تأثیر سایمتیدین در فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل های خون موش صحرایی

داریوش پورمند*؛ دکتر ماندانا ستاری**

چکیده :

سابقه و هدف : *نوتروفیل ها مهم‌ترین گروه سلولی میلوئید هستند و اولین سد دفاعی بدن در برابر میکروارگانیسم ها را تشکیل می‌دهند. نابودی میکروارگانیسم‌های واردشده به بدن توسط نوتروفیل‌ها به وسیله عمل فاگوسیتوز این سلول‌ها انجام می‌شود. یکی از مراحل مهم فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها، انفجار تنفسی می‌باشد. داروهای مختلف از جمله سایمتیدین می‌توانند بر این فعالیت اثر داشته باشند . چگونگی این تأثیر به وسیله تحقیقات متعدد در دست بررسی است . مطالعات قبلی اثر هیستامین بر این فعالیت ها را مورد بررسی قرار داده است و تأثیر داروهای مؤثر بر گیرنده‌های هیستامینی نیز در دست بررسی می باشد . نتایج این تحقیق علاوه بر پیشبرد دانش موجود در مورد تأثیر این دارو درنوتروفیل‌ها می‌تواند زمینه ای برای مطالعه بیشتر در مورد کاربردهای این نوع دارو باشد .*

مواد و روش‌ها : *مطالعه به روش مورد شاهد و به‌صورت Blind بود. برای بررسی تأثیر این دارو در انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها از 17 موش صحرایی که در دو گروه 8 تایی تجربی و 9 تایی‌کنترل قرار گرفته بودند، استفاده شد و پس از تزریق دارو و پلاسبو به‌مدت یک هفته به گروه‌های تجربی و کنترل ، انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها توسط تست نیترو بلوتترازولیوم(NBT) اندازه‌گیری با آزمون من ویتنی با یکدیگرمقایسه گردید .*

یافته‌ها: *میانگین نتایج حاصله در تست NBT در دوگروه تجربی و شاهد با یکدیگر مقایسه شد که نتایج مقایسه انجام شده اختلاف معناداری را در فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها تحت تأثیر این دارو نشان داد. در گروه تجربی میانگین انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها به‌طـــور معنا داری از گروه کنترل بیشتر بود (P = 0/034) .*

بحث : *بر اساس یافته‌های این تحقیق سایمتیدین می‌تواند سبب تحریک فعـــالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌های خون موش صحرایی شود . بر اساس یافته‌های مطالعات قبلی این تأثیرات ممکن است به علت تأثیر این دارو درگیرنده های H2 هیستامینی سطح نوتروفیل‌ها باشد و مخالف تأثیرات هیستامین در این سلـولهاست. به منظور روشن شدن تأثیر کامل این دارو در فعالیت سلول های نوتروفیل انجام مطالعات بیشتر ضروری است .*

کلید واژه‌ها : *سایمتیدین ، نوتروفیل ، گیرنده H_2، انفجار تنفسی ،نیتروبلوتترازولیوم.*

---

* عضو هیأت علمی دانشکده پرستاری ، مامایی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

** عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران.

* **عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، سرخه لیژه، دانشکده پرستاری و مامایی، گروه علوم آزمایشگاهی، تلفن : 8 ـ 4228607

مقدمه:

انفجار تنفسی یکی از مراحل مهم فاگوسیتوز نوتروفیل‌هاست که اختلال در این مرحله می‌تواند باعث بـروز عفونت در بدن انسان شود. در جریان انفجار تنفسی توسط یک اکسیداز، اکسیژن به یک سوپراکسید(O_2^-) احـیا می‌شود. در شنت هگزومنوفسفات از NADP، $NADPH_2$ ساخته‌می‌شود. سوپراکسید خودبه‌خود به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن تنها (Singlets oxygen) تبدیل می‌شود **(1)**.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به‌عنوان یک مشتق مهم اکسیژن بررسی شده است و یکی از عوامل عمده انفجار تنفسی است؛ زیرا فعالیت قوی آن می‌تواند میکروارگانیسم‌ها را بکشد و یا بافـت‌های میزبان را مجروح کند **(2)**. در برخی مطالعات سایمتیدین یک اثر مهاری در تولـید – O_2 و H_2O_2 به‌وسیله نوتروفیل‌های انسانی داشته است و در توانایی تولید ROS[1] (انواع اکسیژن‌های فعـال شامل H_2O_2 و O_2^-) در روش سیستم گـــزانتین ـ گزانتین اکسیداز نقص ایجاد کرده است **(3** و **4)** .

مطالعاتی مغایر با این یافته‌ها نیز وجود دارد که سایمتیدین را در تولید ـ O_2 در نوتروفیل القا شده به‌وسیله FMLP بی‌تأثیر می‌داند **(5)** و در تحقیق دیگری ناتوانی سایمتیدین در جلوگیری از تولید O_2^- و H_2O_2 عنوان شده است **(6)**.

هیستامین به‌وسیله گیرنده‌های H_2 هیستامین سطح نوتروفیل‌ها،سبب سرکوب تولید یون سوپراکسیـــد (O_2^-) نوتروفیل انسان می‌شود **(7-9)** و تأثیرات مهاری هیستامین در انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها نیز شناخته شده است**(10)**. سایمتیدین و فاموتیدین از مهار فعالیت نوتروفیل ایجاد شده توسط هیستامین جلوگیری می‌کنند**(9– 7)**.

در مطالعات دیگری که بعد از عمل جراحی روی نوتروفیل‌ها انجام گرفته‌است، افزایش کمولومینه‌سانس نوترفیل‌ها به زیموزان و NFLMP در بیماران دیده شده که با عفونت همراه بوده است، ولی رانیتیدین کمولومینه‌سانس نوتروفیل‌ها را اصلاح کرده و باعث‌جلوگیری از آلودگی شده است**(11)**. در تمام تحقیقات انجام‌گرفته درموردتولید O_2^- و H_2O_2، اندازه‌گیری‌ها در سیستم‌های Cell Free و با تأثـیر In vitro دارو در نوتروفیل‌های جـداشده از افراد سالم انجام گرفته است و هیچ مطالعه‌ای در خصوص انفجـار تنفسی نوتروفیل‌ها به روش NBT و تجویز دارو به طور In vivo انجام نگرفته است.

هدف از این تحقیق که در بخش ایمنولوژی دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفته این بوده‌است که تأثیرات سایمتیدین درفعالـیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌های خون موش صحرایی به روش NBT بررسی شود و با توجه به In vivo بودن تجـویز دارو و تأثیر عوامل جانبی متعدد، تأثیر سایمتیدین در این مورد تعیین گردد.

مواد و روش‌ها :

این مطالعه به روش مورد شاهدی انجام شد.در این تحقیق **17** مـــوش صحرایی جوان و بالغ با وزن تقریبی **180** تا **200** گرم انتخاب شدند که سن آن‌ها

1. Reactive Orygen Species(ROS)

حدود 18 هفته بود . موش‌ها به دو گروه 8 و 9 تایی که از نظـر سن و وزن مشابه بودند ،تقسیم‌شدند. برای حذف تأثیر عوامل مداخله‌گر هورمون‌های جنسی تمام موش‌های مورد آزمایش نر بودند و برای به حداقل رساندن دیگر عوامل مداخله‌گر، سن، وزن و نژاد موش‌ها یکسان درنظرگرفته‌شد و شرایط نگهداری و تغذیه آن‌هاکاملاً یکسان بود.

به گروه‌تجربی به مدت یک هفته یک دوز50mg/kg درروز سایمتیدین در عضله تزریق می‌شد و به گروه دوم همزمان محلول سالین نرمال تزریقی عضلانی به همان میزان تزریق می گردید (12).

پس از یک هفته یک نمونه خون برای آزمایش NBT[1] از قلب حیوانات با ماده ضد انعقادی EDTA گرفته شد.

برای انجام تست NBT یک ویال 100 میکـرولیتری خون کامل دارای EDTA به 100 میکرولیتر محلول NBT (5 میلی‌گرم پودر NBT) (sigma Na6876) و 85 میکرولیتر آلبومین گاوی ، 5 میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط شده با 100 میکرولیتر PMA (فـوربول میرستات استات) به غلظت یک میکروگرم به ازای هر 50 میکرولیتر خون) اضافه شد. نمونه‌ها در انکـــوباتور 37 درجه سانتیگراد به مدت 30 دقیقه قرار گرفتند و سپس لوله‌ها به مدت 3 دقیقه با دور R/m 1500 سانتریفوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد. از گلبول‌های رسوب‌کرده یک گسترش خونی تهیه شد و گسترش‌ها به‌وسیله رنگ گیسما رنگ آمیزی شد و در زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی 1000 * تعداد صد نوتروفیل شمارش شد و تعداد نوتروفیل‌های مثبت برای انفجارتنفسی در این صد نوتروفیل شمارش‌شده تعیین‌گردید و به صورت درصد گزارش گردید (13-15). نتایج به‌دست‌آمده توسط آزمون من ویتنی با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها :

در گروه شاهد محدوده تغییرات انفجار تنفسی نمونه‌های موجود 88 % ـ 44 % و میانگین فعالیت انفجار تنفسی 13±69 درصد بـود . در گروه تجربی محدوده‌تغییرات‌فعـــالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها در نمونه‌ها 92% ـ74% بودومیانگین آن 8% ± 82% به دست آمد. میانگین به‌دست آمده در گروه تجربی 13% بیشتر از گروه کنترل بود و این اختلاف از نظر آماری با آزمون من‌ویتنی معنادار بود(P = 0/034).

جدول 1- درصد احیای NBT توسط نمونه‌های گروه شاهد و تجربی.

درصد احیای NBT توسط نمونه‌های گروه شاهد	%76	%58	%88	%72	%62	%70	%44	%76	%74	
درصد احیای NBT توسط نمونه‌های گروه تجربی	%86	%86	%67	%78	%74	%88	%84	%92		

1.Nitro Blue tetrazolium test

بحث :

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز سایمتیدین با دوز 50 mg/kg در روز به‌مدت یک هفته باعث افزایش فعـــالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌های خون موش صحرایی به روش NBT نسبت به گروه شاهد می گردد. گرچه در تحقیقات قبلی انجام‌شده تأثیر این دارو در انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها به روش NBT به‌صورت In vivo مورد بررسی قرار نگرفته است، ولی مطالعاتی روی تأثیر سایمتیدین در تولـــید O_2^- و H_2O_2 و ROS انجام گرفته است که نتایج متفاوتی داشتـه‌اند . Mikawak نشان داد که سایمتیدین تولید O_2^- و H_2O_2 را توسط نوتروفیل‌ها به طور ضعیفی مهارمی‌کند و سایمتیدین خاصیت جمع‌کنندگی ROS تولیدشده در این سیستم cell-free را نداشت. این اندازه‌گیری‌ها توسط سیستم گزانتین ـ گزانتین اکسیداز انجام گرفت(4). مطالعات مخالف با این نتایج سایمتیدین را در تولید O_2^- القا شده به‌وسیله FMLP در نوتروفیل بی‌تأثیر می‌داند(5). Lapenna هم ناتوانی سایمتیدین رادر جلوگیری ازتولید O_2^- و H_2O_2 عنوان‌کرده‌است که درآن آنیون سوپراکسید به‌وسیله سیستم گزانتین‌ـگزانتین اکسیداز و جمع‌کنندگی H_2O_2 به‌وسیله سیستم guaiacol-peroxidase اندازه‌گیری شده است (6).

در مطالعاتی که در خصوص تأثیر هیستامین در تولید یون‌های اکسیژن انجام‌شد، هیستامین تولید سوپراکسید (O_2) توسط نوتروفیل را به وسیله گیرنده H_2 هیستامین نوتروفیل متوقف‌کرده که این اندازه‌گیری‌ها نیز به روش اسپکتروفتومتری انجام شده‌است. اندازه‌گیری‌هایی که به روش فلورومتری انجام گرفته نیز نقش هیستامین را در متوقف ساختن تولید H_2O_2 توسط‌نوتروفیل‌ها تأئید کرده‌اند. تمام این مطالعات به‌صـورت In vitro انجام گرفته‌است(18-16). در این مطالعات تأثیر داروهای سایمتیدین و فاموتیدین بر اثـر هیستامین روی نوتـروفیـل‌ها نیـز بـررسـی شـده‌است که به آناتاگونیزه‌شدن تأثیرات هیستامین در تولید O_2^- و H_2O_2 توسط نوتروفیل‌ها اشاره شده‌است(18-16). Stecwart M افزایش کمولومینه‌سانس نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها را بعد از عمل جراحی گزارش کرده که با عفونت همراه بوده است و راینیتیدین کمولومینه‌سانس نوتروفیل‌ها را اصلاح کرده و باعث جلوگیری از آلودگی شده است (18).

Nielsen در افرادی که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند با تجویز راینتیدین در روز صفر و روز اول بعد از عمل کمولومینه‌سانس نوتروفیل‌ها به زیموزان و FMLP را اندازه‌گیری و با گروه کنترل مقایسه کرد که افزایش معناداری در گروه کنترل در روز اول نسبت به روز صفر دیده شد، در حالی که گروه راینیتیدین کمولومینه‌سانس نسبت به زیموزان را در روز اول کاهش داد(19) و مغایر با این یافته‌ها مطالعاتی انجام‌شـده که در افراد سپتی‌سمی، کاهش میزان رادیکال‌های اکسیژن دیده شده که با توسعه عفونت همـراهی کرده است(21 و 20).

دریک مطالعه دیگر Carry عنوان کرد که سایمتیدین آثار مهاری نوتروفیل‌هارا در تولید O_2^- به‌وسیله هیستامین‌درخوک‌های‌آلوده با سـودوموناس خنثی و معکوس می‌کند و این آثار متضاد در

بیماران و افراد آلوده و افراد سالم ممکن است به علت عوامل مختلف بافتی و جریان‌خونی مثل استرس، تغییرات هورمون‌ها، سایتوکاین‌ها و تجویزهای قبلی داروها و غیره باشد که هر کدام می‌توانند عمل نوتروفیل‌ها را تغییر دهند **(22)**.

در این تحقیق سایمتیدین فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌های خون موش صحرایی را افزایش داد و موافق با یافته‌های Carry احتمالاً این تأثیر سایمتیدین به علت متوقف‌ساختن عوامل مختلفی است که می‌توانند باعث جلوگیری از فعالیت نوتروفیل‌ها شوندکه یکی از این عوامل ممکن است هیستامین باشد .

مغایر با یافته‌های Mikawa و Zimmerman که تأثیرات سایمتیدین را در In vitro جمع‌کنندگی و یا کاهش رادیکال‌های اکسیژن می‌دانستند، اگرچه در این تحقیق از اندازه‌گیری رادیکال‌های اکسیژن استفاده نشده است، ولی با اندازه‌گیری انفجار تنفسی به‌وسیله NBT به‌طور غیرمستقیم تأثیر افزایش این دارو درتولید این رادیکال‌ها دیده شد که احتمالاً به‌خاطر متوقف‌ساختن عوامل جلوگیری‌کننده از تولید رادیکال‌های اکسیژن در نوتروفیل‌ها این نتایج در تجویز In vivo دارو دیده‌شد.

در تحقیق حاضر مکانیسم تأثیر سایمتیدین در فعالیت نوتروفیل‌ها مشخص نگردیده است و تأثیر این دارو به‌طور کلی مورد بررسی قرار گرفته است که با توجه به طیف اثر وسیع این دارو ، پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آینده علاوه بر گروه کنترل و گروه تحت تأثیر سایمتیدین، گروه سومی اضافه گردد که در آن گروه ، تأثیر داروهای آگونیست گیرنده H_2 در نوتروفیل‌ها بررسی و با دو گروه قبلی مقایسه گردد . به این ترتیب می‌توان تا حد زیادی به تأثیر داروهای مؤثر بر گیرنده H_2 در فعالیت نوتروفیل‌ها پی برد و مکانیسم تأثیر این داروها را نیز مشخص نمود.

Reference :

1. Buckley, RH. The immunologic system and disorders: In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Text book of pediatrics. 16th ed. USA: Sanders; 2000, PP.600–612.
2. Schreurs J, Dailiey MD and Schulaman H. Pharmacological characterization of histamine H_{-2} receptors on donal cytolytic T Lymphocytes. Biochem Pharmacol 1984 ; 171(3):3375–82.
3. Zimmerman J, Millard J. H_2–antagonist inhibition of human neutrophil super oxide anion synthesis. Clin Pharmacol Ther 1989; 45:487–97.
4. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niway. The effect of cimetidine, ranitidine, and famotidine on human neutrophil functions. Anesth Analg 1999; 89:218–24.

5. Burder R, Buschauer A, Seifert R. Characterization of histamine H2–receptors in human neutrophils with aseries of guanidine analogues of impromidine: are cell type – specific H2 – receptors involved in the regulation of NADPH Oxidase? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1990; 341:455–61.

6. Lapenna D, de Gioia S, Mezzetti A, et al. H2–receptor antagonist are scavengers of oxygen radicals. Eur J Clin Inves 1994; 24:47–81.

7. Ozaki Y, Kumes and Ohashi A. Effect of histamine and antagonists on granulocytes. Agents Actions 1984; 15:182–188 .

8. Puustinen T, and Uotila P. Thromboxane formation in human neutrophils is inhibited by orednisone and stimulated by leakut rienes. Med 1984; 14(2):161–167.

9. Black JW, Duncan WAM, Durants CJ, Ganelin R, and Parsons EM. Definitions and antagonism of histamin H2 – receptors. Nature 1972; 236:386–390.

10. Burde R, Sefert R, Buschauer A, Schultz O. Histamine inhibits activation of human neutrophils and H2–60 leukemic cells via H2–receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch pharmacol 1989; 340:671–8.

11. Nielsen HJ, Nielsen H, Jensen S, Moesgaard F. Ranitidine improves postoperative monocyte and neutrophil function. Arc Surg 1994 ; 129:309–15.

12. Sais SA, Foda AM. Influence of cimetidine on the pharmacokinetics of piroxicam in ratand man. Arznei Mittel Forschung 1989 ; 39(7):790–2.

13. Bachner RL,and Nathan DG. Quantitative NBT tes CGD. N Eng J Med 1968 ; 278:971–76.

14. Coates TD, Beyer LL, Bachner RL. Labratory evaluation of neutropenia and neutrophil dysfunction: In: Ros NR, Demacario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM. Manual of clinical labratory immunology. 4th ed. Mencan society for Microbiology , 1992 , PP.409–419.

15. Gooi HC, and Chapel H. Clinical immunology. New York: //Saunders; 1990, PP.53–55.

16. Seligman BE, Fletcher MP, Gallin JI, Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion, degranulation, and membrane potential changes. J Immunol 1983; 130:1902–9.

17. Tarnok I, Tarnok Z. Interaction of cimetidine and histamine with superoxide generated in a cell – free system and in neutrophils. Agents Actions 1987 ; 20:324–6.

18. Stewart RM, Fabian TG, Fabian MJ. Gastric and extragastric actions of the histamine anagonist ranitidine during posttraumatic sepsis. Surgery 1995; 117(1): 68-82.

19. Nielsen HJ, Nielsen, Jensen, Moesgaard F. Ranitidine improves postoperative monocyte and neutrophil function. Arch Surg, 1994 ; 129:309–315.

20. Salo M, Perttila J, Lehtonenop. Granulocyte chemoluminescence in patients with postoperative infections. Arch Surg 1988 ; 123:17–22.

21. Lanser ME, Maop, Brown G, Coleman B, Siegel JH. Serum – mediated depression of neutrophil chemioluminesence following blunt trauma. Am Surg 1985 ; 202: 111–118.

22. Cary PD, Windsor ACJ, Walsh CJ, et al. Multi – agent therapy in the treatment of sepsis – induced microvascular injury. Br J Surg 1994 ; 81: 1752–6.