

مطالعه‌ی اثرات غلظت و زمان بر التهاب تجربی ناشی از کاراجینان (Carrageenan) در موش صحرایی

گودرز صادقی هاشجین^{۱*}، فرشته انصاری^۲، سیده مائده جعفری^۲، غلامرضا شمس^۳

۱- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۲- دانشجو، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۳- کارشناس، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.

چکیده

کاراجینان (Carrageenan) برای ایجاد التهاب تجربی در حیوانات آزمایشگاهی استفاده شده است. این مطالعه به منظور یافتن مناسب‌ترین مقدار این ماده در موش صحرایی برای ایجاد التهاب موضعی طراحی و اجرا گردید. در این مطالعه، از اندام‌های ۸ عدد موش صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم جمعاً ۳۲ اندام به کار گرفته شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول‌های ۱، ۲ یا ۴ میلی‌گرم کاراجینان در هر میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی در کف اندام حرکتی (دست یا پا) به صورت زیرجلدی تزریق شد. ضخامت اندام پیش از تزریق و ۰/۵، ۲، ۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق با کولیس اندازه‌گیری و ثبت گردید. در نتایج به دست آمده بیشترین تورم به دنبال تزریق هر سه غلظت کاراجینان، پس از ۲ ساعت حاصل شد و از ۶ ساعت پس از تزریق به بعد تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد وجود نداشت. در دقیقه ۱۲۰ پس از تزریق غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم کاراجینان به ترتیب ۱۸، ۱۸ و ۲۱ درصد بر ضخامت اندام افزوده شد. تنها در پایین‌ترین غلظت کاراجینان (۱ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر) التهاب ایجاد شده در ۳۰ دقیقه در مقایسه با ضخامت اندام پیش از تزریق دارو به سطح اختلاف آماری معنی‌داری رسید ($P < 0/05$). به نظر می‌رسد که استفاده از کاراجینان برای القای التهاب و مطالعه‌ی آن، صرفاً برای التهاب حاد و فوری (نیم ساعت پس از تجویز) و با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معتبر بوده و در کل می‌توان ادعا کرد که کاراجینان ماده مناسبی برای اینگونه مطالعات نمی‌باشد. **واژه‌های کلیدی:** کاراجینان، پلی‌جینان، موش صحرایی، التهاب

مقدمه

کاراجینان‌ها خانواده‌ای از پلی‌گالاکتان (پلیمر آنیونیک) سولفات‌ه خطی هستند که از گیاهان دریایی استخراج می‌شوند. از این مواد به عنوان افزودنی در صنایع غذایی استفاده می‌شود. مولکول بلند و انعطاف پذیر آن‌ها قابلیت ژل‌سازی، ضخامت بخشی و تثبیت کنندگی به کاراجینان‌ها بخشیده است (۱)، ۲ و ۳). در حرارت بالا و محیط اسیدی، کاراجینان به ماده‌ی دیگری به نام پولی‌جینان (polygeenan) تبدیل می‌شود که وزن مولکولی کمتری نسبت به ماده‌ی والد دارد و گفته می‌شود که می‌تواند باعث ایجاد زخم و سرطان در لوله‌ی گوارش شود (۴ و ۵). پلی‌جینان در کشت سلول‌های اپیتلیال روده‌ی انسان منجر به فعال شدن NF κ B و IL-8 می‌شود که آن‌ها نیز به نوبه‌ی خود منجر به تولید ماده‌ای به نام BCL10 می‌شوند. علاوه بر این، در دوزهای بالا، فعالیت تیمیدین کیناز که شاخص تکثیر سلولی و پروتئین‌های مخاطی است را

افزایش می‌دهد (۶ و ۷).

کاراجینان به صورت تجربی برای تولید التهاب موضعی در مدل‌های حیوانی به کار برده شده است (۸ و ۱۵). به دلیل وجود گزارش‌های متفاوت و نتایج مختلف، این مطالعه برای مقایسه چند پروتکل متفاوت به منظور یافتن مناسب‌ترین غلظت و مدت زمان لازم برای ایجاد التهاب و مطالعه آن انجام پذیرفت. با توجه به جثه و وزن مناسب، موش صحرایی به عنوان مدل حیوانی انتخاب شد.

مواد و روش کار

این تحقیق یک پژوهش تجربی با استفاده از مدل حیوانی موش صحرایی محسوب می‌گردد که در آن از هشت قطعه موش صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد در درجه‌ی حرارت اتاق و سیکل ۱۲ ساعته نور-تاریکی و با دسترسی آزاد به آب شهری و

غذای تجاری نگهداری شدند. علایم بالینی ظاهری حیوانات حاکی از عدم ابتلاء آن‌ها به بیماری خاصی بود.

گاما (۸) کاراجینان (ساخت شرکت Sigma-Aldrich آلمان به شماره کاتالوگ C۳۸۸۹ ساخته شده برای ایجاد التهاب) ماده‌ی اصلی استفاده شده در این تحقیق بود. به علت حلالیت پایین آن در آب و به منظور افزایش حلالیت، ابتدا کارجینان در سرم فیزیولوژی با حرارت ۸۰ درجه‌ی سانتیگراد حل شد. بلافاصله پیش از هر بار مصرف دارو و به منظور جلوگیری از رسوب احتمالی آن، محلول تهیه شده چندین بار تکان داده شد.

در تمام حیوانات هر ۴ اندام به صورت چرخشی برای غلظت‌های مختلف دارو یا سرم فیزیولوژی (به‌عنوان محلول شاهد) مورد استفاده قرار گرفتند. محلول‌های سرم فیزیولوژی یا کاراجینان با غلظت‌های ۱، ۲ یا ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت زیرجلدی با حجم ۰/۱ میلی‌لیتر در کف اندام تزریق شد. پیش از تزریق و همین‌طور در زمان‌های ۰/۵ ساعت، ۲ ساعت، ۶ ساعت و ۲۴ ساعت پس از آن، ضخامت اندام (فاصله بین سطوح کف و سطح خارجی) با استفاده از یک دستگاه ریزسنج (کولیس معمولی) اندازه‌گیری و ثبت گردید. داده‌های این پژوهش به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین (SEM) ارائه شدند. نتایج حاصله در هر گروه در زمان‌های پنج‌گانه‌ی آزمایش با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و سپس تک تک زمان‌ها با زمان کنترل (صفر) با استفاده از آزمون Bonferroni مقایسه گردیدند. هرگاه که P از ۰/۰۵ کوچک‌تر بود، اختلاف با زمان کنترل از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

همان‌گونه که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، در کلیه‌ی گروه‌ها (از جمله گروه شاهد) تورم موضعی ۳۰ دقیقه پس از تزریق ایجاد گردید که در زمان دو ساعت پس از تزریق و بعد از آن تقریباً به حالت عادی اولیه برگشت. براساس نتایج حاصله، بیشترین میزان تورم به دنبال تزریق هر سه

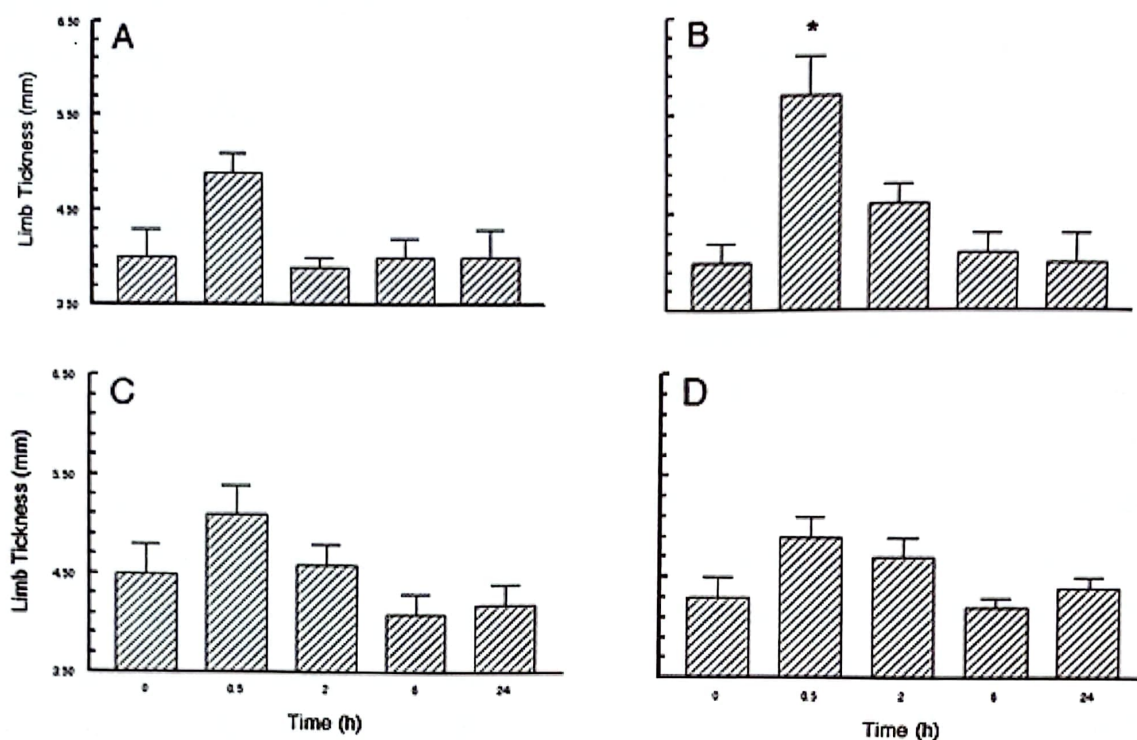
غلظت کاراجینان، ۲ ساعت پس از تزریق حاصل شد و از ۶ ساعت پس از تزریق به بعد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های درمانی و گروه شاهد وجود نداشت. در دقیقه‌ی ۱۲۰ پس از تزریق غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم کاراجینان به ترتیب ۱۸ درصد، ۱۸ درصد و ۲۱ درصد بر ضخامت اندام افزوده شد. تنها در پایین‌ترین غلظت مورد استفاده از کاراجینان (۱ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر) التهاب ایجاد شده در زمان ۳۰ دقیقه در مقایسه با زمان کنترل در همان گروه (ضخامت اندام پیش از تزریق دارو) به سطح اختلاف آماری معنی‌دار رسید ($P < 0.05$). در جدول شماره ۱ داده‌های حاصله به صورت مشروح ذکر گردیده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شد که تزریق کاراجینان در غلظت‌های مختلف در زیر جلد ناحیه‌ی کف اندام‌های حرکتی در موش صحرایی به درجات مختلفی از تورم و افزایش ضخامت منجر می‌گردد. این اثر تنها در پایین‌ترین غلظت مورد استفاده در طی پژوهش (۱ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر) و صرفاً ۳۰ دقیقه پس از تزریق آن از نظر آماری معنی‌دار بود. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که این ماده‌ی شیمیایی صرفاً برای ایجاد و مطالعه التهاب حاد در مراحل اولیه‌ی آن از نظر علمی و تجربی مناسب باشد.

کاراجینان به عنوان یک ماده‌ی مولد التهاب حاد موضعی در گونه‌های موش سوری و موش صحرایی و در موضع کف اندام‌های حرکتی (بیشتر اندام حرکتی خلفی) به کار می‌رود (۱۵ و ۱۶). استفاده از مدل موش صحرایی رایج‌تر است چرا که سطح مناسب‌تری را برای سنجش تغییرات التهابی فراهم می‌کند.

مکانیسم القای التهاب کاراجینان هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است؛ تعدادی از مکانیسم‌ها به قرار زیر دلیل بروز التهاب توسط آن معرفی شده‌اند: فعال‌سازی کمپلمان، ترشح هیستامین و سروتونین در اثر دگرانولاسیون مست سل‌ها، آزادسازی اکسیژن فعال یا اشکال مختلف نیتروژن



تصویر شماره ۱- تغییرات در ضخامت اندام موش صحرایی به دنبال تجویز ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی (A)، کاراجینان ۱ mg/mL (B)، کاراجینان ۲ mg/mL (C) یا کاراجینان ۴ mg/mL (D) در زمان های مختلف (پیش از تجویز، ۰/۵، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از تجویز). تنها در پایین ترین غلظت کاراجینان در زمان ۳۰ دقیقه پس از تجویز، افزایش ضخامت اندام در مقایسه با گروه کنترل مربوطه به سطح معنی داری آماری رسید ($P < 0.05$).

جدول شماره ۱- ضخامت اندام (فاصله ی بین کف و پشت) در موش صحرایی به دنبال تجویز ۰/۱ میلی لیتر از کاراجینان. داده ها به صورت میانگین و خطای معیار میانگین ضخامت برحسب میلی متر ارائه شده اند.

زمان صفر	۰/۵ ساعت	۲ ساعت	۶ ساعت	۲۴ ساعت	
۴/۰۲±۰/۷۶	۴/۹۲±۰/۵۳	۳/۹۳±۰/۲۱	۳/۹۶±۰/۳۹	۴/۰۲±۰/۷۳	گروه کنترل
۳/۹۵±۰/۶۲	۵/۶۶±۰/۹۵*	۴/۵۶±۰/۶۰	۴/۰۹±۰/۴۲	۳/۹۵±۰/۷۸	کاراجینان ۱/۰ درصد
۴/۵۰±۰/۸۸	۵/۰۸±۰/۷۳	۴/۵۵±۰/۵۱	۴/۰۷±۰/۴۳	۴/۱۶±۰/۶۰	کاراجینان ۲/۰ درصد
۴/۲۷±۰/۶۳	۴/۹۳±۰/۵۱	۴/۷۲±۰/۴۶	۴/۲۱±۰/۳۸	۴/۴±۰/۳۹	کاراجینان ۴/۰ درصد

* وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با زمان صفر در غلظت مربوطه

و برای القای ادم از محلول ۱ درصد آن در سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۰۵ میلی لیتر استفاده شده است (۱۶ و ۱۷).

در تحقیق حاضر ادم و التهاب ناشی از کاراجینان در غلظت هایی در بازه ی ۰/۴-۰/۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت و بر خلاف انتظار در غلظت های بالا تفاوت معنی داری در اثرات التهابی دیده نشد. برعکس، تنها در کمترین غلظت استفاده شده و آن هم صرفاً ۳۰ دقیقه پس از تزریق، میزان

در اثر فعالیت فاگوسیت ها، اثرات کینین ها، سیتوکین های پیش التهابی و پروستاگلاندین ها (۹، ۱۶ و ۱۹).

فاکتورهایی که در القای التهاب توسط کاراجینان بررسی می شود عبارتند از: هایپرآلجزی (hyperalgesia) یعنی حساسیت بیش از حد به تحریکات دردزای گرمایی و مکانیکی) و ادم. برای القای هایپرآلجزی از محلول ۳ درصد کاراجینان در سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۱۵ میلی لیتر (۱۴)

- of the toxicological effects of carrageenan and processed Eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Toxicol*; 2002; 2: 413-444.
- 5- Vinegar, R; Turuax, J.F; Selph, J.L; Johnston P.R; Venable A.L. and Mckenzie, k. k; Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Procs*; 1987; 46: 118-126.
- 6- Borthaku, A; Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*; 2007; 292: 829-838.
- 7- Calvert, R.J. and Satchithanandam, S; Effects of graded levels of high-molecular-weight carrageenan on colonic mucosal thymidine kinase activity. *Nutrition*; 1992; 4: 252-257.
- 8- Dubois, R.N; Abramson, S.B; Crofford, L; Gupta R.A; Simon, L.S; Van de Putte, L.B.A and Lipsky P.E; Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB*; 1998; 12:1063-1073.
- 9- Engster, M. and Abraham, R; Cecal response to different molecular weights and types of carrageenan in the guinea pig; *Toxicol. Appl. Pharmacol*; 1976; 38: 265-282.
- 10-Hirschelmann, R. and Bekemeier, H; Effects of catalase, peroxidase, superoxide dismutase, and scavengers of oxygen radicals in carrageenan edema and adjuvant arthritis of rats. *Experientia*; 1981; 37: 1313-1314.
- 11-Inamoto, Y; Okuno, F; Saito, K; Tanaka, Y; Watanabe, K; Morimoto, I; Effect of تورم در انتهای اندام حرکتی به سطح معنی‌دار آماری رسید ($P < 0.05$). این در حالی است که در تحقیقاتی که در مقادیر بالاتر صورت گرفته بود؛ پاسخ‌های التهابی در ۲ تا ۴ ساعت پس از تزریق به حداکثر خود می‌رسید (۸، ۱۰، ۱۴، ۱۶ و ۱۹). از آنجایی که رابطه مستقیمی بین افزایش دوز و پاسخ التهابی وجود نداشت و مدت پاسخ التهابی ایجاد شده نیز کوتاه بود، توصیه می‌شود قبل از انجام آزمایش اصلی در هر مورد، پاسخ التهابی ایجاد شده توسط کاراجینان اندازه‌گیری شود.
- در پایان، با توجه به مشاهدات ثبت شده در این تحقیق، به نظر می‌رسد که کاراجینان در القا و مطالعه‌ی تجربی التهاب شیمیایی در مدل حیوانی موش صحرایی از کارایی کمی برخوردار باشد. از همین رو، پیشنهاد می‌شود قدرت و مدت اثر آن با سایر مواد جایگزین (مانند فرمالدئید) مقایسه و در این‌گونه مطالعات حتی‌الامکان از روش مناسب‌تری استفاده گردد.
- منابع**
- 1- Cryer, B. and Feldman, M; Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used no steroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med*; 1998; 104 (5): 413-421.
- 2- Feldman, M. and McMahon, A.T; Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity?. *Ann. Intern. Med*; 2000; 132: 134-143.
- 3- Tobacman, J.K; Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ. Health Perspect*; 2001; 10: 109-983.
- 4- Cohen, S. and Nobuyuki, I; A critical review



- responsive gene encoding prostaglandin syntheses are regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; 1991; 88: 2692-2696.
- 19-Zimmermann, M; Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain*; 1983; 16: 109-110.
- hyperbaric oxygenation on macrophage function in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 1991; 179: 886-891.
- 12-Nagashisa, A; Kanai, Y; Suga, O; Taniguchi, K; Tsuchiya, M; Lowe, J. and Hess, H.J; Antiinflammatory and analgesic activity of a non-peptide substance P receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol*; 1992; 217: 191-195.
- 13-Nantel, F; Denis, D; Gordon, R; Northey, A; Cirino, M. and Metters, K.M; Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Europ. J. of Pharmacol*; 2001; 431: 265-268.
- 14-Raza, M; Dhariwal, M.A.H; Ageel, A.M. and Qureshi, S; Evaluation of the anti-inflammatory activity of sodium evaporate in rats and mice. *Gen. Pharmacol*; 1996; 27: 1395-1400.
- 15-Rovasio, R.A. and Monis, B; Lethal and teratogenic effects of lambda-carrageenan, a food additive on the development of the chick embryo. *Toxicol. Pathol*; 1980; 8: 14-19.
- 16-Winter, C.A; Riley, E.A. and Nuss, G.W; Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*; 1962; 111: 544-547.
- 17-Wolfe, M.M; Lichtenstein, R. and Singh, G; Gastrointestinal toxicity of no steroidal anti-inflammatory drugs. *N. Engl. J. Med*; 1999; 340: 1888-1899.
- 18- Xie, W.L; Chipman, J.L; Robertson, D.L. and Erikson, R.L; Expression of a mitogen-



Effects of concentration and time on the carageenan-induced inflammation in rats

Sadeghi-Hashjin, G.¹; Ansari, F.²; Jafari, S.M.²; Shams, G.³

1- Associate Professor, Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.

2- Student, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.

3- Expert, Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.

Summary

Carageenan is used to induce experimental inflammation in laboratory animals to study the pathophysiology and treatment of inflammatory conditions. Despite its routine use in research, different protocols have been suggested to administer carageenan in the laboratory animals. This work aimed at finding the most appropriate dosage regimen for carageenan to induce inflammation in the rat musculoskeletal system. In this study, 32 limbs of 8 male Wistar rats were injected subcutaneously at the palmar side of either hand or foot with 0.1 mL of either of the following concentrations of carageenan: 0, 1, 2, or 4 mg/mL. Thickness of the limb was measured by a micrometer apparatus before as well as 0.5, 2, 6 and 24 hours after the injection. The highest level of inflammation occurred 2 h after the injection of all concentrations. Six h after the injection, there was no difference between the control and treated groups. At 120 min after injection of 1, 2 and 4 mg/mL of carageenan, the increased width of the limb was 18%, 18% and 21%, respectively. The inflammation reached the level of significance only 30 min after injection of the lowest concentration used, i.e. 1 mg/mL ($P < 0.05$). The use of carageenan for induction and investigation of inflammatory responses may be useful solely in early acute inflammation (30 min post-injection) at lower concentrations (1 mg/mL). Based on our observations, carageenan should not be considered as a right choice for this sort of research work.

Keywords: Carageenan, Polygeenan, Rat, Inflammation