید (p<۰/۰۵). جزئیات بیشتر در جدول ۲ آورده شده است.

ج- خونریزی به داخل فضاهای برونکوآلوئولار: در هیچ‌کدام از گروه‌های هشتگانه این پژوهش گلبول‌های قرمز خون در مایع برونکوآلوئولار دیده نشد که نشان‌دهنده عدم بروز خونریزی ناشی از آسیب بافتی است (جدول ۳).

د- تغییرات در تعداد پلاکت‌ها در دستگاه تنفس: در هر میکرولیتر از مایع برونکوآلوئولار در حیوانات سالم (کنترل منفی) ۱۰×۱۰۳ پلاکت وجود داشت که با ۱۲۰٪ افزایش در حیوانات آلرژیک (کنترل مثبت) به ۲۲×۱۰۳ رسید (P=0.004). در حیوانات سالم تنها کرومولین تعداد پلاکت‌ها را حدوداً به میزان ۵۰٪ کاهش داد ولی ازنظر آماری معنی‌دار نبود. در حیوانات

جدول ۲- فراخوانی سلول‌های آماسی در دستگاه تنفسی

	Inflammatory cells						
	1 Animal	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Mean	SEM
C-	۱/۰	۲۱/۰	۰۹/۰	۱۲/۰	۱/۰	۰۵/۰±۱۲/۰	۰۲/۰
C+	۲۱/۰	۲/۰	۳/۰	۲۱/۰	۰/۴۸	*۱۲/۰±۲۸/۰	۰۶/۰
C-A	۱۹/۰	۲۴/۰	۱۲/۰	۳۵/۰	۰۵/۰	۱۱/۰±۱۹/۰	۰۶/۰
C-C	۰	۰	۰	۰	۰	$$$۰۰/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C-E	۰	۰	۰۳/۰	۰	۰	$$$۰۱/۰±۰۱/۰	۰۱/۰
C+A	۴۷/۰	۵۷/۰	۱۴/۰	۱۳/۰	۳۹/۰	۲۰/۰±۳۴/۰	۱۰/۰
C+C	۰۸/۰	۰۵/۰	۱۳/۰	۱۴/۰	۱۷/۰	$۰۵/۰±۱۱/۰	۰۲/۰
C+E	۵/۰	۲/۰	۱۴/۰	۱۵/۰	۹/۰	۳۳/۰±۰۳۸	۱۶/۰

-C: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت، C-A: سالم- آلبوترول، C-C: سالم-کرمولین، C-E: سالم- اپی نفرین، C+A: حساس- آلبوترول، C+C: حساس-کرمولین، C+E: حساس- اپی نفرین

جدول ۳- خونریزی به داخل فضاهای برونکوآلوئولار

	RBC						
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal5	Mean	SEM
C-	۰	۰	۰۱/۰	۰	۰	۰۰/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C+	۰۱/۰	۰	۰	۰۱/۰	۰	۰۱/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C-A	۰	۰۱/۰	۰	۰۱/۰	۰	۰۱/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C-C	۰	۰	۰	۰	۰	۰۰/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C-E	۰۱/۰	۰	۰	۰	۰	۰۰/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C+A	۰۱/۰	۰	۰	۰۱/۰	۰	۰۱/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C+C	۰	۰	۰	۰	۰	۰۰/۰±۰۰/۰	۰۰/۰
C+E	۰	۰	۰۱/۰	۰	۰۱/۰	۰۱/۰±۰۰/۰	۰۰/۰

-C: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت، C-A: سالم-آلبوترول، C-C: سالم-کرمولین،C-E: سالم-اپی نفرین، C+A: حساس-آلبوترول، C+C: حساس-کرمولین، C+E: حساس- اپی نفرین

آلرژیک کاهش پلاکت‌ها توسط کرومولین حدوداً ۵۰٪ (p=۰/۰۹) و اپینفرین حدوداً ۴۰٪ (P=0.017) ایجاد گردید (جدول ۴). در مورد فاکتور پلاتوکریت هم اثرات قابل‌توجهی وجود داشت به‌نحوی‌که در حیوانات آلرژیک ۳ برابر حیوانات سالم بود (p<۰/۰۰۱). در حیوانات آلرژیک این پارامتر توسط هر سه دارو کاهش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۵).

جدول ۴- تغییرات در تعداد پلاکت‌ها در دستگاه تنفس

platelets							
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Mean	SEM
C-	۶	۱۵	۱۱	۱۲	۶	۹۴/۳±۰۰/۱۰	۹۷/۱
C+	۱۹	۲۱	۱۸	۲۳	۲۹	**۳۶/۴±۰۰/۲۲	۱۸/۲
C-A	۱۱	۹	۱۶	۱۶	۱۰	۳۶/۳±۴۰/۱۲	۶۸/۱
C-C	۸	۴	۶	۴	۷	۷۹/۱±۸۰/۵	۸۹/۰
C-E	۹	۲۰	۱۵	۴	۴	۰۲/۷±۴۰/۱۰	۵۱/۳
C+A	۳۷	۱۸	۱۰	۱۲	۱۴	۹۲/۱۰±۲۰/۱۸	۴۶/۵
C+C	۶	۱۱	۱۱	۱۵	۱۶	$$۹۶/۳±۸۰/۱۱	۹۸/۱
C+E	۱۶	۱۴	۱۴	۲۵	۱۰	$۵۹/۵±۸۰/۱۵	۷۹/۲

-C: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت، C-A: سالم-آلبوترول، C-C: سالم-کرمولین، C-E:سالم- اپی نفرین، C+A: حساس- آلبوترول، C+C: حساس-کرومولین، C+E: حساس- اپی نفرین

جدول ۵- تغییرات در تعداد پلاتوکریت در دستگاه تنفس

Platetocrit							
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animl 4	Animal 5	Mean	SEM
C-	۰۱/۰	۰۲/۰	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۰/۰±۰۱/۰	۰۰/۰
C+	۰۲/۰	۰۳/۰	۰۲/۰	۰۳/۰	۰۳/۰	***۰۱/۰±۰۳/۰	۰۰/۰
C-A	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۲/۰	۰۲/۰	۰۱/۰	۰۱/۰±۰۱/۰	۰۰/۰
C-C	۰۱/۰	۰	۰۱/۰	۰	۰۱/۰	۰۱/۰±۰۱/۰	۰۰/۰
C-E	۰۱/۰	۰۲/۰	۰۲/۰	۰	۰	۰۱/۰±۰۱/۰	۰۱/۰
C+A	۰۴/۰	۰۲/۰	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۱/۰±۰۲/۰	۰۱/۰
C+C	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۲/۰	۰۲/۰	$$$۰۱/۰±۰۱/۰	۰۰/۰
C+E	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۱/۰	۰۲/۰	۰۳/۰	$$$۰۱/۰±۰۲/۰	۰۰/۰

-C: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت، C-A: سالم-آلبوترول، C-C: سالم-کرمولین، C-E: سالم-اپی نفرین، C+A: حساس-آلبوترول، C+C: حساس-کرومولین، C+E: حساس- اپی نفرین

بحث

طبق گروه‌بندی‌های صورت گرفته در این مطالعه، موش‌های صحرایی به ۸ گروه مجزا دسته‌بندی شدند. بعد از تهیه لاواژ از مایع برونکوآلوئولار آن‌ها، سنجش میزان توتال پروتئین و سلول-های آماسی؛ تعداد پلاکت و پلاتوکریت صورت گرفت. افزایش معنی‌دار تعداد پلاکت و پلاتوکریت در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی حاکی از تائید ایجاد مدل آسم در این حیوانات بود. در گروه‌های حساس، چالش با استنشاق آلبومین تخم‌مرغی صورت گرفت و در ادامه با سه داروی آلبوترول، کرومولین سدیم و اپینفرین تحت درمان قرار گرفتند. نتایج بررسی‌ها تأثیر بارز کرومولین را در موارد متعددی نشان می‌دهد. کاهش ۵۰٪ میزان توتال پروتئین، سلول‌های آماسی همچنین افت معنی‌دار پلاتوکریت، درمجموع بیانگر این مطلب است که کرومولین یک داروی مؤثر در درمان آسم است. درحالی‌که اپی نفرین تنها روی تعداد پلاکت‌ها و میزان پلاتوکریت مؤثر بود. بااین‌وجود، استفاده از این دارو در گروه‌های سالم که تنها در معرض سالین استنشاقی بوده‌اند، میزان توتال پروتئین و سلول‌های آماسی را به شکل چشمگیری کاهش داد. درنهایت، آلبوترول هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در فاکتورهای ذکرشده اعمال نکرد. این در حالی است که در گروه‌های سالم بازهم می‌توان تأثیر کرومولین را در مقایسه با کنترل منفی به‌وضوح مشاهده کرد. این دارو در گروه‌های سالم میزان توتال پروتئین و تعداد سلول‌های آماسی را به شکل بارزی تحت تأثیر قرارداد ولی اثر چندانی روی پلاکت‌ها نداشت. تعداد گلبول‌های قرمز در تمام گروه‌ها نزدیک به صفر گزارش شد که بیانگر عدم آسیب فیزیکی در حین انجام آزمایش‌ها و مؤید درستی روش به کار گرفته‌شده است. بعلاوه، نشان می‌دهد که تجمع سلول‌های آماسی و بالا رفتن میزان پلاکت‌ها حاصل یک خونریزی عمومی در دستگاه تنفس نبوده و تنها مرتبط با پدیده-های آماسی است. نشت سلول‌های آماسی به داخل برونش یکی از پیامدهای ازدیاد حساسیت در مبتلایان به آسم است که شامل سلول‌های ائوزینوفیل، نوتروفیل، مست سل‌ها و لنفوسیت‌های Tاست (۷). یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابق با نتایج تحقیقات بوکنر و همکاران در سال ۱۹۹۴ و آزاوی و دی‌جی‌کاوانیک در سال ۱۹۹۰، با افزایش ۱۲۰٪ در سلول‌های آماسی در حیوانات حساس شده با اوآلبومین نسبت به حیوانات غیر حساس بود (۱۰-۸). بارنز و همکاران نشان دادند که انسداد راه‌های هوایی نه‌تنها به علت انقباض عضلات صاف دیواره‌ی مجاری هوایی است بلکه هجوم سلول‌های آماسی و نشت عروق میکروواسکولار ریه با ایجاد موکوسی چسبناک به‌نوعی بروز آسم را تشدید می‌کند. علیرغم اینکه غالب مطالعات تاکنون مبنی برافزایش میزان توتال پروتئین و نشت عروقی در ازدیاد حساسیت است (۱۱)، ولی مطالعه‌ی حاضر در مقایسه گروه کنترل مثبت و کنترل منفی تفاوتی در میزان پروتئین نشان نداد که شاید گونه حیوانی و پروتکل مورداستفاده در این رابطه بی‌تأثیر نباشد.

در سال ۲۰۱۰ بنتون و همکاران و در سال ۲۰۰۳ کوبایاشی و همکاران مطرح می‌کنند که آسم آلرژیک نوعی التهاب راه‌های هوایی است که با فعال شدن ائوزینوفیل‌ها و سایر لکوسیت‌ها در موش‌هایی که در معرض آلرژن بوده‌اند همراه است. همچنین حضور پلاکت‌ها در فراخوانی انواع لکوسیت‌ها به مجرای نای برای بروز التهاب ضروری است. هم‌راستا با تحقیقات فوق، نتایج به‌دست‌آمده از گروه کنترل مثبت در این پژوهش نشان می‌دهد که علاوه برافزایش سلول‌های آماسی در مایع برونکوآلوئولار، میزان پلاکت‌ها و حجم آن‌ها افزایش معنی‌داری یافته است (۱۲، ۱۳). سال‌هاست داروهای بتا آگونیست در پروتکل‌های درمانی تیپ‌های مختلف بیماری آسم شرکت دارند. بااینکه آگونیست‌های کوتاه اثر (SABA) مانند آلبوترول در برگشت سریع از انقباض برونش در فرد آسماتیک حیاتی هستند، برای درمان نگهدارندِ کافی نمی‌باشند. استفاده از این داروها متداول است درحالی‌که در مورد سودمندی استفاده از این عوامل در طولانی‌مدت، بین محققین اختلاف‌نظر وجود دارد (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر در مدل موش صحرایی که در معرض آلبومین تخم‌مرغی قرارگرفته بود، آلبوترول اثری بر میزان پایه پروتئین تام و تعداد سلول‌های آماسی در گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی را نداشت. در مقابل، نتایج کارهای بارنز و همکاران در سال ۱۹۹۹ اشاره به این مطلب دارد که بااینکه شل کنندگی عضلات صاف راه‌های هوایی مکانیسم اصلی داروهای بتا ۲ آگونیست در درمان آسم است، رسپتورهای بتا ۲ آگونیست‌ها در طول مجرای هوایی حضورداشته و ممکن است روی سایر جنبه‌های سلولی بخصوص سلول‌های التهابی تأثیرگذارند که منجر به کنترل آسم می‌شود (۱۵). معذالک، کان کان راتا و همکاران و میگر و همکاران نشان دادند که آگونیست‌های بتا ۲ بقای ائوزینوفیل‌ها را در برونش‌ها افزایش می‌دهند، همان‌طور که پیش‌تر شرح داده شد، این امر موجب بقای سایر سلول‌های التهابی و استمرار آسم می‌شود (۱۶، ۱۷). در مطالعه‌ی دیگری مونالیتزاس و همکاران طبق یک پروتکل

ابتکاری در افراد آسماتیک غیر سیگاری میزان ائوزینوفیل در مایع آلوئولار قبل و بعد از درمان با آلبوترول را اندازه‌گیری کردند و در کمال شگفتی افزایشی در تعداد کل و نیز میزان فعالیت ائوزینوفیل‌ها مشاهده شد. درحالی‌که تجویز کرومولین اثر مهاری بر تعداد و فعالیت آن‌ها به همراه داشت (۱۸). مطالعات مختلف در مدل‌های آزمایشگاهی ازدیاد حساسیت را به سه مرحله تقسیم‌بندی کرده‌اند: مرحله‌ی اولیه EAR، مرحله‌ی دیررس LAR، مرحله‌ی دیررس تأخیری LLAR. هم‌جهت با این مطالعه، در مطالعه هاستون و همکاران بر روی مایع برونکوآلوئولار و هیستوپاتولوژی ریه، آلبوترول تنها در فاز EAR حساسیت را مهار می‌کند و تأثیری روی فاز تأخیری آسم ندارد (۱۹) در فاکتورهای اندازه‌گیری شده در مطالعه حاضر اپی نفرین موجب کاهش چشمگیر و معناداری در سلول‌های آماسی در گروه‌های سالم و تحت درمان با اپی نفرین نسبت به کنترل منفی شد؛ و تأثیر چندانی در گروه‌های حساس شده با آلبومین تخم‌مرغی نداشت. این در حالی است که در مطالعه‌ی شرح داده شد که در نوزادان و کودکان مبتلا به آسم حاد و خس‌خس سینه اسپاسم عضلات برونش تأثیر مشهودی درروند ایجاد بیماری ندارد و علت اصلی پاتوفیزیولوژی آسم ادم مخاطی است. درنتیجه بتا آگونیست‌ها کمتر بروی این تیپ آسم می‌توانند مؤثر باشند. آدرنالین نبولایزه تأثیر سریع و کوتاه‌مدت روی ادم مخاطی در درمان اولیه دارد و هم‌چنین در انسداد راه‌های هوایی شدید در کودکان قبل از استفاده از بتا آگونیست‌های استنشاقی باارزش است (۲۰).

نتایج مطلوبی به دنبال تجویز سدیم کرومولین استنشاقی در مطالعه ما به دست آمد. تأثیر این دارو بر کاهش سلول‌های آماسی و میزان نشت عروقی و کاهش پلاکت‌ها معنی‌دار بود. درگذشته کرومولین سدیم تنها در درمان آسم خفیف و متوسط استفاده می‌شد، درحالی‌که اخیراً و هم‌راستا با یافته‌های این تحقیق، گزارش‌ها نشان می‌دهد این دارو به‌تنهایی باعث کنترل مطلوبی هم در کودکان هم در بزرگ‌سالان مبتلا به آسم مقاوم و وابسته به استروئید خوراکی می‌شود (۲۳-۲۱). علاوه بر این، سدیم کرومولین داروی مؤثری در پیشگیری از آسم ناشی از ورزش و واکنش‌های آسماتیک متعاقب چالش استنشاقی با مانیتول است (۵، ۲۶-۲۴). مطالعات بالینی اولیه نشان داد که کرومولین ممکن است اثرات مستقیم بر سلول‌های التهابی داشته باشد که علت آن را افزایش بیان رسپتورهای غشایی و افزایش ظرفیت سمیت یاخته‌ای لکوسیت‌های خون محیطی ذکر کردند (۲۷). در سال ۱۹۸۷ کای و همکاران نشان دادند که در مدل وابسته به زمان و غلظت‌های پایین کرومولین سدیم این دارو خواص ترشحی سلول‌های التهابی را مهار و به‌نوبه خود پیامدهای مهمی در تعدیل مکانیسم التهابی آسم را موجب می‌گردد (۲۸). مبینی و همکاران تأثیر دزهای مختلف سدیم کرومولین را در افراد آسماتیک ایرانی بررسی کردند. در این تحقیق افراد به مدت ۱۵ دقیقه در معرض دارو قرار گرفتند. بهبود نسبی تعدادی از بیماران در پاسخ درمانی به دزهای پایین به این صورت توجیه شد که احتمالاً کرومولین می‌تواند از طریق استنشاقی عملکرد عضلات صاف راه‌های هوایی را تحت تأثیر قرار دهد (۲۹).

نتیجه‌گیری

درمجموع، یافته‌های تحقیق حاضر خاطرنشان می‌کند که استفاده از داروهای تثبیت غشا که از نشت هیستامین و سایر مدیاتورها از ماست سل‌ها ممانعت می‌کنند نه‌تنها در تخفیف علائم تنگی نفس بلکه برای سرکوب واکنش‌های آماسی در ریه قابل توصیه است. این داروها تأثیرات شگرفی بر بسیاری از پدیده-های مضر (ازجمله جارو کردن رادیکال‌های فعال اکسیژن) بر جای می‌گذارند. به‌طورکلی استفاده از داروهایی که اثرات مفید متعدد داشته باشند در مقایسه با داروهای متعددی که هرکدام یک اثر مفید دارند (تک درمانی یا اصطلاحاً مونوتراپی) موجب صرفه اقتصادی از دیدگاه فارماکواکونومی و کاهش اثرات سوء داروها از دیدگاه سم‌شناسی دارویی خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بر اساس استانداردهای رفتار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظارت دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با شماره 3445 ثبت گردیده است، بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در این پژوهش ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Benton AS, Kumar N, Lerner J, Wiles AA, Foerster M, Teach SJ, Freishtat RJ, et al. Airway platelet activation is associated with airway eosinophilic inflammation in asthma. J Investig Med 2010; 58(8):987-90.
2. Carlsen K-H, Larsson K.The efficacy of inhaled disodium cromoglycate and glucocorticoids. Clin Exp Allergy. 1996; 26(4):8-17.
3. Furusho K, Nishikawa K, Sasaki S, Akasaka T, Arita M, Edwards A. The combination of nebulized sodium cromoglycate and salbutamol in the treatment of moderate-to-severe asthma in children. Pediatr Allergy Immunol 2002; 13(3): 209-16.
4. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2000; 106(1):77-83.
5. Anderson SD. Single-dose agents in the prevention of exercise-induced asthma. Treat Respir Med. 2004; 3: 365-379.
6. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. J Immunol. 1996; 156(11):4422-8.
7. White J, paton JY, Niven R, Pinnock H. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Chest clinic 2018;73:293–297.
8. Barnes PJ. Effects of β-agonist on inflammatory cells. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1999;104(2): 10–17.
9. Brogden R. N, Speight T. M, Avery G. S. Sodium Cromoglycate (Cromolyn Sodium): A Review of its Mode of Action, Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Use. Drug, 197; 7:164-282.
10. Francis RS, McEnery G. Disodium cromoglycate compared with beclomethasone in juvenile asthma. Clin Allergy.1984; 14(6):537-40.
11. Barenes PJ. The Pathogenesis of Asthma: a review. J R Soc Med. 1983, 76(7):580-6.
12. Bochner BS, Undem BJ, Lichtenstein LM. Immunological aspects of allergic asthma. Annu Rev Immunol 1994; 12:295-335.
13. Kotaniemi-Syrjanen A, Reijonen TM, Korhonen K, Korppi M. Sodium cromoglycate therapy in wheezing infants: preliminary evidence of beneficial outcome at early school age. Pediatr Int. 2005; 47(6):627-34.
14. Martin RJ, Szefler SJ, Chinchilli VM, Kraft M, Dolovich M, Boushey HA, et al. Systemic effect comparisons of six inhaled corticosteroid preparations. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 165(10):1377-83.
15. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. prevalence and etiology of asthma. J Allergy Clin Immunol 2000; 105(2): 466-72.
16. Kari O, Saari KM. Treatment of eye allergies Duodecim. Duodecim. 2012; 128(3):291-7.
17. Meisler D, Berzins Uldis J, Krachmer Jay H, Stock E. Cromolyn Treatment of Giant Papillary Conjunctivitis. Arch Ophthalmol. 1982; 100(10):1608-1610.
18. Manzolli S, Macedo-Soares MF, Vianna EO, Sannomiya P. Allergic airway inflammation in hypothyroid rats. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104(3 Pt 1): 595-600.
19. Israel E, Drazen JM, Liggett SB, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, et al. The effects of polymorohism of beta-2 adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 162(1):75-80.
20. Petersen W, Karup-Petersen F, Friis B, Howitz P, Nielsen F. Sodium cromoglycate as a replacement for inhaled corticosteroids in mild-to-moderate childhood asthma. Allergy 1996; 51 (12) 870–875.
21. Hashimoto K, Mori S, Hashimoto Y, Kaneko H, Ishibashi K, Ishioka K, et al. DSCG reduces RSV-induced illness in RSV infected mice. J Med Virol 2009; 81(2):354-61
22. Sarsfiled JK, Sudgen E. A comparative study of betamethasone valerate aerosol and sodium cromoglycate in children with severe asthma. Practitioner. 1977; 218(1303):128-32.
23. Shapiro Gail G, König Peter. Cromolyn Sodium: A Review. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 1985; 5(3):156–170.
24. Apold J. Djoseland OInhaled beclomethasone dipropionate in the treatment of childhood asthma . Postgraduate medical journal 1975;51(4):104-5.
25. Loh RKS, Jabara HH, Geha RS. Disodium cromoglycate inhibits Sm to S deletional switch recombination and IgE synthesis in human B cells. J Exp Med. 1994; 180(2):663-71.

26. Uhlig S, Göggel R, Engel S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. Pharmacological reports. Pharmacol Rep 2005; 57 (1): 206-21.
27. Koenig P, Shaffer J. The effect of drug therapy on long-term outcome of childhood asthma: a possible preview of the international guidelines. J Allergy Clin Immunol. 1996; 98(6 Pt 1):1103-11.
28. Kay AB, Walsh GM, Moqbel R, Macdonald A J, Nagakura T, Carroll MP, et al. Disodium cromoglycate inhibits activation of human inflammatory cells in vitro. J Allergy Clin Immunol. 1987; 80(1):1-8.
29. Morton AR, Ogle SL, Fitch KD. Effects of nedocromil sodium, cromolyn sodium, and a placebo in exercise-induced asthma. Ann Allergy 1992; 68(2):143-8.

Original Article

Protective Effects of Albuterol, Epinephrine and Cromolyn Against Ovalbumine-Induced Immunotoxicity in the Rat Lungs

Armand R[1], Koohi MK[2*], Sadeghi Hashjin G[2], Babapour V[2], Khan Khaje N[2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran
2. Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 19 May 2019 Accepted: 02 Sep 2019

Abstract

Background & Objectives: Asthma is a condition in which the respiratory tract is tight and swollen and is associated with increased levels of mucus and inflammatory cells in the airways. Protective effects of Albuterol, Epinephrine and Cromolyn against Ovalbumine-induced immunotoxicity in the rat lungs are observed in the animal model of asthma.

Material & Methods: 40 rats were randomly divided in to 8 groups and classified into: negative-control (normal), positive-control (sensitive), normal-albuterol, normal-epinephrine, normal-cromolyn, sensitive-albuterol, sensitive- epinephrine, and sensitive-cromolyne. With intraperitoneal injection of 0.5 ml of saline solution containing ovalbumin (100 µg), aluminum hydroxide (8mgr) sensitization occurred in 4 sensitive groups. Negative-control group received only saline. Challenge carried out with inhaled administration of ovalbumin (with nebulizer) in two phases (first time 100mgr in ml and second time 500mgr in ml) without intervals, (each times 30 minutes) in sensitive groups. Animals were euthanatized by means of, co2 gas, then with a cervical approach and putting away thymus, trachea was exposed right beneath mandible. The amount of total protein, number of inflammatory cells, platelets(PC), plateletocrite(PCT) and red blood cells in BALF were determined with routine laboratory procedures and measurements were recorded.

Results: The number of inflammatory cells and platelets were more than doubled in untreated-sensitized group (positive-control) in comparison with untreated-normal group (negative-control), while the amount of total protein did not show any significant changes at all. All three drugs (albuterol, chromoline and epinephrine) significantly reduced basal protein leakage in healthy animals($p<0.05$). Among mentioned drugs in this study, sodium cromolyn in both sensitized and unsensitized groups completely inhibited the infiltration of inflammatory cells, and significantly decreased the protein leakage.

Conclusions: Overall, this study shows the impressive performance of the sodium cromolyn in comparison with beta agonists, in preventing signs of inflammatory disorders in animals with respiratory hypersensitiveness. B2 agonists are effective bronchodilator agents on airways but it seems that other useful effects related to them are exaggerated in comparison with most cell stabilizers like cromolyn. So, the use of these agents alongside with bronchodilators in disease such as allergic rhinitis, COPD and asthma, in both human and animals is recommended.

Keywords: Asthma, Total Protein, Inflammatory Cells, Platelets, Platocrit

***Corresponding Author: Koohi Mohammad Kazem**, Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Email: mkkoohi@ut.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-8598-3824