

## تأثیر ریامپید و کپسول‌اسیون ریامپید با کپسول کیتوزان، بر واسطه‌های التهابی در مدل

### تجربی زخم روده بزرگ موش صحرائی نر

عبدالله حسن زاده<sup>۱</sup>، کاوه شاه‌ویسی<sup>۲</sup>، کامبیز حسن‌زاده<sup>۳</sup>، اسماعیل ایزدپناه<sup>۴</sup>، آریوس امینی<sup>۵</sup>، محمدرامان مولودی<sup>۶</sup>

۱. کارشناس ارشد فن‌آوری نانو، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات اختلالات خواب، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۴. دکترای حرفه‌ای داروسازی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۶. استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۱۸۲۷۴۰۲

x.moloudi@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** ریامپید داروی مشتق از کونولینون است که علیرغم اثر محافظ مخاطی و التیامی (با تولید پروستاگلاندین و موکوس) بر روی زخم معده، حلالیت و نفوذپذیری کمی دارد. از راههای افزایش نفوذپذیری و حلالیت مواد در بدن، استفاده از حامل‌های پلیمری و نانوذرات است که برداشت مواد به درون سلول‌های هدف را به طور مؤثر افزایش می‌دهد. هدف این مطالعه اثر بخشی و مقایسه ریامپید و کپسول‌اسیون ریامپید با کپسول کیتوزان بر واسطه‌های التهابی در مدل تجربی زخم روده بزرگ موش صحرائی است.

**روش بررسی:** در این مطالعه مداخله‌ای-تجربی، ۳۶ سر موش صحرائی نر به شش گروه (N=۶) ریامپید+ کیتوزان، ریامپید، کیتوزان، کنترل (حلال ریامپید)، کنترل مثبت (هیدروکورتیزون) و شش تقسیم شدند. بعد از ۳۶ ساعت ناشتا بودن از طریق تجویز ۲ml اسیداستیک ۴٪ (به گروه شش سالین تجویز شد) به داخل روده بزرگ موشها، زخم القا شد. شش روز پس از آن، حیوانات کشته و نمونه بافت روده بزرگ جهت بررسی محتوی MDA، NO و TNF- $\alpha$  و میزان فعالیت MPO و SOD جدا گردید. تحلیل داده‌ها بوسیله آزمون ANOVA یکطرفه انجام شد.

**یافته‌ها:** کپسول‌اسیون ریامپید با کپسول کیتوزان نه تنها باعث کاهش معنی‌دار ( $P>0/03$ ) سطح TNF- $\alpha$  و NO در مقایسه با محلول ریامپید شد، بلکه باعث کاهش سایر واسطه‌های التهابی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با سایر گروه‌ها شد.

**نتیجه‌گیری:** کپسول‌اسیون ریامپید با کپسول کیتوزان اثر گذاری ریامپید را در کاهش التهاب افزایش داد. هر چند که برای استفاده بالینی دارو به شکل کپسول‌اسیون به مطالعات بیشتری نیاز است.

**کلید واژه:** کپسول کیتوزان، ریامپید، زخم روده، TNF- $\alpha$  و NO.

وصول مقاله: ۹۳/۱۲/۴ اصلاحیه نهایی: ۹۴/۲/۲۰ پذیرش: ۹۴/۲/۲۱

## مقدمه

غیرقطبی باعث شده که فراهمی زیستی ریامپید در انسان کمتر از ۱۰٪ باشد (۱۴ و ۱۳). امروزه برای افزایش حلالیت داروهایی که حلالیت کمی دارند از نانوسوپانسیون‌ها، حامل‌ها و کپسول‌های دارویی استفاده می‌شود (۱۵). تحقیقات بسیاری درباره افزایش دهنده‌های جذب مانند کپسول کیتوزان، که به عنوان حامل مفیدی برای رساندن اختصاصی پپتیدها (انسولین و کلسی تونین) و داروهای ضد التهابی (۵-آمینوسالیسیلیک اسید) به کولون عمل می‌کند، منتشر شده است (۱۹-۱۶). کیتوزان یک آمینو پلی ساکارید خطی است که از کیتین تهیه می‌شود که به علت چسبندگی بی نظیر، خواص دارویی مناسب و تحریک کم سیستم ایمنی، از لحاظ دارویی مورد توجه گسترده قرار گرفته است. حضور گروه‌های عاملی واکنش پذیر باعث تولید مشتقاتی مانند کیتوزان گوگرد دار شده که به دلیل تشکیل پیوندهای دی سولفیدی با گلیکوپروتئین‌های مخاطی غنی از سیستین، دارای ویژگی چسبندگی به مخاط است. و از این راه بازده درمانی دارو را بهبود می‌بخشد (۲۰). در این مطالعه اثر تجویز داخل کولونی کپسول‌های کیتوزان حاوی ریامپید و محلول ریامپید در مدل تجربی کولیت اولسراتیو در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور شاخص‌های مالون دی آلدئید (شاخص برای بررسی سطح استرس اکسیداتیو، MDA)، میزان متابولیت‌های اکسید نیتریک (NO) و همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز (ارزیابی وضعیت آنتی اکسیدانی، SOD)، میلو پراکسیداز (شاخص برای بررسی آسیب اکسیداتیو، MPO) و عامل نکروز تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) (از سایتوکاین‌های فاز حاد ایجاد التهاب) در بافت کولون مورد بررسی قرار گرفت.

کولیت اولسراتیو نوعی بیماری التهابی با اختلالات ترشحی و حرکتی در نواحی انتهائی کولون و رکتوم است. که در آن سیتوکین‌های التهابی و پاسخ ایمنی سلولی افزایش یافته و باعث تظاهرات بالینی مانند حضور خون، موکوس مخلوط با مدفوع و کرامپ شکمی شده که با حرکات روده ای تشدید می‌شود. درمان آن نیز بسته به شدت علائم و وسعت ناحیه روده تعیین می‌شود (۱ و ۲). درمان شامل پنج دسته اصلی داروهای ضد التهاب، تضعیف کننده‌های سیستم ایمنی، عوامل بیولوژیکی، آنتی بیوتیک‌ها، درمان‌های علامتی و در سال‌های اخیر درمان‌های مکمل می‌باشد (۳). گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها با آزادسازی انواع واسطه‌های التهابی و سیتوکین‌های التهابی مانند فاکتور نکروزدهنده تومور-آلفا (TNF- $\alpha$ ) نقش مهمی در کولیت اولسراتیو دارند (۴).

ریامپید داروی مشتق از کونولینون است که نقش مهمی در تسریع و بهبود زخم‌های حاد و مزمن معده، تولید پروستاگلاندین و ترشح موکوس در بافت آسیب دیده را بر عهده دارد (۵). این دارو به علت مهار سایتوکاین‌های التهابی آزاد شده از نوتروفیل‌های وارد شده به بافت روده (۶)، مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن (۷)، داشتن اثرات مفید در بیماران مقاوم به کورتیکواستروئیدها و عوارض جانبی سیستمیک کم، مورد توجه قرار گرفته است (۸). ریامپید بطور وسیع و بمنظور پیشگیری از اثرات جانبی داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹). از دیگر اثرات ریامپید، کاهش میزان آپوپتوز در غدد بزاقی (۱۰)، اثر محافظتی روی میتوکندری سلول‌های روده کوچک و ممانعت از نفوذپذیری زیاد این سلول‌ها به علت تجویز دیکلوفناک است (۱۱). در بیماران با کولیت اولسراتیو نوع پروکتیت، تنقیه ریامپید، التهاب قسمت‌های انتهایی کولون را کاهش می‌دهد (۱۲). با همه این ویژگی‌ها، حلالیت و نفوذپذیری کم ریامپید در حلال‌های قطبی و

## روش بررسی

این مطالعه از نوع مداخله ای- تجربی می باشد که در آن ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با محدوده وزنی  $25 \pm 240$  گرم بطور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی ( تعداد نمونه ها بر اساس واریانس کم داده های نتایج مطالعات قبلی و مطالعات حیوانی انجام شده مشابه، انتخاب شد) تقسیم شدند. حیوانات تحت شرایط نوری، دما، رطوبت ثابت و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند (۲۶، ۲۵، ۹، ۶).

داروها و مواد: ۴۰ میلی گرم در لیتر کربوکسی متیل سلولز که حاوی ۱۰ میلی مول در لیتر NaOH است بعنوان حلال داروی ریپامپید مورد استفاده قرار گرفت که به همراه ریپامپید از شرکت سیگما تهیه شدند. ریپامپید تهیه شده توسط دستگاه الکترواسپری به صورت ذرات نانو در آمده و بوسیله کپولهای کیتوزان کپسوله شده که از شرکت ( Aicello Chemical Company Ltd. Toyohashi, Japan) تهیه شد (اندازه و شکل کپسولهای بدست آمده در غلظت های مشخص کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM) بررسی و مشخص شد که قطر هر کپسول در حدود  $0.21 \times 0.11$  میلیمتر و وزن هر کپسول ۰/۵ میلی گرم است. همچنین گروه های عاملی گوگردی و پوسته کپسولها توسط طیف مادون قرمز مشخص شد). پردنیزولون از شرکت داروسازی کاسپین، دی ایتل اتر و اسید استیک از شرکت مرک آلمان، کیتهای MDA، MPO، SOD، NO از شرکت ZellBio آلمان و  $TNF-\alpha$  از شرکت Roche آلمان خریداری شد.

گروه های آزمایش: شش گروه مورد آزمایش شامل: گروه کپسول کیتوزان حاوی ۳۰ mg/kg ریپامپید، گروه دریافت کننده کپسول فاقد ریپامپید، گروه دریافت کننده محلول ۳۰ mg/kg ریپامپید، گروه دریافت کننده حلال ریپامپید

(محلول کربوکسی متیل سلولز)، گروه کنترل مثبت دریافت کننده هیدروکورتیزون استات (۲۰ mg/kg) و گروه سالم (شم) دریافت کننده نرمال سالین (۲ ml/kg) تقسیم شدند. تیمار در همه گروهها ۲۴ ساعت بعد از القای کولیت شروع شد و به مدت ۵ روز، روزانه یکبار در روز ادامه پیدا کرد. تجویز داروها تحت بیهوشی خفیف با اتر و از طریق رکتوم به داخل روده بزرگ تزریق می شد.

روش القای کولیت توسط اسید استیک و تجویز دارو: موشهای صحرایی به مدت ۳۶ ساعت در حالت محرومیت از غذا با دسترسی آزاد به آب و در قفس های جداگانه با کف توری برای جلوگیری از مدفوع خوری نگهداری شدند. القای کولیت تحت بیهوشی خفیف با اتر و با استفاده از ۲ میلی لیتر اسیداستیک ۴ درصد (pH=2.3) و از طریق یک لوله پلاستیکی به قطر داخلی ۲/۵ میلی متر و طول ۸ سانتی متر از راه رکتوم داخل روده بزرگ حیوان وارد گردید. در زمان تجویز داخل رکتومی، حیوان به مدت ۱ دقیقه در حالت ترندلبرگ (Trendelenburg position) قرار می گیرد. داخل کولون حیوان بعد از ۱ دقیقه با ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی شستشو داده شد (این الگو برای تجویز داخل رکتومی داروها و محلولها در روزهای آزمایش و در گروه های مختلف رعایت شد). سپس موش های صحرایی در داخل همان قفس ها به مدت ۲۴ (مدت زمان لازم برای ایجاد کولیت اولسراتیو) ساعت نگره داری شدند. پس از آن تجویز داروها و محلولها از راه تزریق رکتومی در گروه های مختلف شروع شده و با گذشت ۵ روز از دوره درمان و ۲۴ ساعت پس از آخرین تجویز موش ها توسط اتر با دوز بالا کشته شدند (۲۱).

نمونه برداری: بعد از باز کردن شکم، میزان ۶ سانتی متر کولون انتهایی، به فاصله ۳ سانتی متر از مقعد، جدا شده، و پس از باز کردن بافت در راستای طول آن توسط نرمال سالین سرد شسته و نمونه ای

اضافه نمودیم، سپس محلول را ۲ بار متوالی فریز و گرم نموده سوپرناتانت آن جدا شده و به آن یک سی سی محلول تری باربیتوریک اسید با غلظت ۶/۷ گرم در لیتر اضافه نمودیم. بعد از آن لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده، پس از سرد شدن در طول موج ۵۳۲ نانومتر غلظت مالون دی آلدئید به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر و به وسیله ضریب جذب کمپلکس مالون دی آلدئید تری باربیتوریک اسید که برابر با  $10^{-5} \times 1/56$  به صورت نانوگرم در میلی گرم پروتئین است، محاسبه شد. برای اندازه گیری SOD از روش رنگ سنجی و در طول موج ۴۲۰ nm استفاده شد. اندازه گیری NO به طور غیر مستقیم و با اندازه گیری غلظت نیترات و نیتريت که با عامل رنگزا واکنش داده و ترکیب آزو صورتی رنگ تولید می کنند، سنجیده شد (۲۵-۲۳).

آنالیز بیوشیمیایی تعیین میزان TNF- $\alpha$ : ۱۰۰ میلی گرم از بافت کولون درون بافر فسفات (PBS; pH=۷/۴) حاوی mM ۱۰ Triton X-100 داخل حمام یخ ۳ بار به مدت ۳۰ ثانیه هموژنایز گردید. محصول به درون لوله های اپندورف منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس سوپرناتانت به دست آمده تا زمان آنالیز در دمای  $80^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد. سیتوکین های TNF- $\alpha$  توسط کیت ELISA مخصوص موش صحرایی و با توجه به دستورالعمل تولیدکننده کیت اندازه گیری شد. جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۵۰ nm تعیین و سطوح TNF- $\alpha$  به صورت پیکوگرم/میلی لیتر نشان داده شد (۲۶).

تحلیل آماری: بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف، برای مقایسه های چندگانه از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و بدنبال آن آزمون تعقیبی Tukey's استفاده شد. نتایج به صورت

از بافت مخاطی در میکروتیوب و در نیتروژن مایع فریز شد و برای آنالیز بیوشیمیایی و ارزیابی فاکتورهای مختلف در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند.

بررسی فعالیت میلوپروکسیداز (MPO) مخاطی: ۱۰۰ میلی گرم نمونه ی مخاطی کولون ۳ بار به مدت ۳۰ ثانیه داخل ۲ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی ۰/۵ درصد HTAB (هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید) (pH=۶) هموژنایز شد. محصول به درون یک لوله نمونه انتقال داده شد و داخل حمام یخ به مدت ۱۰ ثانیه بوسیله امواج صوتی به ذرات کوچکتر تبدیل گردید. سپس ۳ بار متوالی فریز و گرم شد و دوباره ۱۰ ثانیه سونیکه گردید. بعد از آن سوسپانسیون به دست آمده با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ شد و سوپرناتانت برای اندازه گیری فعالیت MPO مورد آنالیز قرار گرفت. بدین ترتیب که ۰/۱ میلی لیتر از آن به ۲/۹ میلی لیتر بافر  $50\text{ mM K}_3\text{PO}_4$  (pH=۶) حاوی ارتودیانیزیدین دی هیدروکلراید (۰/۱۶۷ mg/ml) و هیدروژن پراکسید ۰/۰۰۵٪ افزوده شد. جذب محصول واکنش، توسط اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160) در طول موج ۴۵۰ nm تعیین شد. فعالیت MPO به صورت واحد بر وزن بافت بیان گردید (۲۲).

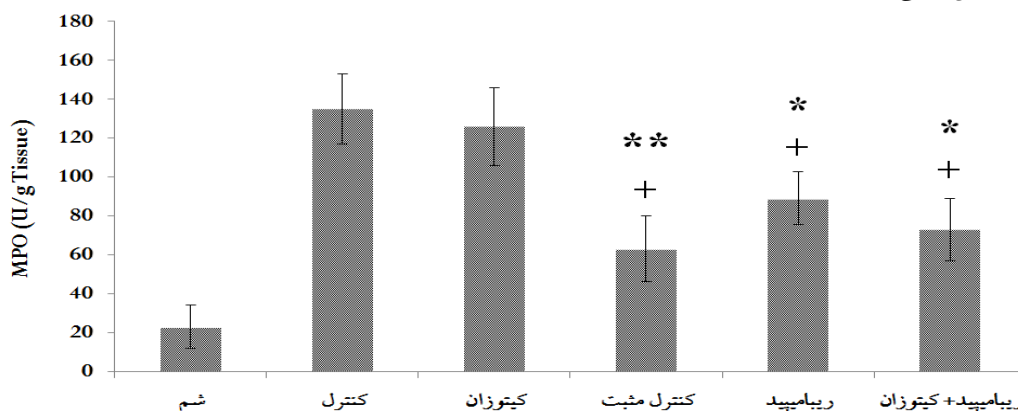
بررسی میزان مالون دی آلدئید (MDA) مخاطی: به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160) و با روش دارپر و هادلی و بر اساس واکنش با تری باربیتوریک اسید، میزان مالون دی آلدئید اندازه گیری شد. ۱۰۰ میلی گرم از بافت کولون را در ۲ سی سی محلول بافر فسفات هموژن (pH=۷/۴) قرار داده، آن را با دور کم و به مدت ۴ دقیقه در دستگاه هموژنایزر قرار دادیم. بعد لوله حاوی سوسپانسیون را در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  قرار دادیم. در مرحله بعد سوپرناتانت را جدا نموده و به آن محلول تری کلرواستیک اسید

گروه‌های درمان شده با ریپامپید و ریپامپید+ کیتوزان در مقایسه با گروه‌های کنترل و کیتوزان بطور معنی داری ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت، این تغییر در مورد فعالیت SOD بصورت افزایش معنی دار ( $P < 0/05$ ) بود. با این وجود میزان فعالیت MPO و SOD بافت کولون در گروه تیمار ریپامپید+ کیتوزان با گروه ریپامپید تغییر معنی داری را نشان نداد (نمودار ۱ و ۲).

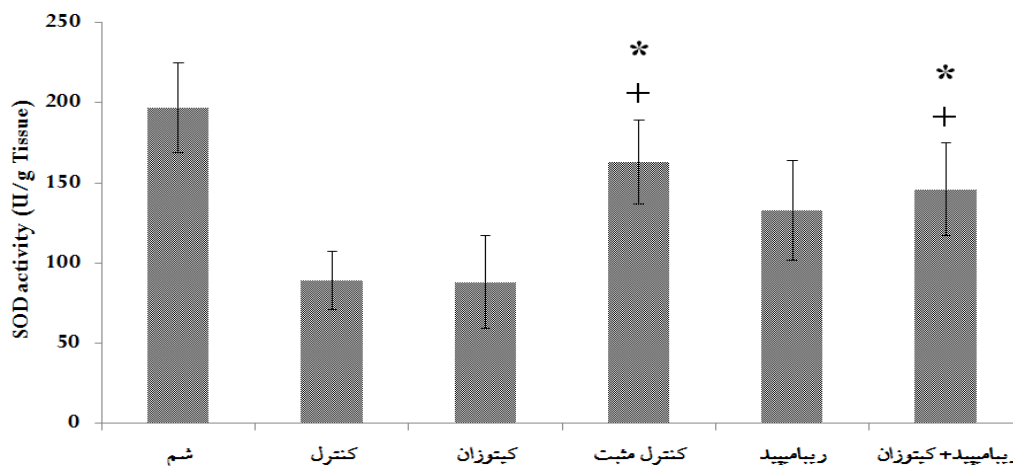
میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SEM) مقادیر کمی در هر گروه بیان شد. در همه تحلیل‌ها  $P < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

بررسی در بافت کولون نشان داد که فعالیت MPO گروه کنترل مثبت (هیدروکورتیزون) در مقایسه با گروه‌های کنترل ( $P < 0/01$ ) و کیتوزان ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت، این تغییر در مورد فعالیت SOD بصورت افزایش معنی دار ( $P < 0/05$ ) بود. فعالیت MPO



نمودار ۱. سطح فعالیت MPO در بافت کولون در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  می‌باشند.  $P < 0/05^*$ ,  $P < 0/01^{**}$  دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل و  $P < 0/05^+$  دارای اختلاف معنی دار با گروه کیتوزان ( $n=6$ ).



نمودار ۲. میزان فعالیت آنزیم SOD در بافت کولون در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  می‌باشند.  $P < 0/05^*$  اختلاف معنی دار با گروه کنترل و  $P < 0/05^+$  اختلاف معنی دار با گروه کیتوزان ( $n=6$ ).

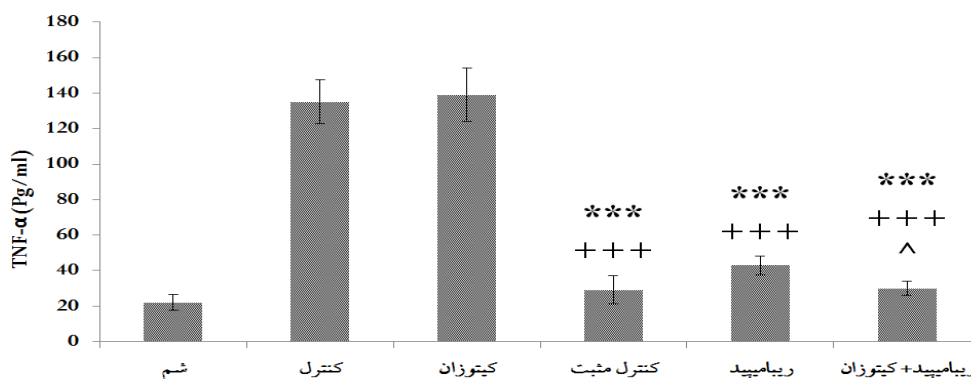
التهاب و سطح TNF- $\alpha$  سطح متابولیت‌های NO کاملاً مشهود است به طوری که این مقدار بسیار به داده‌های گروه شم نزدیک است. مقدار MDA در گروه‌های مختلف که در آنها کولیت القاشده بود، علیرغم کاهش MDA ناشی از تیمار بوسیله ریبامپید+ کیتوزان اما این تغییر معنی دار نبود (جدول ۱ و نمودار ۳).

نتایج بررسی سطح TNF- $\alpha$ ، MDA و متابولیت‌های NO در بافت کولون نشان داد که میزان TNF- $\alpha$  ( $P < 0/001$ ) و مقدار متابولیت‌های NO ( $NO^2^-/NO^3^-$ ) کاهش معنی داری را نشان داد. همچنین در مقایسه با ریبامپید استفاده از ریبامپید+ کیتوزان باعث کاهش معنی دار ( $P < 0/03$ ) سطح TNF- $\alpha$  در بافت کولون شد. تأثیر قابل توجه استفاده از کیتوزان بعنوان حامل دارو در کاهش

جدول ۱. مقدار MDA و متابولیت‌های NO در کولیت القاشده توسط اسید استیک در موش صحرائی N=۶ (مقادیر به صورت mean $\pm$ SEM بیان شده اند)

گروه	MDA (nmol/g Tissue)	NO metabolite (nmol/g Tissue)
شم	287 $\pm$ 12	249 $\pm$ 69
کنترل	80 $\pm$ 16/8	532 $\pm$ 148
کیتوزان	83 $\pm$ 19/6	512 $\pm$ 110
کنترل مثبت	50 $\pm$ 13/3	441 $\pm$ 108
ریبامپید	69 $\pm$ 18/7	476 $\pm$ 113
ریبامپید+ کیتوزان	60 $\pm$ 13/7	279 $\pm$ 81*

( $P < 0/05^*$  تفاوت معنی دار با گروه ریبامپید،  $P < 0/02^+$  تفاوت معنی دار با گروه کیتوزان و  $P < 0/03^{\wedge}$  تفاوت معنی دار با گروه کنترل)



نمودار ۳. میزان TNF- $\alpha$  دریافت کولون در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت mean $\pm$ SEM می باشد (n=6).  $P < 0/001^{***}$  اختلاف معنی دار با گروه کنترل،  $p < 0/001^{+++}$  اختلاف معنی دار با گروه کیتوزان و  $p < 0/03^{\wedge}$  اختلاف معنی دار با گروه ریبامپید.

## بحث

نتایج این بررسی نشان داد که القای زخم در روده بزرگ به روش بکار رفته در این مطالعه، سبب کاهش فعالیت SOD، افزایش فعالیت MPO، افزایش محتوی MDA، NO و افزایش سطح TNF- $\alpha$  بافتی شد، که شاخص‌های معرف آسیب روده بزرگ می‌باشند. این یافته‌ها با نتایج بدست آمده از مطالعه Liu و همکاران در تأیید مدل فوق هم‌خوانی دارد (۲۳). تجویز محلول اسید استیک ۴٪ رقیق شده به داخل کولون، التهابی شبیه به التهاب کولیت اولسراتیو حاد در انسان ایجاد می‌کند. که با تغییرات هیستوپاتولوژیکی همانند اینفیلتراسیون سلولی (تک و چند هسته ای)، ادم مخاطی، زخم شدید کولون و افزایش ترشح واسطه‌های التهابی همراه است (۲۱).

در این مطالعه تجویز داخل کولونی ریبامپید و ترکیب ریبامپید + کیتوزان موجب بروز اثرات محافظتی در مقابل کولیت القایی ناشی از تجویز اسید استیک ۴٪ شد. این مهم از طریق اثرات آنتی-اکسیدانی و تعدیل پاسخ سیستم ایمنی در تولید سایتوکاینهای التهابی مشاهد شد. در بیماریهای التهابی روده شاخص‌های متابولیتی واکنشی مانند اکسیژن و نیترژن بوجود می‌آید (۲۸ و ۲۷). این شاخص‌های متابولیتی منجر به شروع واکنشهای زنجیره ای رادیکال‌های آزاد شده که پیامد آن در مرحله اول تخریب DNA، پروتئینها، آنزیمها و غشای سلول است. در مرحله دوم تخریب سد مخاطی سلولهای روده و فعال‌سازی واسطه‌های التهابی می‌شوند. سلول‌های ملتهب شده بتدریج عملکرد غیرطبیعی را نشان می‌دهند که بخشی از آن بعلت افزایش محتوی NO در این سلولها است (۳۰ و ۲۹). ریبامپید با خواص آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکالهای آزاد نه تنها باعث کاهش محتوی MDA (هر چند که این کاهش معنی دار نبود) و NO شد، بلکه باعث افزایش فعالیت SOD شد. SOD اولین دفاع در برابر استرس اکسیداتیو است که در روزهای

اول، باعث فعال سازی واسطه‌های التهابی می‌شود (۳۱). علت احتمالی عدم تفاوت معنی دار گروه ریبامپید+ کیتوزان با گروه محلول ریبامپید در میزان فعالیت SOD شاید نمونه برداری در ۶ روز پس از القای التهاب باشد. کاهش NO ممکن است ناشی از کاهش فعالیت نیتریک اکساید سنتتاز باشد (۳۲). در مقایسه با ریبامپید استفاده از ریبامپید به همراه کپسول کیتوزان روند کاهشی محتوی NO بافتی را بطوری معنی داری تشدید نمود. مطالعات قبلی نیز موید یافته‌های این مطالعه است که استفاده از کپسول‌های کیتوزان و افزایش دهنده‌های جذب می‌توانند نفوذپذیری و جذب این دارو را افزایش دهند (۳۳). حامل‌های دارویی قادرند دارو را به طور اختصاصی به بافت‌های ملتهب انتقال داده و در بافتهای التهابی مجتمع نمایند. در مقایسه با محلول دارو بسیار موثرتر و طولانی‌تر در بافت‌های التهابی باقی می‌ماند و از این طریق عوارض جانبی داروهای شیمیایی ضد التهاب را کاهش می‌دهند (۳۴). در شروع و پیشرفت کولیت اولسراتیو، استرسهای اکسیداتیو نقش قابل توجهی دارند (۳۶ و ۳۵) که در اثر انفیلتراسیون سلول‌های ایمنی به محل التهاب و تولید مقدار زیادی ترکیبات مضر مانند ROS (Reactive Oxygen Species) موجب آسیبهای اکسیداتیو و نهایتاً مرگ سلول یا آپوپتوز می‌شوند (۳۷). رادیکال‌های آزاد و ROS در بافت ملتهب می‌تواند سلول‌های ایمنی مختلفی (۳۸) مانند نوتروفیل‌ها را به محل التهاب جذب کند که نه تنها سیتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF- $\alpha$  را تولید کرده (۳۹)، بلکه با مصرف زیاد اکسیژن موجب بیان بیشتر آنزیم‌های اکسیداتیو مثل MPO و ROS می‌شود. MPO در گرانول‌های نوتروفیل قرار دارد و سطح و فعالیت آن به عنوان یک مارکر اینفیلتراسیون نوتروفیل به محل التهاب در مدل بیماریهای التهابی روده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۰). نتایج این مطالعه در مورد فعالیت MPO بعد از تجویز کپسول‌های حاوی ریبامپید نشان داد که این

اثرات مفید این داروها بدون افزایش دوز داروها در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است.

### نتیجه گیری

استفاده از کپسول‌های کیتوزان به‌مراه ریبامپید در درمان کولیت مؤثر می‌باشد و با توجه به اثرات ترمیمی و بهبود دهنده‌گی مخاط می‌تواند به عنوان یک داروی مؤثر با خاصیت ضد التهابی به‌مراه داروهای فعلی در فرایند درمانی بیماریهای التهاب روده در نظر گرفته شود. هرچند که برای تایید این مهم به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

### تقدیر و تشکر

با تشکر از حمایت‌های صورت گرفته برای انجام این طرح تحقیقاتی از طرف معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان.

ترکیب به خوبی قادر به کاهش فعالیت این آنزیم در بافت کولون می‌باشد. هرچند که تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های ریبامپید+ کیتوزان و محلول ریبامپید مشاهده نشد. عدم تفاوت معنی‌دار ممکن است بعلت دوز بکار رفته باشد (۴۱ و ۱۱). بیان واسطه التهابی  $TNF-\alpha$  در التهاب روده افزایش می‌یابد (۴۲) که هم‌روند بیماری را بدتر کرده و هم موجب تحریک فعالیت دیگر سیتوکاین‌های التهابی می‌شود (۴۲).  $TNF-\alpha$  نقش مهمی در آپوپتوز سلول‌های روده دارد (۴۳)، بنابراین مهار این سیتوکاین می‌تواند موجب جلوگیری از افزایش دیگر سایتوکاین‌های التهابی و مضر شود (۴۴). درمان کولیت اولسراتیو در موش‌های صحرایی با کپسول کیتوزان حامل داروی ریبامپید کاهش قابل توجه سطح  $TNF-\alpha$  را در مقایسه با محلول ریبامپید و گروه کنترل نشان داد. از اینرو نتایج این مطالعه تایید کننده استراتژی استفاده از حاملها و افزایش دهنده‌های جذب برای داروهایی با میزان جذب یا حلالیت پایین است (۳۳) که بعنوان راه حلی مناسب برای سود بردن از

### References

1. Maines LW, Fitzpatrick LR, French KJ, Zhuang Y, Xia Z, Keller SN et al. Suppression of ulcerative colitis in mice by orally-available inhibitors of sphingosine kinase. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 997-1012.
2. Xie F, Blackhouse G, Assasi N, Gaebel K, Robertson D and Goeree R. Cost-utility analysis of infliximab and adalimumab for refractory ulcerative colitis. *Cost Eff Resour Alloc* 2009; 7- 20
3. Triantafyllidis J, Merikas E and Georgopoulos F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des Devel Ther* 2011; 5: 185-210
4. Cuadrado E, Alonso M, Dolores-de-Juan M, Echaniz P, and Ignacio-Arenas J. Regulatory T cells in patients with inflammatory bowel diseases treated with adacolumn granulocytapheresis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1521-7.
5. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. *Eur J Pharmacol* 1987; 142: 23-29 .
6. Kishimoto S, Haruma K, Tari A, Sakurai K, Nakano M, Nakagawa Y. Rebamipide, an antiulcer drug, prevents DSS-induced colitis formation in rats. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1608-1616.

7. Makiyama K, Takeshima F, Kawasaki H, Zea-Iriarte WL. Anti-inflammatory effect of rebamipide enema on proctitis type ulcerative colitis: a novel therapeutic alternative. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1838–1839.
8. Miyata M, Kasugai K, Ishikawa T, Kakumu S, Onishi M, Mori T. Rebamipide enemas-new effective treatment for patients with corticosteroid dependent or resistant ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2005; 50 Suppl 1: 119-123.
9. Ohashi Y, Aihara E, Takasuka H, Takahashi K, Takeuchi K. Antral ulcers induced by alendronate, a nitrogen-containing biphophonate, in rat stomachs - prophylactic effect of rebamipide. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 85-93.
10. Kohashi, M., Ishimaru, N., Arakaki, R., and Hayashi, Y. Effective treatment with oral administration of rebamipide in a mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 389–400.
11. Diao L, Mei Q, Xu JM, Liu XC, Hu J, Jin J and et al. Rebamipide suppresses diclofenac-induced intestinal permeability via mitochondrial protection in mice. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1059-66.
12. Makiyama K, Takeshima F, Hamamoto T. Efficacy of rebamipide enemas in active distal ulcerative colitis and proctitis: a prospective study report. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2323-2329.
13. Tung NT, Park CW, Oh TO, Kim JY, Ha JM, Rhee YS and et al. Formulation of solid dispersion of rebamipide evaluated in a rat model for improved bioavailability and efficacy. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63:1539-47.
14. Shi Y, Zou M, An Y, Ji Z, Gao P, Cheng G. A potent preparation method combining neutralization with microfluidization for rebamipide nanosuspensions and its in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 2013; 39: 996-1004.
15. Ghosh I, Bose S, Vippagunta R, Harmon F. Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. *Int J Pharm* 2011; 409: 260-8.
16. Tozaki H, Komoike J, Tada C, Maruyama T, Terabe A, Suzuki T, Yamamoto A, Muranishi S. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1016–1021.
17. Tozaki H, Fujita T, Odoriba T, Terabe A, Suzuki T, Tanaka C, Okabe S, Muranishi S, Yamamoto A. Colon-specific delivery of R68070, a new thromboxane synthase inhibitor, using chitosan capsules: therapeutic effects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Life Sci* 1999; 64: 1155–1162.
18. Tozaki H, Fujita T, Odoriba T, Terabe A, Okabe S, Muranishi S, Yamamoto A. Validation of a pharmacokinetic model of colon-specific drug delivery and the therapeutic effects of chitosan capsules containing 5-aminosalicylic acid on 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis in rats. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1107–1112.
19. Tozaki H, Odoriba T, Okada N, Fujita T, Terabe A, Suzuki T, Okabe S, Muranishi S, Yamamoto A. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-

aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. *J Control Release* 2002; 82: 51–61.

20. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010; 62: 28–41.

21. Mascolo N, Izzo A, Autore G, Maiello F, Dicarolo G, Capsso F. Acetic acid-induced colitis in normal and essential fatty acid deficient rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 469- 475.

22. Dong WG, Liu SP, Yu BP, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2533-8.

23. Liu SP, Dong WG, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 2786-90.

24. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.

25. Moloudi R, Nabavizadeh F, Nahrevanian H, Hassanzadeh G. Effect of different doses of GLP-2 (Teduglutide) on acute esophageal lesion due to acid-pepsin perfusion in male rats. *Peptides* 2011; 32: 2086-90.

26. Moloudi MR, Hassanzadeh K, Rouhani S, Zandi F, Ahmadi A, Khalwatian P and et al. Effect of chloroformic extract of *Cichorium intybus* on liver function tests and serum level of TNF- $\alpha$  in obstructive cholestasis in rat. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2014; 19: 10-19.

27. Nabavizadeh F, Moloudi R, Dehpour AR, Nahrevanian H, Shahvaisy K and Salimi E. The Effects of Cholestasis and Cirrhosis on Gastric Acid and Pepsin Secretions in Rat: Involvement of Nitric Oxide. *Iran J Basic Med Sci* 2010;13:207-212.

28. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J and et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 311-322.

29. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G and et al. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001; 194: 1207-1218.

30. Huang J, Luo HS, Yang JX. Therapeutic effects of butyrate on nitric oxide abnormality in experimental ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9: 967-969.

31. Segui J, Gil F, Gironella M, et al. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005; 11: 872–882.

32. Nakamura M, Akiba Y, Matsui H, Tsuchimoto K, Ishii H. Rebamipide binds to iNOS-positive cells in acetic acid-treated but not in ethanol-treated rat gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18:S76-81.

33. Huang BB, Li GF, Luo JH, Duan L, Nobuaki K, Akira Y. Permeabilities of rebamipide via rat intestinal membranes and its colon specific delivery using chitosan capsule as a carrier. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4928-37.
34. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Maincent P, Kawashima Y, Lehr C.M. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 775-81.
35. Kruidenier L, Verspaget HW. Review Article: Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:1997-2015.
36. Korenaga D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M et al. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Surg Res* 2002; 102: 144-9.
37. Simmonds NJ, Rampton DS. Inflammatory bowel disease-a radical view. *Gut* 1993; 34: 865-8.
38. Hosseini-Tabatabaei A, Esmaily H, Rahimian R, Khorasani R, Baeeri M, Barazesh-Morgani A, et al. Benefits of nicorandil using an immunologic murine model of experimental colitis. *Cent Eur J-Biol* 2009; 4: 74-85.
39. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-9.
40. Grulke S, Franck T, Gangl M, Péters F, Salciccia A, Deby-Dupont G, et al, Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease. *Can. J. Vet. Res* 2008; 72: 37-42.
41. Guo Y, Wang Y, Xu L. Enhanced bioavailability of rebamipide nanocrystal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 10: 1-7
42. Shen C, De Hertogh G, Bullens D.M, Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P, et al. Remission inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization?. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 308-16.
43. Ebrahimi F, Esmaily H, Baeeri M, Mohammadirad A, Fallah S, Abdollahi M. Molecular evidences on the benefits of N-acetylcysteine in experimental colitis. *Cent Eur J Biol* 2008; 3: 135-42.
44. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Method* 2004; 50: 81-92.