

## تغییرات بافتی اپی تلیوم تنفسی حفرات راست و چپ بینی در پاسخ به کپسایسین در موش

## صحرائی

مرتضی بخشش\*، اسفندیار حیدریان<sup>۲</sup>

۱) گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱/۵

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۳

## چکیده

مقدمه: سیکل بینی، رینیت و پولیپ های یکطرفه بینی، در بسیاری از افراد دیده می شود که دخالت نوسان تون عصبی و عروقی به واسطه رهائش مواد نورهورمونی و وازواکتیو در آنها به اثبات رسیده است. احتمال دخالت واسطه های التهابی نیز در رفلکس های التهابی نازوبرونشیال در پژوهش های اخیر گزارش شده است ولی مکانیسم دقیق آنها هنوز به درستی روشن نشده است.

مواد و روش ها: تعداد ۱۱۴ موش صحرائی نر از نژاد N-MRI در گروههای شش تایی کنترل و آزمون ایجاد التهاب دسته بندی شدند. شدت التهاب پس از ۶ ساعت (حاد) و ۲۴ ساعت (مزمن) بعد از قرار دادن میکروپودهای آغشته به سالین و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین در شاخک میانی بینی اندازه گیری شد. برای ارزیابی شدت التهاب و مکانیسم ایجاد آن، تزریق داخل صفاقی (i.p) دوزهای ۲ و ۵ mg/kg داروی مونته لوکاست (آنتا گونیست عمومی گیرنده لکوترین ها) انتخاب شد.

نتایج: سالین (گروه کنترل) در فاز مزمن موجب افزایش معنی داری در مقدار ترشح موکوس حفرات راست و چپ (به ترتیب ۳۶  $\mu$ l و ۲۸  $\mu$ l) ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ) و تعداد ائوزینوفیل های مخاط برونش (به ترتیب ۲۲/۵ و ۱۷) نسبت به گروه intact شد ( $P < 0.05$ ). دوز ۱۰۰  $\mu$ g کپسایسین پس از ۶ ساعت موجب افزایش معنی دار ترشح موکوس در سمت راست و چپ شد (به ترتیب ۲۴/۳ و ۱۴/۴) ( $P < 0.001$ ). تعداد ائوزینوفیل های برونشی نیز در پاسخ به التهاب به کپسایسین در سمت راست (بترتیب ۱۱/۳ و ۱۶/۷  $\mu$ l) (بترتیب  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ) و در سمت چپ (بترتیب ۹/۲ و ۱۶/۲  $\mu$ l) (بترتیب  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. مونته لوکاست (۵ mg/kg i.p) در دوره مزمن نسبت به گروه کپسایسین ۱۰۰  $\mu$ g کاهش معنی داری در ترشح موکوس حفرات راست و چپ (بترتیب ۴۱/۵ و ۳۵/۵  $\mu$ l) ( $P < 0.001$ ) و تعداد ائوزینوفیل های برونشی (بترتیب ۷/۳ و ۵/۵) ( $P < 0.001$ ) را نشان داد.

نتیجه گیری نهایی: از نتایج این پژوهش چنین استنباط می شود که لکوترین ها در ایجاد اختلالات تنفسی با واسطه راه های هوایی فوقانی نقش مهمی دارند و نتایج متفاوت مربوط به حفرات راست و چپ بینی احتمالاً در ارتباط با تفاوت در نوع عصب گیری اتونومیک این دو حفره می باشد.

واژه های کلیدی: حفرات بینی، اپی تلیوم تنفسی، کپسایسین، راست، چپ

## مقدمه

وقتی از بیماریهای تنفسی صحبت می شود پاتوفیزیولوژی بیماری رینیت را جدا از مکانیسم آسم می دانند چون آناتومی و بافت شناسی این دو عارضه با همدیگر متفاوت است. ولی آنچه که مسلم است، یک سیستم مجاری هوایی واحد وجود دارد و احتمال می رود هر آنچه که قسمتی از مجاری هوایی را درگیر کند، موجب ایجاد اختلال در سایر قسمتهای راههای هوایی نیز گردد (۱). این ارتباط به شکل دو طرفه ایجاد می شود و بستگی به شدت اختلال دارد. اگر یک طیف برای شدت اختلالات فرض کنیم در یک سر این طیف مشکلات جزئی در راههای هوایی فوقانی وجود دارد و در طرف دیگر مشکلات شدید راههای هوایی تحتانی و در وسط طیف مشکلات هر دو مجاری هوایی فوقانی و تحتانی دیده می شود. وقتی یک بیمار آسمی دچار عفونت سینوسی یا پولیپ بینی می شود، شروع به خس خس و سرفه می کند و درمان پولیپ یا عفونتهای مجاری فوقانی، موجب بهبود علائم آسم نیز می شود. این ارتباط به احتمال زیاد بوسیله سیستم اعصاب خود مختار واسطه گری می شود ولی مکانیسم دقیق آن هنوز بدرستی مشخص نشده است (۱).

افزایش میزان تاکی کینین ها در بافتهای ملتهب به اثبات رسیده و شواهد زیادی وجود دارد که تحریک و التهاب مخاط بینی با افزایش سنتز تاکی کینین ها (مثل لکوترین ها) در ارتباط می باشد. احتمالاً، رهایش این نوروپپتیدهای واسطه التهاب، از انتهای آکسون هائی صورت می گیرد که در حالت طبیعی نوروپپتید آزاد نمی کنند و نهایتاً موجب افزایش فعالیت سلول های اپی تلیال و سلولهای عضلات صاف موجود در دیواره مجاری می شوند (۲).

مکانیسم های اولیه ای که مرتبط با التهاب مخاط بینی و پاتوفیزیولوژی آسم می باشند، مربوط به اثرات تحریکی مستقیمی است که بوسیله فعال شدن رفلکس نازوبرونشیال و افزایش ترشحات خلف بینی در اثر فعالیت سلولهای ملتهب و یا انتشار واسطه های التهابی صورت می گیرد که به قسمتهای پائین تر دستگاه تنفس می رسند (۲، ۱). مونته لوکاست به عنوان یک آنتاگونیست عمومی لکوترین ها موجب کاهش التهاب

ناشی از بیماری آسم شده است (۳). اما اثر غیرمستقیم تحریکی بدلیل انسداد مخاط بینی حاصل می شود چون هوای تنفسی فیلتره و گرم نمی شود و عوامل محرک و هوای سرد می توانند اثرات التهابی یا تشدید کننده بر عملکرد اپی تلیوم مجاری پائین تر اعمال کنند (۳، ۴).

کپسایسین به عنوان یک شروع کننده التهاب در بررسی التهاب تنفسی مورد توجه قرار گرفته است (۵) و در این مطالعه نیز برای ایجاد التهاب مورد استفاده قرار گرفت. برای تایید فرضیات پژوهش سعی شد ارتباط بین تغییرات بافت شناسی و فعالیت ترشحی مخاط مجاری فوقانی و تحتانی در اثر ایجاد التهاب موضعی در مخاط حفرات بینی مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش ها

در این پژوهش از ۱۱۴ موش صحرایی نر از نژاد N-MRI ۶۵-۵۰ روزه با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۴۰g برای آزمایش استفاده شد. حیوانات در ۱۹ گروه شش تایی در شرایط ثابت حرارت ( $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) و نور کنترل شده با سیکل متناوب تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته (۷ صبح تا ۷ شب) به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. حیوانات تا روز آزمایش در دسترسی به آب و غذا محدودیتی نداشتند.

## دارو ها و مواد

داروهای مورد استفاده شامل کپسایسین (Sigma Germany - chemicals) و مونته لوکاست (Chayman chemicals - France) (۳) در محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شده و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به صورت تازه از محلول اولیه تهیه شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. برای بیهوش کردن حیوانات، از داروی سدیم پنتوباریتال به میزان ۵ mg/kg استفاده شد و برای ایجاد التهاب در مخاط بینی، دیسک های کوچک کاغذ صافی آغشته به محلول کپسایسین با غلظتهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بروی سطح داخلی توربین های بینی موش قرار گرفت و التهاب ایجاد شده به ترتیب پس از گذشت ۶ ساعت (فاز حاد) و ۲۴ ساعت (فاز مزمن) در سه گروه مختلف بررسی شد.

## گروه های مورد مطالعه

- ۱- گروه intact: تعداد هشت عدد موش به صورت intact در نظر گرفته شد.
- ۲- گروه سالین (کنترل): میکروپد های آغشته به سالین در توربین میانی بینی موش قرار گرفت.
- ۳- گروه کپسایسین: در شش گروه، میکروپد های آغشته به دوزهای کپسایسین در بینی موش قرار گرفت.
- ۴- گروه مونته لوکاست: در شش گروه، پس از تجویز موضعی ۱۰۰ µg کپسایسین در بینی، داروی مونته لوکاست ۲ و ۵ mg/Kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در یکی از گروه ها سه مورد مرگ اتفاق افتاد و داده های آنها از نتایج حذف گردید.

## بررسیهای بافت شناسی

حیوانات قبل از جراحی بوسیله تزریق داخل صفاقی ۵ mg/kg پنتوباریتال بیهوش شدند و نمونه ترشحات داخل بینی و داخل برونشها بوسیله لوله پلی اتیلن (PE10) بدقت لاواژ شد و در لوله های اپندروف توسط سمپلر متغیر اندازه گیری شد. افزایش ترشحات مخاطی به عنوان متغیر قابل اندازه گیری در هر بار نمونه گیری با انجام ساکشن و لاواژ مجاری تنفسی ثبت شد. برای نمونه برداری بافتی، حیوانات با دوز بالای ۳۰ mg/kg تیوپنتال سدیم کشته شدند و پس از قالب گیری و فیکساسیون نمونه های بافتی در اپون<sup>۱</sup>، برش گیری در ضخامتهای ۱۵۰-۲۰۰ µm (Vibroslice-Stoelting) انجام شد و پس از فیکس کردن برشهای گرفته شده روی لام ژلاتینه، بوسیله تکنیک هماتوکسیلین-آئوزین رنگ آمیزی و تعداد آئوزینوفیل های برونش های سگمنتال در واحد سطح (۱cm × 1cm) بوسیله میکروسکوپ نوری به طور تصادفی در پنج فیلد در محل برونش های سگمنتال شمارش شد.

## تجربه و تحلیل داده ها

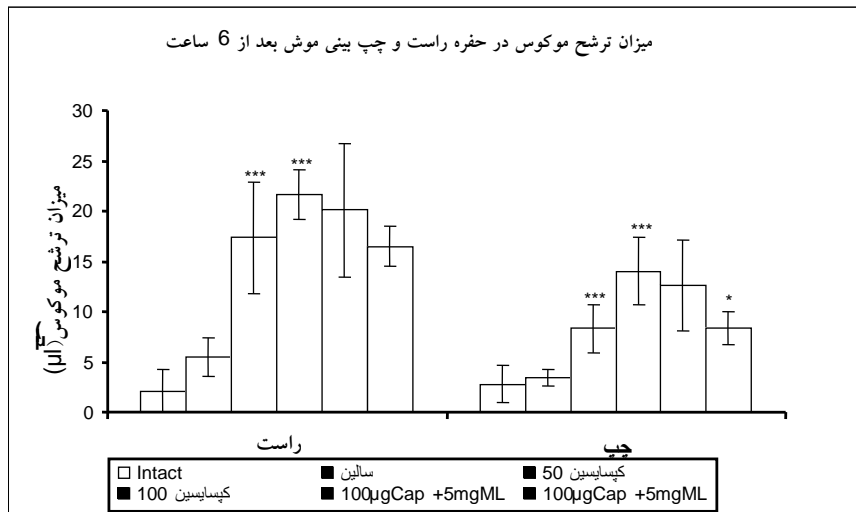
برای مقایسه نتایج بین گروه سالین و گروه intact از آزمون t زوج دو نمونه ای استفاده شده و برای مقایسه اختلاف میانگین ها در بین گروههای مختلف، آزمون ANOVA یک طرفه

<sup>۱</sup>. Epon

بوسیله نرم افزار SPSS11 انجام شد و در صورت معنی دار بودن نتایج، از آزمون Dunnet استفاده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح معنی داری اختلاف میانگین ها برابر با  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

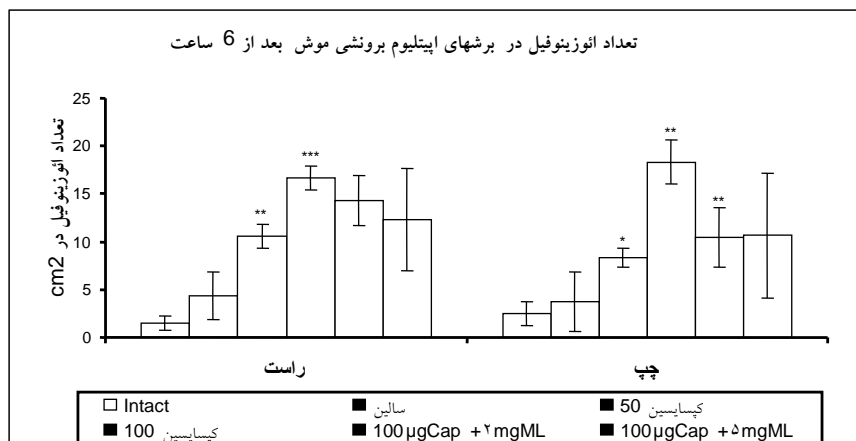
## نتایج

در این مطالعه ۱۱۴ موش صحرائی نر از نژاد N-MRI جهت بررسی ایجاد التهاب در مخاط بینی بر التهاب مجاری تحتانی هوایی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تجزیه و تحلیل داده ها بوسیله آزمون t زوج و ANOVA، شش ساعت پس از شروع التهاب بوسیله میکروپد آغشته به سالین، ترشحات مخاطی حفره بینی در سمت راست و چپ، افزایش معنی داری را نشان نداد ( $P = 0.08$ ) (نمودار ۱). مقایسه میانگین ترشحات بینی در اثر القاء التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین نسبت به گروه کنترل افزایش کاملاً معنی داری را نشان داد ( $P < 0.001$ ). استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست موجب کاهش وابسته به دوز ترشحات بینی شد که این اختلاف فقط در دوز ۵ میلی گرم در مورد مخاط چپ بینی نسبت به گروه کپسایسین ۱۰۰ میکروگرم معنی دار شده است ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۱. مقایسه میانگین ترشحات بینی در اثر القاء التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین (Cap) و استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). (\* =  $P < 0.05$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ ).

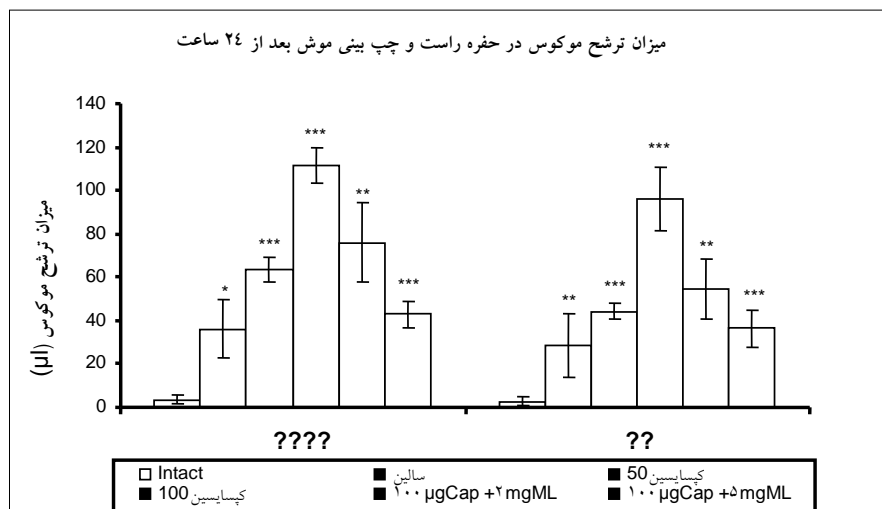
همچنین مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل‌های مخاط برونشی ۶ ساعت پس از شروع التهاب با استفاده از ANOVA در دوز ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم کپسایسین در حفره راست افزایش معنی‌داری در تعداد ائوزینوفیل‌های برونشی در هر سانتی متر مربع را نشان داد ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ). در حفره چپ نیز این اختلاف بطور مشابیهی مشاهده شد ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ) (نمودار ۲). استفاده از دوز ۲ میلی گرم مونته لوکاست موجب کاهش معنی‌دار ترشحات ناشی از التهاب در سمت چپ شد ( $P < 0.01$ ).



نمودار ۲. مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل‌های مخاط برونشی ۶ ساعت پس از شروع التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین (Cap) و استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). (\* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ ). (دوز ۵ میلی گرم ۵ ML n=۵).

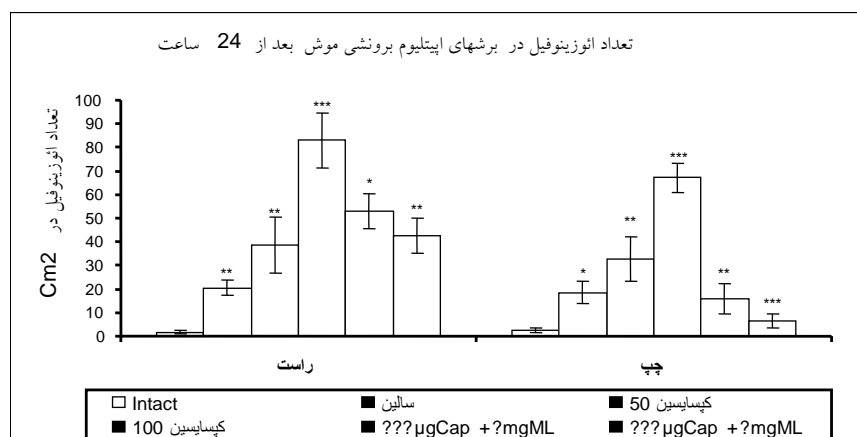
مقایسه میانگین ترشحات حفره سمت راست و چپ بینی ۲۴ ساعت پس از ایجاد التهاب (نمودار ۳) با استفاده از ANOVA نشان داد که بین گروه سالین و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب  $P < 0.001$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$ ) که این اختلاف در هر دو سمت به یک میزان

مشاهده شد. استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست موجب کاهش معنی دار ترشحات ناشی از التهاب در هر دو سمت شد (بترتیب  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ).



نمودار ۳. مقایسه میانگین ترشحات بینی در اثر القاء التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین (Cap) و استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ).

مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل‌های برونشی با استفاده از ANOVA، اختلاف وابسته به دوز معنی داری را در بین گروه‌های سالین و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین و گروه intact نشان داد (نمودار ۴) که این اختلاف در سمت راست (به ترتیب  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ) و سمت چپ (به ترتیب  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ) مشاهده شد. استفاده از داروی مونته لوکاست در دوزهای ۲ و ۵ میکروگرم موجب کاهش معنی داری در تعداد ائوزینوفیل‌های ناشی از التهاب نسبت به گروه کپسایسین شد که درحفره چپ بینی اختلاف بیشتری داشت (به ترتیب  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ).



شکل ۴. مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل‌های مخاط برونشی ۲۴ ساعت پس از شروع التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین (Cap) و استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ).

## بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که التهاب مجاری هوایی فوقانی تنفسی از طریق افزایش تعداد ائوزینوفیل‌ها موجب تغییرات التهابی در مجاری تحتانی تنفس می‌شوند. در این مطالعه التهاب ناشی از میکروپدهای آغشته به سالین موجب افزایش ۵۰ درصدی ترشحات بینی شد. همچنین استفاده از دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرمی کپسایسین موجب ۸۰-۲۰ درصد افزایش در ترشحات بینی و ائوزینوفیل‌های مخاط برونش‌ها گردید. تزریق داخل صفاتی مونته لوکاست به عنوان یک عامل مهارکننده لکوترین‌ها و بخصوص لکوترین D4 موجب کاهش وابسته به دوز اثرات التهابی بالاترین دوز کپسایسین شد. چنانچه در نتایج به دست آمده مشاهده می‌شود، پاسخ حفره بینی راست و چپ نسبت به عوامل التهابی با هم متفاوت هستند. به طوریکه پاسخ التهابی در سمت چپ بینی نسبت به عوامل التهابی در دوره حاد کمتر از سمت راست بینی است و بعلاوه پاسخ داروی ضد التهاب نیز در سمت چپ نسبت به سمت راست شدیدتر مشاهده می‌شود.

در تحقیقاتی که بر روی اثرات کپسایسین و برادی‌کینین بر روی التهاب بینی انجام شده نیز نتایج مشابهی با دوزهای مختلف کپسایسین در هر دو حفرات بینی گزارش شده است (۷، ۸). که این اختلاف مورد توجه چندانی قرار نگرفته است ولی مسیرهای تشدیدکننده رفلکس شیمیایی، و عصبی - هورمونی مورد تایید واقع شده‌اند (۱، ۹، ۱۰).

مکانیسم تشدید کننده علائم در مجاری فوقانی و تحتانی هوایی مشابه است به طوریکه واسطه‌های شیمیایی آزاد شده در اثر التهاب می‌توانند بر روی هر دو نوع مجاری فوقانی و تحتانی تاثیر گذار باشند (۱۱، ۱۲، ۱۳).

نکته قابل توجهی که در این مطالعه به چشم می‌خورد تاثیرات متفاوت التهاب در دو حفره راست و چپ بینی می‌باشد. در گزارشات اخیر ثابت شده است که شیوع پولیپ بینی در افراد مبتلا به آسم بیشتر در حفره راست بینی و در توربین تحتانی بینی بوجود می‌آید و

همچنین در افرادی که مبتلا به پولیپ بینی هستند استعداد بیشتری برای ابتلا به بیماری آسم وجود دارد (۱۳، ۱۴).

نقش تحریکات متفاوت عصبی- عروقی در پاتوژنز آسم به اثبات رسیده است (۱۴). از آنجا که مواد شیمیایی و هورمونی به نحو یکسانی در خون گردش می‌کنند، این پاسخ متفاوت مشاهده شده می‌تواند در اثر عصب‌گیری متفاوت دو حفره بینی از اعصاب خودمختار ناشی شده باشد به طوریکه ممکن است سمپاتیک و پاراسمپاتیک به صورت یکطرفه با حفرات بینی در ارتباط باشند. همانطور که مکانیسم ایجاد سیکل بینی و رینیت وازوموتور نیز کم و زیاد شدن تون عروقی در اثر نوسان فعالیت سیستم عصبی خودمختار می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد التهاب موضعی حفرات بینی راست و چپ به نحو متفاوتی بر کنترل عصبی- هورمونی و تون عروقی مخاط بینی و قطر داخلی برونشها در حالات مختلف پاتولوژیک دخالت داشته باشند که البته برای اثبات این مدعا به مطالعات دقیق تری نیاز است.

**References:**

1. O' Hollaren MT, The upper and lower Airway: 1 airway or 2? *Am J Allergy, Asthm & Immunol.* 2005; 83: 25-32.
2. Michael JC, Bradley JU. Inflammation- induced plasticity of the afferent innervation of the airways. *Env Health perspect.* 2001; 4: 567- 571.
3. Reicin A, White R, Weinstein SF, et al. Montelukast, a Luckotrien receptor antagonist, in combination with loratadine, a histamine receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 2481- 2488.
4. Corren J. The impact of allergic rhinitis on bronchial asthma. *J Allergy clin Immunol.* 1998; 101: 325-6.
5. Borish I, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy clin Immunol*, 1996; 97: 719- 34, *Review.*
6. Sanico Am, Kollast VE, Stanisz AM, Bienenstocky, Togias A . Neural hyperresponsiveness and nerve growth factor in allergic rhinitis . *Int Arch Allergy Immunol .* 1999; 118: 154-8.
7. Riccio MM, Proud D . Evidence that enhanced nasal reactivity to bradykinin in patients with symptomatic allergy is mediated by neural reflexes. *J Allergy clin Immunol.* 1996; 97: 1252-1263.
8. Grant JA, Nicodemus CF, Findlay SR, et al. Cetrizine in patients with seasonal rhinitis and concomitant asthma: prospective, randomized, placebo- controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 923- 932.
9. Eggleston PA. Upper airway inflammatory disease and bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy clin Immunol .* 1988; 81: 1036- 41.
10. Church Mk, Levi- Schaffer F. The human mast cells. *J Allergy clin Immunol .* 1997; 99: 155- 60.
11. Borish I, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy clin Immunol*, 1996; 97: 719- 34.
12. Barnes PJ, Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit care Med .* 1994; 140- 42- 9.
13. Quinn FB, Reyan MW. Turbinate dysfunction: focus on the role of inferior turbinates in nasal airway obstruction. *J Otolaryngol .* 2003; 12: 274- 286.
14. Hanif, J Raymond D. The nasal cycle in health and disease. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2004; 25: 461- 467.