مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۳۷/هفته‌ی اول شهریور ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۹

اثرات ال–کارنیتین بر روی پارامترهای التهابی و آنژیوژنز در مدل التهابی Air Pouch در موش صحرایی

طاهره اعتراف اسکوئی[۱]، حامد قاسم اوغلی[۲]، مسلم نجفی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: این مطالعه، با هدف بررسی اثرات داروی ال–کارنیتین (L-Carnitine یا L-car) بر روی پارامترهای التهابی و آنژیوژنز در مدل التهابی Air pouch انجام شد.

روش‌ها: در ناحیه‌ی پشتی موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar، پس از بیهوشی به ترتیب ۲۰ و ۱۰ میلی‌لیتر هوای استریل در روزهای ۱ و ۳ به صورت زیر پوستی تزریق شد. در روز ۶ کاراژنین به داخل Pouch تزریق گردید. نرمال‌سالین به عنوان شاهد و L-car با دزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم به ازای هر موش، همزمان با تزریق کاراژنین و همچنین، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آن به داخل Pouch تزریق شد. بعد از ۷۲ ساعت، مایع داخل Pouch برای تعیین حجم اگزودا و شمارش لکوسیتی و اندازه‌گیری غلظت Vascular endothelial growth factor (VEGF) و Interleukin-1 beta (IL-1ß) جمع‌آوری و بافت گرانولومای تشکیل شده از بدن حیوان جدا و توزین گردید. برای تعیین آنژیوژنز در بافت گرانولوما، از روش سنجش غلظت هموگلوبین استفاده شد.

یافته‌ها: L-car با تمام دزهای به کار رفته، تجمع لکوسیتی را در اگزودا کاهش داد ($P < ۰/۰۰۱$)، اما وزن بافت گرانولوما فقط با دز ۲۰۰۰ میکروگرم کم شد ($P < ۰/۰۰۱$). حجم اگزودا نیز با تمام دزها و سطح IL-1ß با دزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم دارو به صورت معنی‌داری کاهش یافتند. L-car، نه تنها اثرات مهاری بر روی VEGF نداشت، بلکه دز ۱۰۰۰ میکروگرم آن سطح VEGF را افزایش داد ($P < ۰/۰۱۰$).

نتیجه‌گیری: L-car، اثرات ضد التهابی دارد، اما با دزهای به کار رفته، فاقد اثر ضد آنژیوژنز در این مدل بود. احتمال می‌رود اثرات ضد التهابی L-car با اثر مهاری آن بر روی IL-1ß مرتبط باشد.

واژگان کلیدی: ال–کارنیتین، التهاب، آنژیوژنز، عامل رشد اندوتلیال عروقی

ارجاع: اعتراف اسکوئی طاهره، قاسم اوغلی حامد، نجفی مسلم. **اثرات ال–کارنیتین بر روی پارامترهای التهابی و آنژیوژنز در مدل التهابی Air Pouch در موش صحرایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۷): ۸۱۳–۸۰۷

مقدمه

کارنیتین (بتا– هیدروکسی– گاما– ان– تری متیل آمینوبوتیریک اسید) یک آمینواسید تری‌متیله است که از نظر ساختاری به طور تقریبی شبیه کولین می‌باشد و از اسیدهای آمینه‌ی لیزین و متیونین سنتز می‌شود. این ماده، عامل مشترک ضروری برای تبدیل اسیدهای چرب طولانی زنجیر، به آسیل کارنیتین و انتقال آن‌ها به ماتریکس میتوکندری‌ها جهت بتا اکسیداسیون و تولید انرژی می‌باشد. بر خلاف گیاهان، کارنیتین به مقدار قابل توجهی در منابع غذایی با منشأ حیوانی وجود دارد. ال–کارنیتین که استرئوایزومر با فعالیت بیولوژیک کارنیتین است، با روش‌های انتقال فعال و غیر فعال از دستگاه گوارش جذب می‌گردد (۱). کاهش مقادیر فیزیولوژیک کارنیتین در سرم یا بافت در انسان در انواع اختلالات ایمنی مانند سندرم Sepsis، اسکلروزیس سیستمیک، عفونت Human immunodeficiency virus (HIV)، سندرم خستگی مزمن، همودیالیز، سوختگی، تروما و ... مشاهده می‌شود (۲).

نتایج یک مطالعه در بیماران همودیالیزی نشان داد که مصرف داروی ال–کارنیتین (L-car)، می‌تواند کمبود آن را برطرف نماید و با کاهش عوامل التهابی سرم نظیر عامل نکروز تومور آلفا (TNF-α یا Tumor necrosis factor-alpha)، Interleukin-1 beta (IL-1ß)، پروتئین واکنشگر C (C-reactive protein یا CRP) و

۱- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲- داروساز، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مسلم نجفی
Email: najafim@tbzmed.ac.ir

Interleukin-6 (IL-6)، سبب کاهش التهاب و عوارض ناشی از کمبود کارنیتین گردد (۳). در کارآزمایی بالینی دیگری، تجویز روزانه ۱۰۰۰ میلی‌گرم L-car به مدت ۳ ماه، موجب کاهش آسیب‌های التهابی در افراد مبتلا به بیماری‌های عروق کرونر گردید و سطوح نشانگرهای التهابی مانند CRP، TNF-α و IL-6 توسط L-car کاهش یافت (۴). یافته‌های علمی در حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان داده‌اند که اختلالات و ضعف سیستم ایمنی ناشی از پیری در موش‌ها، مانند تضعیف عملکرد ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، با L-car خنثی می‌گردد (۲).

مطالعه‌ی Tastekin و همکاران نشان داد که تجویز L-car در مدل التهابی آرتریت در موش‌ها، قادر است با ایجاد اثرات آنتی‌اکسیدانی، موجب پیش‌گیری از آسیب‌های استرس اکسیداتیو گردد (۵). در مطالعه‌ی دیگری، تجویز خوراکی ۳۰ روزه‌ی L-car در التهاب ناشی از کاراژنین در موش‌های صحرایی مسن (۲۴ ماهه)، موجب برگشت دادن تغییرات عملکردی سلول‌های التهابی در آن‌ها گردید (۶).

التهاب، فرایندی پویا و پیچیده است که در پاسخ به آسیب بافتی یا عفونت آغاز می‌شود. شروع این فرایند، منجر به فعال شدن بافت‌های موضعی و رها شدن مواد واسطه‌ای از آن‌ها می‌گردد که در نهایت، موجب گشادی و افزایش نفوذپذیری عروق، تورم و فعالیت فیبرهای درد می‌شود (۷). روش اصلی که توسط آن سیستم ذاتی ایمنی با عفونت‌ها و آسیب‌های بافتی مقابله می‌کند، تحریک التهاب حاد است که می‌تواند در عرض دقایق تا ساعت‌ها ایجاد شود و برای روزها ادامه یابد. سیتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر TNF-α، IL-1 و IL-6، نقش مهمی در فعال کردن سلول‌های التهابی بازی می‌کنند (۸). اگر عفونت حذف نشود یا آسیب بافتی طولانی گردد، بعد از التهاب حاد، التهاب مزمن ادامه می‌یابد (۹). مکان‌های التهاب مزمن، اغلب تحت بازسازی بافتی همراه با آنژیوژنز و فیبروز قرار می‌گیرند (۱۰). مهم‌ترین محرک‌های فیزیولوژیک آنژیوژنز، ایسکمی بافتی، هیپوکسی و التهاب هستند و علاوه بر آن، برخی از عوامل اختصاصی نظیر عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF)، سیتوکاین‌های التهابی، مولکول‌های چسباننده و نیتریک اکساید (Nitric oxide یا NO) نیز رگ‌زایی را تحریک و یا مهار می‌کنند (۱۱).

اتیولوژی پیچیده‌ی بیماری‌های التهابی، منجر به گسترش مدل‌های متنوع التهاب حاد و مزمن شده است. از جمله‌ی این‌ها، مدل التهابی Air pouch است که تقلیدی از بیماری آرتریت روماتوئید می‌باشد و در آن با تزریق زیر پوستی هوای استریل در پشت موش، کیسه‌ای ایجاد می‌شود که محیط مناسبی برای مطالعه‌ی التهاب و پاسخ سلولی مربوط و نیز بررسی فعالیت ضد التهابی داروها فراهم می‌آورد (۱۲).

اگرچه داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (Nonsteroidal antiinflammatory drugs یا NSAIDs) و کورتیکو استروئیدها داروهای مؤثر جهت مقابله با التهاب هستند، اما به دلیل عوارض جانبی آن‌ها، تحقیق بر روی داروهای جدید با عوارض کمتر در اولویت می‌باشد. بر اساس جستجوهای انجام شده، گزارشی از اثرات داروی L-car بر روی پارامترهای التهابی و آنژیوژنز در مدل Air pouch موجود نبود؛ از این رو، مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی اثرات احتمالی ضد التهاب و ضد آنژیوژنز L-car در موش‌های صحرایی انجام شد.

روش‌ها

ایجاد مدل التهابی Air pouch: موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم با دسترسی آزاد به آب و غذا در شرایط استاندارد نگهداری و مطابق قوانین و دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها با دی‌اتیل اتر بیهوش شدند. سپس، موهای ناحیه‌ی پشتی حیوان تراشیده شد و ۲۰ میلی‌لیتر هوای استریل به صورت زیر پوستی تزریق گردید. ۳ روز بعد، دوباره ۱۰ میلی‌لیتر هوای استریل به ناحیه‌ی پیش‌گفته تزریق گردید. تزریق داخل Pouch کاراژنین به مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول ۲ درصد وزنی- حجمی در روز ۶ پس از اولین تزریق هوا صورت گرفت (۱۲).

گروه‌های مورد مطالعه: گروه شاهد کاراژنین: این گروه در روز ۶، بعد از ایجاد Pouch، کاراژنین را به صورت داخل Pouch دریافت کردند. به منظور بررسی اثر حامل، ۱ میلی‌لیتر نرمال‌سالین قبل از تزریق کاراژنین و نیز ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق آن به داخل Pouch تزریق شد.

گروه‌های دریافت کننده‌ی L-car: موش‌ها در روز ۶ بعد از ایجاد Pouch، بلافاصله قبل از تزریق کاراژنین و نیز ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق آن، دزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم از L-car برای هر موش در حجم ۱ میلی‌لیتر به صورت داخل Pouch دریافت کردند.

پارامترهای التهابی مورد بررسی

تعیین حجم اگزودا و شمارش تعداد لکوسیت‌ها و توزین بافت گرانولوما: ۳ روز بعد از تزریق کاراژنین، موش‌ها کشته شدند و ۳ میلی‌لیتر Phosphate buffered saline (PBS) با pH = ۷/۴ به داخل Pouch تزریق و به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی ماساژ داده شد و اگزودای التهابی خارج و حجم آن اندازه‌گیری گردید. سپس، مقداری از اگزودا به داخل لوله‌ی آزمایش حاوی

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ریخته شد و پس از اختلاط و رقیق‌سازی، شمارش تعداد لکوسیت‌ها با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) انجام گردید. بعد از جمع‌آوری کامل اگزودا، پوست بیرونی بریده شد و Pouch از نسوج اطراف و ماهیچه‌ی پشت حیوان جدا و بافت گرانولوما نیز توزین گردید.

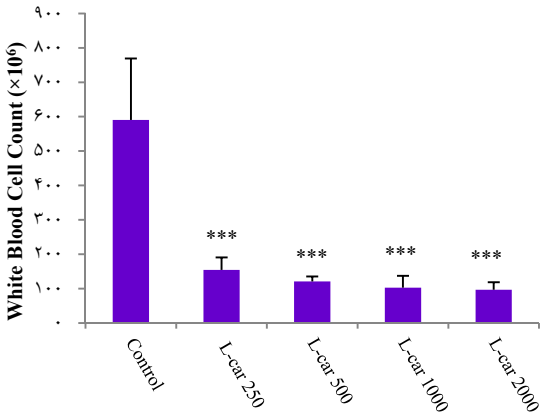
بررسی آنژیوژنز: آنژیوژنز کمی با استفاده از روش Ghosh و همکاران، با اندکی تغییر تعیین مقدار شد. بر اساس این روش، ابتدا بافت گرانولومای تشکیل شده در اطراف Pouch جدا شد و در محلول PBS شسته و خشک شد. سپس، بافت به قطعات ریز بریده شد و محلول درابکین اضافه گردید و ۵ دقیقه، با شتاب ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه در بستر یخ توسط هموژنایزر (Heidolph, Germany) هموژنیزه شد. بافت هموژن ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با شتاب Relative centrifugal field (rcf) ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ (Eppendorf 5810R, Germany) گردید. میزان هموگلوبین مایع رویی صاف شده با استفاده از فیلتر میلی‌پور با به کارگیری منحنی استاندارد کیت هموگلوبین و دستگاه اسپکتروفوتومتر Ultraviolet (UV) (Shimadzu -1800, Japan) در طول موج ۵۴۶ نانومتر به عنوان شاخص آنژیوژنز تعیین مقدار شد (۱۳).

اندازه‌گیری میزان VEGF و IL-1ß موجود در اگزودا: ۷۲ ساعت بعد از القای التهاب، اگزودا جمع‌آوری شد و ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی بدون سلول جهت تعیین مقدار VEGF و IL-1ß مطابق دستورالعمل کیت‌های اختصاصی آن‌ها در ۴۵۰ نانومتر استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین گزارش شده‌اند. مقایسه‌ی بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) و با آزمون آماری One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Least significant difference (LSD) صورت گرفت. تفاوت میانگین‌ها با سطح آماری $P < ۰/۰۵۰$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

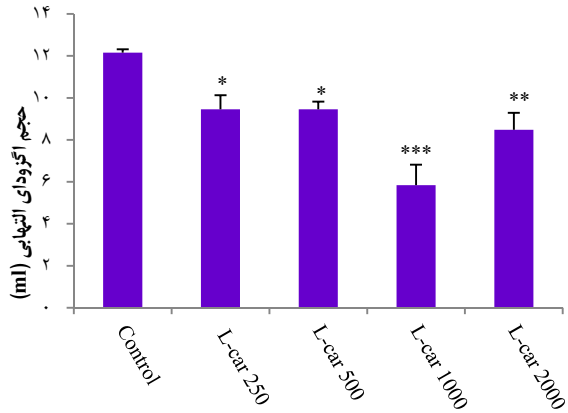
بررسی اثر L-car بر تجمع لکوسیتی: تعداد تام لکوسیت‌ها در گروه L-car با دز ۲۵۰ میکروگرم، ۳۶/۲۲ ± ۱۵۴/۴۰ میلیون، دز ۵۰۰ میکروگرم ۱۴/۵۰ ± ۱۲۷/۲۰ میلیون، دز ۱۰۰۰ میکروگرم ۳۴/۲۰ ± ۱۰۲/۹۰ میلیون و در دز ۲۰۰۰ میکروگرم ۲۲/۰۰ ± ۹۶/۸۰ میلیون شمارش گردید که همه‌ی گروه‌ها با گروه شاهد (۱۷۸/۹ ± ۵۹۰/۲) تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی اثر تزریق داخل Pouch ال-کارنیتین بر تجمع لکوسیتی در اگزودای التهابی در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین می‌باشند ($P < ۰/۰۰۱$*): وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد کاراژنین).**

L-car: L-carnitine

بررسی اثر L-car بر حجم اگزودا و وزن بافت گرانولوما: نتایج نشان داد که ۷۲ ساعت بعد از القای التهاب در گروه شاهد، ۰/۲۰ ± ۱۲/۲۰ میلی‌لیتر اگزودا به داخل Pouch ترشح پیدا کرده بود که این حجم در گروه‌های L-car با دز ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم به ترتیب ۰/۷۰ ± ۹/۵۰ و ۰/۴۰ ± ۱۰/۰۰ میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد ($P < ۰/۰۵۰$). دز ۱۰۰۰ میکروگرم دارو حجم اگزودا را به ۱/۰۰ ± ۵/۹۰ میلی‌لیتر ($P < ۰/۰۰۱$) و دز ۲۰۰۰ میکروگرم، آن را به ۰/۸۰ ± ۸/۵۰ میلی‌لیتر ($P < ۰/۰۱۰$) کاهش داد (شکل ۲).



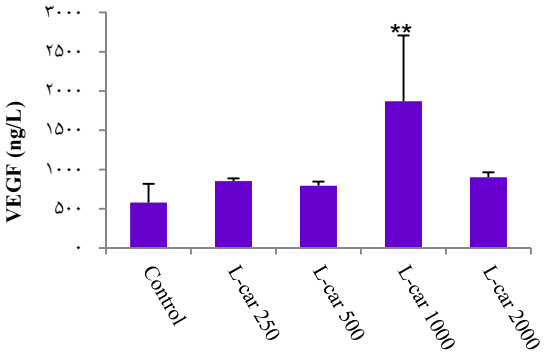
شکل ۲. بررسی اثر تزریق داخل Pouch ال-کارنیتین بر حجم اگزودای التهابی در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین می‌باشند ($P < ۰/۰۵۰$*، $P < ۰/۰۱۰$، $P < ۰/۰۰۱$***): وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد کاراژنین).**

L-car: L-carnitine

همچنین، داروی L-car با دزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم، نتوانست وزن بافت گرانولوما را نسبت به گروه شاهد (۰/۲۰ ± ۵/۶۰ گرم) تغییر آماری معنی‌داری بدهد، اما دز ۲۰۰۰ میکروگرم، بافت گرانولوما را ۳۵/۷ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش داد (P < ۰/۰۰۱).

بررسی اثر L-car بر آنژیوژنز بافت گرانولوما: هیچ یک از دزهای L-car نتوانست آنژیوژنز را تحت تأثیر قرار دهد؛ به طوری که میزان هموگلوبین بافت گرانولوماتوز با دزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم L-car به ترتیب ۱۱۹/۰ ± ۸۳۲/۹، ۱۰۸/۳ ± ۱۲۱۳/۸، ۲۴۹/۹ ± ۶۶۲/۹ و ۱۹۳/۴ ± ۱۰۴۸/۴ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم بافت به دست آمد که نسبت به گروه شاهد (۱۳۹/۸ ± ۹۳۷/۰ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم بافت) تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

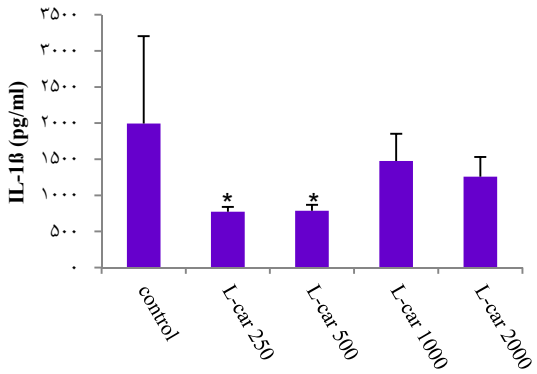
بررسی اثر L-car بر میزان VEGF اگزودا: به جز دز ۱۰۰۰ میکروگرم L-car، سایر دزهای به کار رفته نتوانست غلظت VEGF را نسبت به گروه شاهد (۲۳۹/۵۲ ± ۵۷۹/۲۹ نانوگرم/لیتر) تغییر معنی‌داری دهد. میزان VEGF اگزودا با دز ۱۰۰۰ میکروگرم L-car به میزان ۸۳۷/۲۴ ± ۱۸۶۹/۱۶ نانوگرم/لیتر تعیین شد که نسبت به گروه شاهد بیشتر شده بود (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی اثر تزریق داخل Pouch ال-کارنیتین بر میزان عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF) اگزودا در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین می‌باشند (P < ۰/۰۱۰): وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد کاراژنین).**

L-car: L-carnitine

بررسی اثر L-car بر میزان IL-1ß اگزودا: همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، غلظت IL-1ß اگزودای التهابی با دزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم L-car به ترتیب ۵۹/۲ درصد (P < ۰/۰۵۰)، ۴۰/۲۷ درصد (P < ۰/۰۵۰)، ۲۶/۹۱ درصد و ۳۶/۸۸ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد.



شکل ۴. بررسی اثر تزریق داخل Pouch ال-کارنیتین بر میزان Interleukin-1 beta (IL-1ß) اگزودا در موش صحرایی نر. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین می‌باشند (P* < ۰/۰۵۰): وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد کاراژنین).

L-car: L-carnitine

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، اثرات L-car بر روی پارامترهای التهابی و آنژیوژنز در مدل Air pouch مورد بررسی قرار گرفت. تجمع لکوسیتی با کلیه‌ی دزهای مورد استفاده‌ی L-car کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. همسو با نتایج این مطالعه، Aldemir و همکاران، اثرات L-car روی تغییرات تعداد لکوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را در بیماران نیازمند جراحی بای‌پس قلبی بررسی و گزارش نمودند که L-car لکوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را در این بیماران کاهش می‌دهد (۱۴). در مطالعه‌ی Izgut-Uysal و همکاران، تأثیر تجویز ۳۰ روزه‌ی L-car در التهاب ناشی از کاراژنین در موش‌های صحرایی مسن (۲۴ ماهه) با موش‌های جوان (۲ ماهه) بررسی و مقایسه شد. نتایج نشان داد که L-car موجب افزایش تعداد سلول‌های جمع شده در محل التهاب در هر دو گروه می‌گردد (۶). به علت تفاوت‌های متعدد در روش کار نظیر نحوه‌ی تجویز، دز و مدت زمان مصرف L-car، وجود اختلاف در یافته‌های مطالعه‌ی پیش‌گفته با نتایج مطالعه‌ی حاضر دور از انتظار نیست.

فراخوانی لکوسیت‌ها فرایندی چند مرحله‌ای متشکل از اتصال ضعیف و حرکت روی اندوتلیوم به واسطه‌ی سلکتین‌ها، اتصال محکم به اندوتلیوم به واسطه‌ی اینتگرین‌ها و مهاجرت از طریق فضاهای بین اندوتلیال می‌باشد (۱۵). TNF-α و IL-1، از جمله سیتوکاین‌های پیش‌التهابی هستند که نقش مهمی را در فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال از طریق افزایش بیان مولکول‌های چسبنده دارند (۱۶). در مدل شوک اندوتوکسین موشی، تزریق L-car به موش‌هایی

که با لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide یا LPS) دچار التهاب شده بودند، موجب کاهش سطح سرمی TNF-α گردید (۱۷). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که L-car با دزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم باعث کاهش غلظت IL-1ß می‌شود. احتمال می‌رود اثرات مهاری L-car بر کاهش فراخوانی لکوسیت‌ها به علت کاهش IL-1ß باشد.

در التهاب ناشی از کاراژنین، نفوذپذیری عروق بر اثر رهاسازی مدیاتورهایی چون هیستامین، سروتونین، ایکوزانوئیدها و NO افزایش می‌یابد و در نتیجه، اگزودای التهابی شکل می‌گیرد (۱۸).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که L-car با تمام دزهای مورد استفاده، حجم اگزودا را کاهش می‌دهد، اما در مطالعه‌ی Izgut-Uysal و همکاران، تأثیر تجویز خوراکی یک ماهه‌ی L-car در التهاب ناشی از کاراژنین در موش‌های مسن (۲۴ ماهه) و جوان (۲ ماهه) نشان داد که حجم مایع اگزودا در محل التهاب در گروه‌های شاهد و تحت درمان با L-car تفاوتی نداشت (۶). علاوه بر تفاوت‌های تکنیکی مانند نحوه‌ی تجویز، دز و مدت زمان دریافت L-car، کوتاه بودن زمان جمع‌آوری اگزودا (۴۸ ساعت در مقابل ۷۲ ساعت) نیز می‌تواند در علت تفاوت یافته‌های مطالعه‌ی پیش‌گفته با نتایج مطالعه‌ی حاضر مؤثر باشد.

مطالعات متعدد نشان داده است که NO نقش مهمی در التهاب ایجاد شده به وسیله‌ی کاراژنین دارد (۱۹). Bueno و همکاران، عملکرد اندوتلیوم موش را بعد از ۸ هفته درمان با L-car (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که L-car، مشارکت NO را در اندوتلیوم افزایش و میزان گونه‌های فعال اکسیژن را به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی دارو کاهش می‌دهد (۲۰). احتمال می‌رود اثرات کاهشی L-car بر اگزودای التهابی در این مطالعه نیز به تولید NO مرتبط باشد؛ انجام آزمایش‌های تکمیلی در آینده، می‌تواند این فرضیه را تأیید یا رد نماید.

شکل‌گیری بافت گرانولوما، یکی از مشخصات التهاب مزمن است و تجمع فیبروبلاست‌ها و ماکروفاژها، سنتز کلاژن و آنژیوژنز، از ویژگی‌های مهم بافت گرانولوما می‌باشند (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر، وزن بافت گرانولومای تشکیل شده، فقط با بالاترین دز به کار رفته‌ی L-car (۲۰۰۰ میکروگرم) کاهش یافت. مشابه این نتایج، اثرات پروپیونیل ال-کارنیتین (Propionyl-L-Carnitine یا PLC) در مدل‌های مختلف التهابی موش بررسی و معلوم شد که این مشتق کارنیتین، از تولید بافت گرانولومای ناشی از روغن کتان جلوگیری می‌کند، اما در مدل Cotton pellet و با ماده‌ی التهاب‌زای کاراژنین بی‌تأثیر بوده است (۲۲).

در شرایط In vitro سیتوکاین‌های مشتق شده از ماکروفاژها شامل IL-1 و TNF-α در تشکیل بافت گرانولوما از اهمیت به‌سزایی برخوردارند (۲۳). همچنین، NO تولید شده توسط ماکروفاژها نیز در شکل‌گیری بافت گرانولوما تأثیر دارد (۲۴). Koeck و Kremser، اثبات کردند که L-car باعث کاهش فعالیت نیتریک اکساید سنتاز در فیبروبلاست می‌شود (۲۵).

در شرایط التهابی مزمن، آنژیوژنز مهاجرت سلول‌های التهابی به محل التهاب و فراهمی مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز را برای بافت گرانولوما امکان‌پذیر می‌کند. بنابراین، تداوم التهاب مزمن به آنژیوژنز بستگی دارد و مهار آنژیوژنز می‌تواند از التهاب جلوگیری کند (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر، L-car با هیچ یک از دزهای مورد استفاده، آنژیوژنز را کاهش نداد. VEGF، یکی از مهم‌ترین عوامل تحریک کننده‌ی آنژیوژنز است که در مهاجرت، تکثیر، تجزیه‌ی ماتریکس سلول‌های اندوتلیال و تشکیل شبکه‌های عروقی نقش دارد. مهار VEGF، می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی برای کاهش آنژیوژنز باشد (۲۶). اندازه‌گیری سطح VEGF در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که L-car با دز ۱۰۰۰ میکروگرم، موجب افزایش معنی‌دار سطح VEGF شده است. در همین راستا و مطابق با نتایج مطالعه‌ی حاضر، گزارش‌هایی مبنی بر افزایش بیان VEGF توسط L-car نیز منتشر شده است (۲۸-۲۷).

در مجموع، با توجه به نتایج می‌توان اظهار داشت که L-car از فعالیت ضد التهابی خوبی برخوردار است، اما فاقد اثر ضد آنژیوژنز در این مدل و با دزهای به کار رفته می‌باشد. احتمال می‌رود اثرات ضد التهابی مشاهده شده با اثر مهاری L-car بر روی IL-1ß مرتبط باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از نتایج پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی دکتری عمومی داروسازی مصوب دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به شماره‌ی ۳۷۹۱ می‌باشد. نویسندگان مقاله، از معاونت محترم پژوهشی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای حمایت مالی از اجرای آن (طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۵۱۱ مصوب کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی این دانشگاه) صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. Nutr Metab (Lond) 2010; 7: 30.
2. Famularo G, De Simone C, Trinchieri V, Mosca L. Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation.

Ann N Y Acad Sci 2004; 1033: 132-8.
3. Shakeri A, Tabibi H, Hedayati M. Effects of L-carnitine supplement on serum inflammatory cytokines, C-reactive protein, lipoprotein (a), and oxidative stress in hemodialysis patients with Lp (a) hyperlipoproteinemia. Hemodial Int 2010; 14(4): 498-504.
4. Lee BJ, Lin JS, Lin YC, Lin PT. Antiinflammatory effects of L-carnitine supplementation (1000 mg/d) in coronary artery disease patients. Nutrition 2015; 31(3): 475-9.
5. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, et al. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. Pharmacol Res 2007; 56(4): 303-10.
6. Izgut-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. Gerontology 2003; 49(5): 287-92.
7. Bishop-Bailey D, Bystrom J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. Pharmacol Ther 2009; 124(2): 141-50.
8. Khan FA, Khan MF. Inflammation and acute phase response. Int J Appl Biol Pharm 2017; 1(2): 312-21.
9. Sharma RA, Dalgleish AG, Steward WP, O'Byrne KJ. Angiogenesis and the immune response as targets for the prevention and treatment of colorectal cancer (review). Oncol Rep 2003; 10(5): 1625-31.
10. Koch AE. Angiogenesis: Implications for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1998; 41(6): 951-62.
11. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. Circulation 2003; 108(21): 2613-8.
12. Martin SW, Stevens AJ, Brennan BS, Davies D, Rowland M, Houston JB. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan. J Pharmacol Toxicol Methods 1994; 32(3): 139-47.
13. Ghosh AK, Hirasawa N, Niki H, Ohuchi K. Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenin-induced granulation tissue in rats. J Pharmacol Exp Ther 2000; 295(2): 802-9.
14. Aldemir M, Pektas MB, Parlar AI, Akci O, Emren SV, Tecer E, et al. L-Carnitine Supplementation Reduces Short-Term Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. Int Surg 2015; 100(7-8): 1160-8.
15. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2007; p. 345-55.
16. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.
17. Ruggiero V, D'Urso CM, Albertoni C, Campo S, Foresta P, Martelli EA. LPS-induced serum TNF production and lethality in mice: effect of L-carnitine and some acyl-derivatives. Mediators Inflamm 1993; 2(7): S43-S50.
18. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: Winyard PG, Willoughby DA, editors. Inflammation protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 115-21.
19. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, et al. Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Br J Pharmacol 1996; 118(4): 829-38.
20. Bueno R, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero Cn, Gomez-Amores L, Vazquez CM, Herrera MD. L-carnitine and propionyl-L-carnitine improve endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Different participation of NO and COX-products. Life Sciences 2005; 77(17): 2082-97.
21. Sato K, Komatsu N, Higashi N, Imai Y, Irimura T. Granulation tissue formation by nonspecific inflammatory agent occurs independently of macrophage galactose-type C-type lectin-1. Clin Immunol 2005; 115(1): 47-50.
22. Amico-Roxas M, Caruso A, Cutuli VM, de BE, Leonardi G. Inhibitory effects of propionyl-L-carnitine on plasma extravasation induced by irritants in rodents. Drugs Exp Clin Res 1993; 19(5): 213-7.
23. Sato IY, Kobayashi K, Yamagata N, Shikama Y, Kasama T, Kasahara K, et al. Modulation of granuloma formation in vitro by endogenous mediators. Immunopharmacology 1991; 21(2): 73-82.
24. Iuvone T, Carnuccio R, Di Rosa M. Modulation of granuloma formation by endogenous nitric oxide. Eur J Pharmacol 1994; 265(1-2): 89-92.
25. Koeck T, Kremser K. L-Carnitine alters nitric oxide synthase activity in fibroblasts depending on the peroxisomal status. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35(2): 149-56.
26. Salehi E, Amjadi FS, Khazaei M. Angiogenesis in health and disease: Role of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Isfahan Med Sch 2011; 29(132): 312-26. [In Persian].
27. De Angelis B, Gentile P, Orlandi F, Bocchini I, Di Pasquali C, Agovino A, et al. Limb rescue: A new autologous-peripheral blood mononuclear cells technology in critical limb ischemia and chronic ulcers. Tissue Eng Part C Methods 2015; 21(5): 423-35.
28. Cipolla MJ, Nicoloff A, Rebello T, Amato A, Porter JM. Propionyl-L-carnitine dilates human subcutaneous arteries through an endothelium-dependent mechanism. J Vasc Surg 1999; 29(6): 1097-103.

Journal of Isfahan Medical School Received: 16.04.2017

Vol. 35, No. 437, 1st Week, September 2017 Accepted: 30.05.2017

Effects of L-Carnitine on Inflammatory Parameters and Angiogenesis in the Rat Air Pouch Model of Inflammation

Tahereh Eteraf-Oskouei[1], Hamed Ghasemoghli[2], Moslem Najafi[3]

Original Article

Abstract

Background: In this study, effects of L-carnitine on inflammatory parameters and angiogenesis were evaluated in the rat air pouch model of inflammation.

Methods: Male Wistar rats were anesthetized; 20 and 10 ml sterile air was injected subcutaneously on the back of rats at first and 3rd day. To induce inflammation, carrageenan 2% was injected intrapouch at 6th day. Saline as control and L-carnitine (250, 500, 1000 and 2000 µg/rat) were administrated intrapouch at the same time as the carrageenan injection, 24 and 48 hours after inflammation induction. After 72 hours, the pouches were opened and pouch fluids were collected to determine exudate volume, leukocyte counts, vascular endothelial growth factor (VEGF), and interleukin-1ß (IL-1ß) levels. The granulated tissue was dissected out and weighed. Angiogenesis in the granulation tissues was measured based on the hemoglobin concentration method.

Findings: All used doses of L-carnitine reduced the leukocyte accumulation in the pouch fluid ($P < 0.001$); however, granulation tissue weight was decreased only by dose of 2000 µg ($P < 0.001$). In addition, L-carnitine significantly reduced volume of exudate in all treatment groups. Moreover, the agent produced inhibitory effect on IL-1ß level by doses of 250 and 500 µg. L-carnitine not only did not show an inhibitory effect on VEGF concentration, but also 1000 µg of L-carnitine increased VEGF level as compared to the control group ($P < 0.010$).

Conclusion: Results of this study showed that the used doses of L-carnitine have anti-inflammatory effects without anti-angiogenesis activity in this model of inflammation. The anti-inflammatory effect of L-carnitine maybe related to its inhibitory effect on IL-1ß.

Keywords: L-carnitine, Inflammation, Angiogenesis, Vascular endothelial growth factor

Citation: Eteraf-Oskouei T, Ghasemoghli H, Najafi M. **Effects of L-Carnitine on Inflammatory Parameters and Angiogenesis in the Rat Air Pouch Model of Inflammation.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(436): 807-813.

1- Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2- Pharm D, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Corresponding Author: Moslem Najafi, Email: najafim@tbzmed.ac.ir