

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

مرتضی بخشش^{*}^۱، اسفندیار حیدریان^۲

(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 رهایش مواد نوروهورمونی و وازاواتکنیو در آنها به اثبات رسیده است. احتمال دخالت واسطه های التهابی نیز در رفلکس های التهابی نازوبرونشیال در پژوهش های اخیر گزارش شده است و لی مکانیسم دقیق آنها هنوز به درستی روشن نشده است.

مواد و روش ها: تعداد ۱۱۴ موش صحراوی 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 میکروپدھای 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 لکوتین ها) انتخاب شد.

نتایج: سالین (گروه کنترل) در فاز مزمن موجب افزایش معنی داری در مقدار ترشح موکوس حفرات راست و چپ (به ترتیب $1\text{ }\mu\text{l}$ و $1\text{ }\mu\text{l}$) ($P<0.05$) و $28\text{ }\mu\text{l}$ و $36\text{ }\mu\text{l}$) ($P<0.01$) تعداد اوزینوفیل های مخاط برونیش (به ترتیب $22/5$ و $17/5$) نسبت به گروه intact ($P<0.05$). دوز $100\text{ }\mu\text{g}$ کپسایسین پس از ۶ ساعت موجب افزایش معنی دار ترشح موکوس در سمت راست و چپ شد (به ترتیب $14/4$ و $24/3$) ($P<0.001$). تعداد اوزینوفیل های برونیش نیز در پاسخ به التهاب به کپسایسین در سمت راست (بترتیب $11/3$ و $16/7\text{ }\mu\text{l}$) ($P<0.01$) و در سمت چپ (بترتیب $9/2$ و $16/2\text{ }\mu\text{l}$) ($P<0.05$) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. مونته لوکاست (5 mg/kg i.p) در دوره مزمن نسبت به گروه کپسایسین $100\text{ }\mu\text{g}$ کاهش معنی داری در ترشح موکوس حفرات راست و چپ (بترتیب $35/5\text{ }\mu\text{l}$ و $41/5\text{ }\mu\text{l}$) ($P<0.001$) و تعداد اوزینوفیل های برونیشی (بترتیب $5/5$ و $7/3$) ($P<0.001$) را نشان داد.

نتیجه گیری نهایی: از نتایج این پژوهش چنین استنباط می شود که لکوتین 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

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

مواد و روش ها

در این پژوهش از ۱۱۴ موش صحرایی نر از نژاد-N-۶۵ MRI ۵۰-۶۵ روزه با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۴۰ گرام برای آزمایش استفاده شد. حیوانات در ۱۹ گروه شش تایی در شرایط ثابت حرارت ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) و نور کنترل شده با سیکل متاوب 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.

داروها و مواد

داروهای مورد استفاده شامل کپسایسین (Sigma chemicals - Germany) و مونته لوکاست (Chayman chemicals - France) (۳) در محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شده و در دمای 40°C به صورت تازه از محلول اولیه تهیه شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. برای بیهوش کردن حیوانات، از داروی سدیم پنتوباربیتال به میزان 5 mg/kg استفاده شد و برای ایجاد التهاب در مخاط بینی، دیسک های کوچک کاغذ صافی آغشته به محلول کپسایسین با غلظتهاي ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بروی سطح داخلی تورین 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.

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 فوقانی 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 عفوتهای 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 بافتهاي ملتهب به اثبات رسیده و شواهد زیادي وجود دارد که تحریک و التهاب مخاط بینی با افزایش سنتز تاکی کینین ها (مثل لکوتین ها) در ارتباط می باشد. احتمالاً، رهایش این نوروپیتیدهای واسطه التهاب، از انتهای آکسون های اپی تلیال و سلوهای 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 اثراً تحریکی مستقیمی است که بوسیله فعل شدن رفلکس نازوبرونشیال و افزایش ترشحات خلف بینی در اثر فعالیت سلوهای ملتهب و یا انتشار واسطه های التهابی صورت می گیرد که به قسمتهای پائین تر دستگاه تنفس می رستند (۲). مونته لوکاست به عنوان یک آنتاگونیست عمومی لکوتین ها موجب کاهش التهاب

بوسیله نرم افزار SPSS11 انجام شد و در صورت معنی دار بودن نتایج، از آزمون Dunnet استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\bar{X} \pm SEM$ 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 صحرایی 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 ($P = 0.8$) (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 ($P < 0.01$). 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 ($P < 0.05$).

گروه های مورد مطالعه

- ۱- گروه intact: تعداد هشت عدد موش به صورت 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 $100 \mu\text{g}$ کپسایسین در بینی، داروی مونته لوکاست ۲ و 5 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.

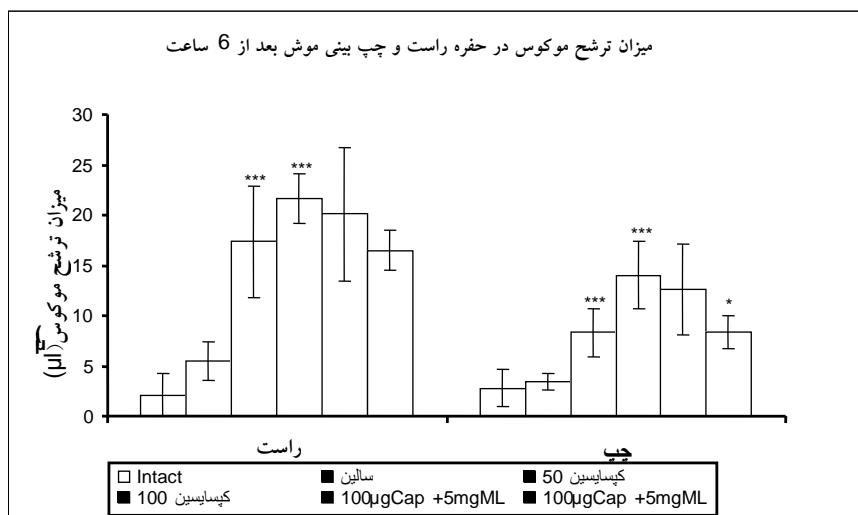
بررسیهای بافت شناسی

حیوانات قبل از جراحی بوسیله تزریق داخل صفاتی 5 mg/kg پنتوباربیتال بیهوش شدند و نمونه ترشحات داخل بینی و داخل برونشهای بوسیله لوله پلی اتیلن (PE10) بدقت لاواز 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 لاواز مجاری تنفسی ثبت شد. برای نمونه برداری بافتی، حیوانات با دوز بالای 30 mg/kg تیوپیتال سدیم کشته شدند و پس از قالب گیری و فیکساسیون نمونه های بافتی در اپون^۱، برش گیری در ضخامت های $150-200 \mu\text{m}$ (Vibroslice-Stoelting) انجام شد و پس از فیکس کردن برش های گرفته شده روی لام ژلاتینه، بوسیله تکنیک هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی و تعداد ائوزینوفیل های برونش های سگمنتال در واحد سطح $\times 1\text{cm}$ (1cm بوسیله میکروسکوپ نوری به طور تصادفی در پنج فیلد در محل برونش های سگمنتال شمارش شد.

تجربه و تحلیل داده ها

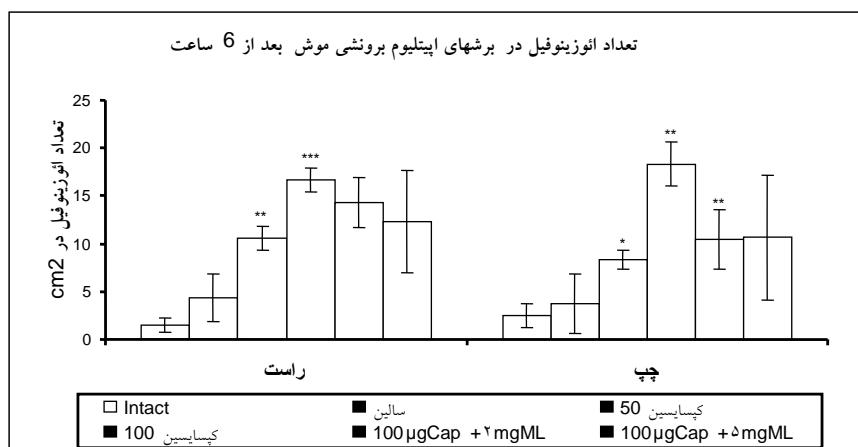
برای مقایسه نتایج بین گروه سالین و گروه intact از آزمون t زوج دو نمونه ای استفاده شده و برای مقایسه اختلاف میانگین ها در بین گروه های مختلف، آزمون ANOVA یک طرفه

^۱. Epon



نمودار ۱. مقایسه میانگین ترشحات بینی در اثر القاء التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین (Cap) واستفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). (**= P<0.01, ***= P<0.001).

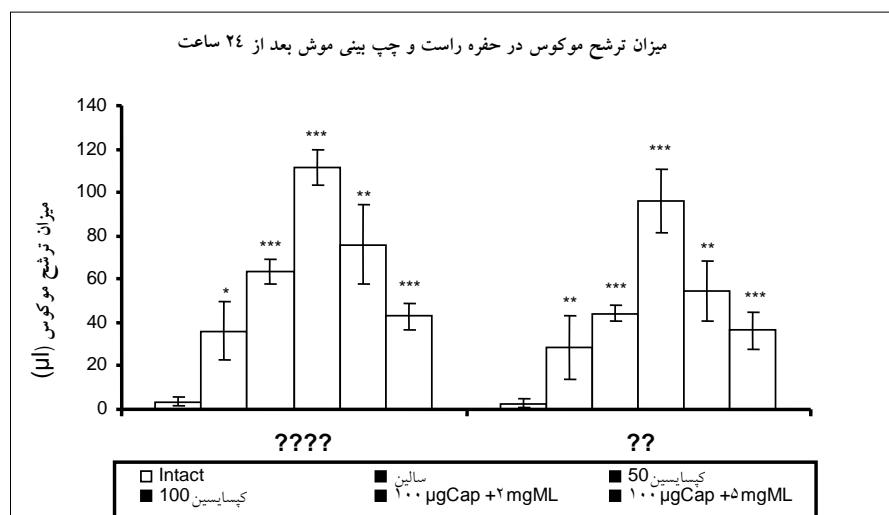
همچنین مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیلهای مخاط برونژی ۶ ساعت پس از شروع التهاب با استفاده از ANOVA در دوز ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم کپسایسین در حفره راست افزایش معنی‌داری در تعداد ائوزینوفیلهای برونژی در هر سانتی متر مربع را نشان داد ($P<0.001$). در حفره چپ نیز این اختلاف بطور مشابه مشاهده شد ($P<0.05$) و (نمودار 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 برونژی ۶ ساعت پس از شروع التهاب بوسیله دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین (Cap) واستفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). (**= P<0.01, ***= P<0.001). (Dose 5 mg ML = P<0.001).

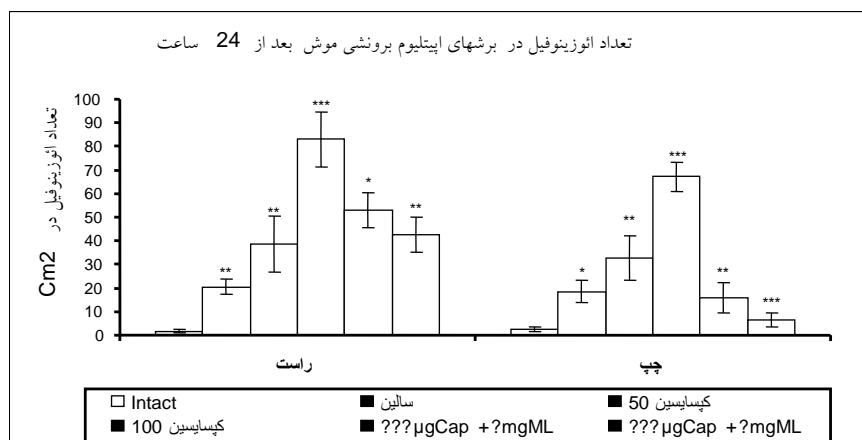
مقایسه میانگین ترشحات حفره سمت راست و چپ بینی ۲۴ ساعت پس از ایجاد التهاب (نمودار ۳) با استفاده از ANOVA نشان داد که بین گروه سالین و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم کپسایسین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود دارد (به ترتیب $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$).

مشاهده شد. استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست موجب کاهش معنی‌دار ترشحات ناشی از التهاب در هر دو سمت شد (بترتیب $P < 0.001$ 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). ($P < 0.001$, $* = P < 0.05$, $** = P < 0.01$, $*** = P < 0.001$).

مقایسه میانگین تعداد ائزوینوفیلهای برونژی با استفاده از ANOVA، اختلاف وابسته به دوز معنی‌داری 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 $P < 0.001$, $P < 0.001$ 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 معنی‌داری در تعداد ائزوینوفیلهای ناشی از التهاب نسبت به گروه کپسایسین شد که در حفره چپ بینی اختلاف بیشتری داشت (به ترتیب $P < 0.001$ و $P < 0.01$).



شکل ۴. مقایسه میانگین تعداد ائزوینوفیلهای مخاط برونژی میکروگرم کپسایسین (Cap) و استفاده از دوزهای ۲ و ۵ میلی گرم مونته لوکاست (ML). ($P < 0.001$, $* = P < 0.05$, $** = P < 0.01$, $*** = P < 0.001$).

بحث

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

نقش تحیریکات 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 عصب گیری متفاوت دو حفره بینی از اعصاب خودمنختار ناشی شده باشد به طوریکه ممکن است سمپاتیک و پاراسمپاتیک به صورت یکطرفه با حفرات بینی در ارتباط باشند.

نتیجه گیری: 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 مدعای مطالعات دقیق تری نیاز است.

نتایج این پژوهش نشان داد که التهاب مجاری هوایی فوقانی تنفسی از طریق افزایش تعداد اوزینوفیل‌ها موجب تغییرات التهابی در مجاری تحتانی تنفس می‌شوند. در این مطالعه التهاب ناشی از میکروپدھای آگشته به سالین موجب افزایش ۵۰ درصدی ترشحات بینی شد. همچنین استفاده از دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرمی کپسایسین موجب ۲۰-۸۰ درصد افزایش در ترشحات بینی و اوزینوفیل‌های مخاط برونش ها گردید. تزریق داخل صفاتی مونته لوکاست به عنوان یک عامل مهارکننده لکوتین‌ها و بخصوص لکوتین 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 التهابزا با هم متفاوت هستند. به طوریکه پاسخ التهابی در سمت چپ بینی نسبت به عوامل التهاب زا بخصوص 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 برادی کینین 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 تشیدکننده رفلکس شیمیایی، و عصبی - هورمونی مورد تایید واقع شده‌اند (۹، ۱۰، ۱۱).

مکانیسم تشیدکننده 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 تأثیرات 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

References:

1. O' Hollaren MT, The upper and lower Airway: 1 airway or 2? *Am J Allergy, Asthma & 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. Cetirizine 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, Reyhan 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.