مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۲ شماره ٤ زمستان ۱۳۸۷، ۲۶- ۱۷

بررسی اثر داروی ۴-آمینوپیریدین(4-AP)بر ایمنوپاتوژنز واکنش التهابی درمدل تجربی

رضا غلام نژاد[1*]، دکتر محمد رضا خرمی زاده[2]، دکتر علیرضا رضوی[3]، علیرضا صالحی نوده[4]، محمد مهدی امیری[5]، وحید ملاکاظمی ها[6]، دکتر سید عباس میر شفیعی[7]

چکیده

زمینه و هدف: *امروزه بسیاری از بیماریهای التهابی نظیر آرتریت روماتوئید(RA) و مالتیپل اسکلروزیس(MS) و خیلی از بیماریهای التهابی خود ایمن دیگر گریبان گیر افراد جوامع مختلف شده است و تا کنون درمان قطعی برای آنها ارائه نشده است. بسیاری از ضایعات جبران ناپذیر در این گونه بیماریهای التهابی در اثر فعالیت بیش از حد و مزمن سلولهای التهابی و اثر تخریبی آنزیمهای پروتئولایتکی مانند ماتریکس متالوپروتئینازها(MMPs) است. از این رو در این مطالعه به بررسی اثرداروی٤- آمینو پیریدین(4-AP) برروند پیشرفت التهاب دریک واکنش التهابی در مدل تجربی پرداخته شد.*

روش بررسی: *مطالعه انجام شده از نوع استنباطی بود که در آن تعداد٤٨ راس رات Out bred از نژاد Sprague Dawely همگی ماده با وزن حدود ۲۰۰-۱۵۰ گرم و سنین ٦ تا ۸ هفتگی و سالم برای القای یک واکنش التهابی تجربی[توسط آلبومین سرم گاوی(BSA) +ادجوانت کامل فروند(CFA)] مورد استفاده قرار گرفتند. رات ها در٦ گروه ۸ تائی شامل:گروه نرمال،گروه بیمار،گروههای Treatment-1 و Treatment-2 وگروههای Prevention-1و Prevention-2 قرارگرفتند.داروی 4-AP در غلظتهای مختلف(٤۰۰و۸۰۰ میکروگرم) به گروههای Treatment-1,2 و Prevention-1,2 به میزان(۰/۱ میکرولیتر) تزریق گردید و ٤۸تا۷۲ ساعت بعد از تزریق دوز یادآور(فقط BSA) شدت التهاب مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.*

یافته ها: *از ٤۸ راتی که مورد مطالعه قرار گرفتند، ۸ رات(۱٦/٦٦٪) هیچ گونه علائم التهابی، هیستوپاتولوژی و یا تولید آنتی بادی ضد BSA را نشان ندادند و این همان گروه نرمال ما بودند. ۸ رات(۱٦/٦٦٪) علائم شدید و واضح التهاب را نشان دادند که گروه بیمار ما بودند. تعداد ۳۲ رات(٦٦/٦٦٪) علائم خفیفتری از التهاب را نسبت به گروه بیمار ما نشان دادند که همان گروههای Treatment-1,2 و Prevention-1,2 بودند که غلظتهای مختلفی از 4-AP را دریافت کرده بودند.*

بحث و نتیجه گیری: *تفاوت شدت التهاب و انفیلتراسیون سلولهای التهابی دربررسی‌های کلینیکی، رادیولوژی، هیستوپاتولوژی وتولید آنتی بادی ضد BSA نشان می‌دهد که داروی4-AP باعث کاهش شدت التهاب در گروههای دریافت کننده دارونسبت به گروههای نرمال و بیمار شده بود که این اختلاف از نظر آماری معنی داربود($p<0.05$).اگرچه آنالیزهای آماری، نشان ازعدم تاثیرداروی4-AP برمیزان تولید MMPs درسل لاین فیبروسارکوما Whi-164 داشت و اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود.*

واژه های کلیدی: *آرتریت روماتوئید ،واکنش التهابی، ماتریکس متالوپروتئینازها،٤-آمینوپیریدین*

* نویسنده مسئول :
رضا غلام نژاد ؛
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email : gholami 278@ gmail.com

- دریافت مقاله : تیر ۸۷ - پذیرش مقاله : شهریور ۸۷

[1] کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[2] استادیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[3] دانشیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[4] کارشناس ارشد ایمنولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[5] کارشناس ارشد ایمنولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[6] کارشناس میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران
[7] استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

هنگامی که آسیب بافتی براثر باکتریها، انگلها، ویروسها، ضربه، تروما، مواد شیمیایی، گرما، واکنش ایمنی بدن علیه بافتهای خودی و یا هرپدیده دیگری بوجود می‌آید، مدیاتورهای التهابی که توسط بافتهای آسیب دیده آزاد می‌شوند، موجب بروز تغییرات ثانویه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

بسیار شدیدی در بافتها می‌گردند. تمامی این تغییرات ثانویه روی هم التهاب یا آماس نامیده می‌شوند(۲-۱). هنگامی که بافتی دچار التهاب می‌شود، فرآورده‌های مختلفی تولید می‌شوند که می‌توانند موجب کموتاکتی سلولهای التهابی به سوی ناحیه ملتهب شوند. این مواد عبارتند از: برخی از سموم باکتریها،فرآورده‌های تخریبی خود بافتهای ملتهب،چندین فرآورده ناشی از واکنش مواد پیچیده که در بافتهای ملتهب فعال می‌شوند، فرآوردههای ناشی از لخته شدن پلاسما در ناحیه ملتهب، کمپلکسهای آنتی ژن-آنتی بادی و.... بعد از ورود عامل التهابی به بدن و فعال شدن پلاکتها، سیستم انعقادی، سیستم کمپلمان، سیستم ینینوژن، سیستم فیبرینولیزین و به دنبال آن تولید وترشح مولکولهای کموتاکتیک (کموکاینها)، باعث مهاجرت سلولهای التهابی از دیواره اندوتلیوم عروق بافتهای ملتهب می‌شوند که درراستای حذف عامل التهابی ممکن است عوارض ناخواسته‌ای نیز برجای بگذارند(۳).

به طور مثال بیماری RA که یکی از بیماریهای التهابی مزمن سیستمیک بسیار پیچیده با اتیولوژی نامشخص است و تقریبا ۰/۱-۰/۵درصد از جمعیت دنیا را گرفتار کرده است، یک عارضه فرسایشی است که سبب تخریب مفاصل و نهایتا موجب آسیب‌های ساختاری و ناتوانی می‌شود. RA همچنین با افزایش رخ دادن لنفوما در ارتباط است که این امر ممکن است به دلیل فعالیت سلولهای التهابی باشد(٤).

امروزه برای درمان بیماریهای التهابی نظیرRA و MS از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود؛ از طب سنتی گرفته (استفاده از سم زنبورعسل در آسیای شرقی) تا استفاده ازداروهای بیولوژیکی نظیر اینترلوکین یک- بتا (IL-1β)، فاکتور نکروزدهنده تومور-آلفا (TNF-α) وگلوکوکورتیکواستروییدها و داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی که امروزه به طور گسترده‌ای در درمان بیماریهای التهابی به کار می‌روند و هر کدام با مکانیسم ویژه‌ای باعث کاهش علائم این دسته از بیماریها می‌شوند(۵). داروی4-AP با فرمول مولکولی C5H6N2 و وزن مولکولی ۹٤/۱۲ میکروگرم یکی از داروهائی سنتتیکی است که برای درمان بیماریهائی نظیر میاستنی گراویس، لامبرت ایتون وMS مورد استفاده قرار گرفته است(٦). با توجه به اینکه این دارو و داروهائی نظیر TEA(تتراتیلن آمونیوم)، کوئینین، سم زنبورعسل، سم مار و سم شقایق‌های دریائی با مکانیسم بلوک کردن کانالهای پتاسیمی سلولها اثر خود را اعمال می‌کنند؛ این فرضیه وجود دارد که بتوان با استفاده از این داروها و بلوک کردن کانالهای پتاسیمی درسلولهای التهابی ولنفوسیتهای BوT روند التهاب را در بیماریهای التهابی کند ویا حتی متوقف کرد. با توجه به اینکه در سالهای اخیر محققین توانسته‌اند با کمک4-AP و ۳و٤- دی آمینو پیریدین (3,4-DAP) علائم عصبی بیماری MS را کاهش دهند (۸-۷). از این رو تحقیقات بنیادین در رابطه با این بیماری‌ها می‌تواند کمک فراوانی به درک مکانیسم‌های موثر در پاتوژنز این بیماری‌ها و اتخاذ پروتکل‌های درمانی جدید و مناسب تری برای این بیماران نماید.

روش بررسی

در این مطالعه، تعداد ٤٨ راس رات Out bred از نژاد Spragu Dawely همگی ماده با وزن حدود ۲۰۰-۱۵۰ گرم و سنین ٦ تا ۸ هفتگی وسالم برای القای یک واکنش التهابی تجربی مورد استفاده قرار گرفتند. راتها به صورت تصادفی در ٦ گروه ۸ تائی شامل: گروه نرمال، گروه بیمار، گروههای Treatment-1 و Treatment-2، گروههای Prevention-1 و Prevention-2 قرارگرفتند. BSA (ساخت شرکت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

سیگماآلدریچ) به میزان۲ میلی گرم بر میلی لیتراستفاده شدکه با حجم مساوی ازCFA حاوی مایکو باکتریوم توبرکلوزیس۵ میلی گرم بر میلی لیتر(ساخت شرکت سیگما آلدریچ) مخلوط گردید و به صورت امولسیون در آمده و مقدار۱۰۰ میکرولیتر از امولسیون به صورت داخل جلدی در قاعده دم راتها تزریق گردید. تزریق یادآور۱٤روز بعد از تزریق اول بوسیله BSA در کف پای راتها انجام شد. داروی4-AP درغلظتهای مختلف(٤۰۰ و۸۰۰ میکروگرم) از یک هفته قبل از القاء واکنش التهابی (گروههای1,2-Prevention) و یک هفته بعد از القاء واکنش التهابی(گروههای Treatment-1,2) به میزان ۰/۱ میکرولیتر به صورت داخل شکمی تزریق گردید.راتها ٤۸ و۷۲ ساعت پس از تزریق دوز یادآور BSA (۱۵روز بعد از القاءواکنش التهابی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. درگروه نرمال بیماری ایجاد نشد وحیوانات هیچ گونه داروئی دریافت نکردند.درگروه بیمار یک واکنش التهابی طبق پروتکل ذکر شده ایجاد شد اما داروی4-AP را دریافت نکردند.

آنالیزهای آماری

استفاده از روش T-testبرای نتایج حاصل از بررسی آنتی بادی ضدBSA به روش الایزا و میزان تولید MMPs وروشMann-Whitney برای بررسی نتایج بدست آمده از ارزیابی کلینیکی، رادیولوژی و هیستوپاتولوژی مورد استفاده قرار گرفتند.Pvalue جهت معنی دار بودن یا نبودن نتایج استفاده شد و در نهایت جهت تحلیل نتایج از نرم افزارSPSS15 استفاده شد.

- بررسی کلینیکی

پای راتها از نظرقطرواکنش التهابی و با توجه به علائم کلینیکی بوسیله کولیس اندازه گیری شدند و نتایج روزانه ثبت و در پایان ازلحاظ آماری مورد بررسی قرار گرفتند.

- بررسی رادیولوژیکی

درجه بندی رادیولوژیک بوسیله مقایسه فیلمهای تهیه شده از پای حیوان تعیین شد. یک درجه در هرپا براساس درجه نرمی التهاب بافتی، نازکی محل التهاب، کدورت محل التهاب در اثر انفیلتراسیون سلولها و شدت التهاب می‌باشد. طیف درجه بندی در هرپا از ۳-۰ است. که صفر برای حالت نرمال و۳ برای حالت ماکزیمم ضایعات التهابی در نظرگرفته شد.

- بررسی هیستوپاتولوژیک

التهاب و پرولیفراسیون سلولها همچنین با درجه بندی هیستولوژی قطعاتی از پای حیوانات ارزیابی شد. راتها در روز سوم با سدیم پنتوباربیتورات به صورت داخل شکمی بیهوش و سپس کشته شدند و اعضای پاهائی که درآنها واکنش التهابی ایجاد شده بود برداشته شد و در فرمالین۱۰٪ نگهداری تا از لحاظ هیستوپاتولوژی مورد بررسی قرار گیرند. برای هیستوپاتولوژی از رنگ آمیزی هماتوکسین وائوزین استفاده شد. مقاطع تهیه شده براساس پرخونی، ادم، انفیلتراسیون سلولهای التهابی(وسعت التهاب) و شدت التهاب ارزیابی شدند. درجه بندی براساس روشهای استاندارد درجه بندی(Scoring) از٤-۰ انجام شد.

- بررسی آنتی بادی ضد BSA

برای تعیین میزان آنتی بادی ضدBSA پلیتهای۹٦ تائی پلی ونیل کلراید با ۱ میکرولیتر از BSA (یک میکرولیتر در هرچاهک) که با بافرسدیم کربنات۰/۱ مولار رقیق شده بود به مدت یک ساعت در دمای° ۳۷ سانتی گراد و سپس به مدت۱٦ ساعت در°٤۰ سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از ۱٦ساعت چاهکها بوسیلهTween20(۵٪) شرکت سیگما آلدریچ) که بوسیله بافررقیق شده بود شستشوداده شدند. سپس به چاهکها سرم رقیق شده حیوانات مورد آزمایش به نسبت ۱/۲۵۰۰۰ اضافه شد و به مدت یک ساعت در°۳۷ سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از یک ساعت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

انکوبه شدن چاهک‌ها با Tween 20 (٠/٥٪) شستشو داده شدند تا مولکولهای اتصال نیافته خارج شوند. بعد از شستشو آنتی رات خرگوشی کنژوکه شده با پراکسیداز که به نسبت ١/٢٥٠ با Tween 20 (٠/٥٪) رقیق شده بود به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس چاهک‌ها سه بار شستشو داده شدند و به آنها سوبسترایO- متیل آلدئید آمین و H2O2 اضافه شد تا عمل شناسایی آنتی بادی انجام شود. سپس 2NH2SO4 (شرکت مرک آلمان) برای متوقف کردن واکنشها به چاهک‌ها اضافه شد و در پایان جذب نوری نمونه‌ها در٦٣٠ نانومتر بوسیله الایزاریدر (شرکتDANA مدلDA-36) قرائت شد.

- بررسی میزان تولید MMPs

برای بررسی میزان تولیدMMPs (نقش عمده‌ای در ضایعات التهابی دارند) درحضور دارو دربدن (Invivo) از سلول لاین فیبروسارکوما Whi-164با منشاء موشی که شباهت زیادی با سلولهای حیوانات مورد آزمایش دارند از بانک سلولی انستیتوی پاستورایران تهیه شد و به تعداد ٧٠٠٠٠سلول در هر چاهک در پلیت‌های ٩٦ خانه‌ای در محیط کشت RPMI-6401 با ٥٪ سرم، پنی سیلین١٠٠ میکرو یونیت درمیلی لیتر و استرپتومایسین١٠٠میکروگرم درمیلی لیتر تحت شرایط ٥٪ دی اکسید دردمای٣٧°سانتیگراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند. رقت های مختلفAP-4 (٠/١،٠/٢،٠/٤ میکروگرم برمیلی لیتر) به کشت سلول‌ها اضافه شد. پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها مورد رنگ سنجی قرار گرفتند. برای شمارش و تعیین درصد سلولهای زنده در سوسپانسیون سلولی(Viability test) ابتدا یک قطره از سوسپانسیون سلولی با یک قطره از تریپان بلو (٠/٢ در صد در سالین) مخلوط گردید و پس از یک تا دو دقیقه درصد سلول های زنده (سلول هائی رنگ نشده) توسط لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردیدند. برای شمارش و تعیین تعداد سلول‌ها در هرمیلی لیتر، سلولهای یک مربع ١٦ تائی لام نئوبار را شمرده و در ضریب رقت و ابعاد حجم شمارش شده ضرب می‌شود تا تعداد سلول در هر میلی لیتر به دست آید. سپس برای تعیین میزان فعالیت آنزیمیMMPs تکنیک هیوسن و دودل(Heussen&Dowdle) که برای تشخیص ژلاتیناز(کلاژنازچهار یا MMP-2) مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید حاوی دو میلی گرم بر میلی لیتر ژلاتین درحضورسدیم دودسیل سولفات و تحت شرایط غیر کاهنده به مدت سه ساعت در ولتاژ ٨٠ ولت الکترو فورز شدند. سپس ژل با Triton×100 (شرکت سیگما آلدریچ) با غلظت٢/٥٪ درجهت حذف سدیم دودسیل سولفات، شسته شد. ژل حاصل به مدت یک شب در٣٧° سانتی گراد درون محلول حاوی ٠/١ مولارتریپس هیدروکلراید و١٠٠ میلی مولارکلسیم کلراید نگهداری و سرانجام با کوماسی بلو ٠/٠٥ درصد رنگ آمیزی گردید. پس از رنگ بری، مناطق دچار پروتئولیز در زمینه اصلی مشخص شدند. ارزیابی کمی از طریق محاسبه چگالی سطح به وسیله نرم افزار رایانه‌ای انجام شد و در نهایت فعالیت آنزیم به صورت نسبی بیان شد.

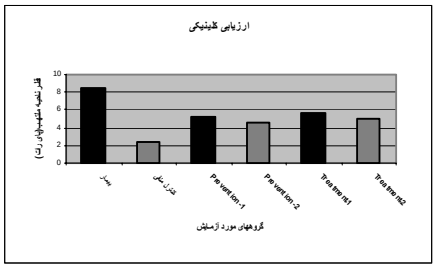
یافته ها

بر اساس مشاهدات و نتایج بعمل آمده از ارزیابی کلینیکی در حیوانات مورد آزمایش و اندازه گیری قطر ناحیه التهابی بوسیله روشهای استاندارد(استفاده از کولیس دیجیتال)، غلظتهای مختلف داروی4-AP به طور چشمگیری شدت التهاب را نسبت به گروه بیمار

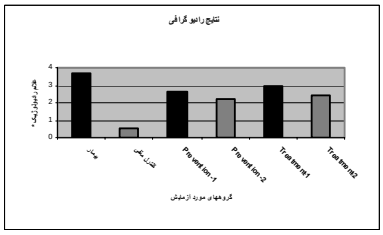
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

کاهش داده بودند(نمودار۱). آنالیزهای آماری نیز این یافته‌ها را تائید کردند و اختلاف معنی داری بین گروههای مورد آزمایش، گروه بیمار وگروه نرمال وجود داشت($P<0.05$).

در بررسی رادیو گرافی ما به دنبال یافته‌هائی بودیم که بروز واکنش التهابی را با استفاده از معیارهائی همچون درجه نرمی التهاب بافتی، نازکی محل التهاب، کدورت محل التهاب در اثر انفیلتراسیون سلولها و شدت التهاب در گروههای تجربی مورد تائید قرار دهد. نتایج به دست آمده نشان داد که PValue در گروههای مورد آزمایش کمتر از ۰/۰۵ است و اختلاف معنی دار بین گروه کنترل وگروههای مورد آزمایش وجود داشت(نمودار ۲).



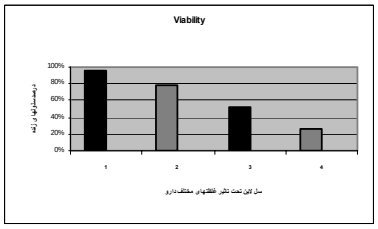
نمودار۱- نتایج ارزیابی قطر نامیه ملتهب را نشان می‌دهد که با کولیس دیجیتال اندازه گیری شده است



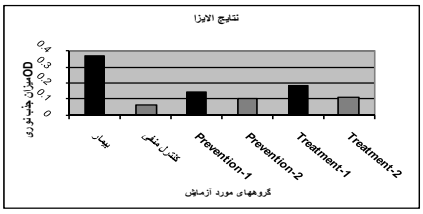
نمودار ۲- نتایج رادیوگرافی را نشان می‌دهد که با استفاده از درجه بندی استاندارد توسط متخصص رادیولوژی بررسی شده‌اند

در نمودار(۳) نتایج مربوط به Viability و اثر سایتو توکسیتی غلظت‌های مختلف 4-AP بر گروههای مورد آزمایش آمده است، که نشان می‌دهد دارو به طور چشمگیری موجب کاهش پرولیفراسیون سلولهای Whi-164 شده است. آنالیزهای آماری نیز این مشاهدات را تائید می‌کنند و($P<0.05$) می‌باشد.

آنچه در این مطالعه قابل توجه بود کاهش میزان تولید آنتی بادی ضد BSA در گروههای Treatment-1,2 و Prevention-1,2 نسبت به گروه بیمار و گروه نرمال بود (هیچ گونه داروئی دریافت نکرده بودند) آنالیزهای آماری نیز این اختلاف معنی دار را به خوبی نشان دادند($Pv<0/05$).

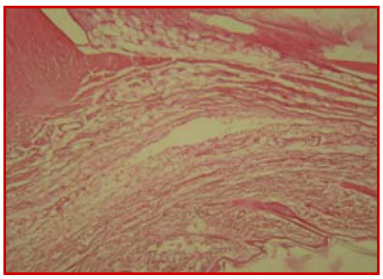


نمودار ۳-درصد سلولهای زنده را در غلظتهای مختلف دارو نشان می‌دهد



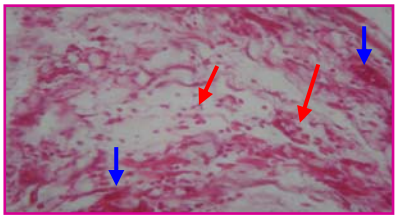
نمودار ۴- جذب نوری میزان تولید آنتی بادی ضدBSA را در غلظتهای مختلف دارو نشان می‌دهد؛ به کاهش میزان تولیدآنتی بادی در گروههائی که دارو دریافت کرده‌اند توجه شود.

نتایج به دست آمده از بررسی‌های پاتولوژیک و آنالیزهای آماری حاکی از اختلاف معنی داری در شدت التهاب ایجاد شده، ادم، پرخونی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در گروه‌های مختلف نسبت به گروه بیمارو گروه نرمال می‌باشد.



تصویر ۱- مقطعی از پای یک رات نرمال که در آن اثری از التهاب، ادم، یا انفیلتراسیون سلولهای التهابی دیده نمی‌شود.

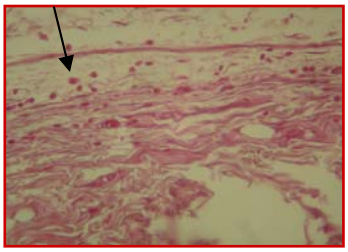
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]



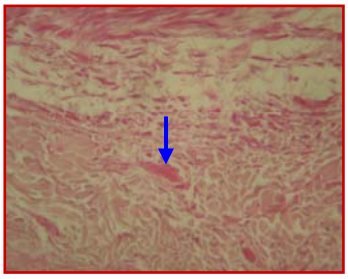
تصویر ۲- مقطعی از پای یک رات بیمار را نشان می‌دهد

همانطوریکه در تصویر (۲) دیده می‌شود علاوه بر پرخونی و ادم، انفیلتراسیون سلولهای التهابی تک هسته‌ای به نسبت بیشتر و پلی مورفونوکلئرها به نسبت کمتری دیده می‌شود.

راتهائی که غلظتهای مختلفی از دارو را دریافت کرده بودند درجات مختلفی انفیلتراسیون سلولهای التهابی، پرخونی، ادم وشدت التهاب را نشان دادند. تصویر(۳) مقطعی از پای یک رات رانشان می‌دهد که غلظت ٤۰۰ میکروگرم دارو را دریافت کرده است و تصویر(٤) مقطعی از پای یک رات را نشان می‌دهد که غلظت ۸۰۰ میکروگرم دارو را دریافت کرده است.



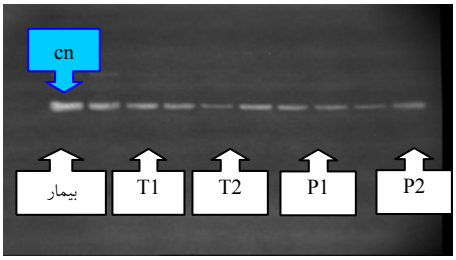
تصویر ۳- انفیلتراسیون خفیف و پراکنده سلولهای التهابی در تصویر دیده می‌شود (فلش)



تصویر ۴- تعداد بسیار اندک سلولهای التهابی و پرخونی محدود درتصویر دیده می‌شود (فلش)

آنچه که از بررسی‌های هیستوپاتولوژی مقاطع تهیه شده بدست آمد این بود که گروه Prevention-2 که غلظت ۸۰۰ میکروگرمی دارو را یک هفته قبل از القاء واکنش التهابی دریافت کرده بودند(تصویر ٤) نسبت به گروه Treatment-2 که غلظت ۸۰۰ میکروگرمی دارو را یک هفته بعد از القاء واکنش التهابی دریافت کرده بودند (تصویر ۳) علائم التهابی خفیفتری را نشان دادند. آنالیزهای آماری نیز این یافته‌ها را تائید کردند(Pv<0.05).

در بررسی میزان فعالیت MMPs بر روی ژل کروماتوگرافی که در اینجا کلاژناز چهار که یکی از MMPs است مورد بررسی قرارگرفت و مشخص شد که میزان تولید این آنزیم در غلظتهای مختلف داروی 4-AP استفاده شده بر روی سلول لاین فیبروسارکوما Whi -164 نسبت به گروههای نرمال و کنترل اختلاف معنی داری ندارد؛ کما اینکه آنالیزهای آماری نیز این نکته را نشان دادند(P>0.05).



تصویر ۵- زایموگرافی MMPs را بر روی ژل کروماتوگرافی نشان می‌دهد cn=کنترل نرمال،

T1=Treatment-1 T2=Treatment-2
P1=Prevention-1 P2=Prevention-2

همانطوریکه در تصویر بالا دیده می‌شود اختلاف چندانی بین میزان فعالیت MMPs در گروههائی که دارو دریافت کرده اند نسبت به گروه بیمار وجود ندارد و این مورد باتوجه به آنالیزهای آماری تایید شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

بحث

اگرچه التهاب به خودی خود یک مکانیسم بسیار سودمند برای بدن می‌باشد و بدن از واکنشهای مختلف التهابی در جهت دفاع و حذف پاتوژن‌های متعدد استفاده می‌کند؛ با وجود این در بعضی از موارد واکنشهای التهابی ضایعات جبران ناپذیری را در بدن به جا می‌گذارند. نتایج پاتوژنیک بسیاری از بیماریهای خود ایمن در اثر همین واکنش ناخواسته التهابی بر علیه بافتهای خودی است(۹و۱). در مشاهدات پاتولوژی بیماری MS که شایعترین بیماری التهابی نورولوژیک در جوانان است، التهاب درماده سفید سیستم اعصاب مرکزی(CNS) و از دست رفتن میلین ثانویه در اثر واکنش سلولهای التهابی دیده می‌شود. در اثر همین تخریب، بیماران دچار ضعف، فلج و علائم چشمی می‌شوند(۱۰). و یا در بیماریRA که با تخریب غضروف مفاصل و التهاب سینوویوم همراه است هر دو دسته از پاسخهای ایمنی سلولی و هومورال در ایجاد ضایعات دخالت دارند. در مشاهدات پاتولوژی، سلول های +TCD4 لنفوسیتهای B فعال شده(پلاسماسلها)، ماکرو فاژها و دیگر سلولهای التهابی در سینوویوم ملتهب دیده می‌شوند سایتوکاینهای مختلفی مانند IL-1 و TNF-α در مایع سینوویال یافت شده‌اند که به نظر می‌رسد این سایتوکاینها باعث فراخوانی بیشتر سلولهای التهابی وتولید آنزیمهای هیدرولیتیک نظیر کلاژنازها(یک نوع از MMPs)توسط این سلولها و دیگرسلولهای حاضردر ناحیه ملتهب می‌شوند که این آنزیمها موجب تخریب مفاصل و غضروفهای ناحیه ملتهب می‌شوند(۱۲-۱۱). لنفوسیتهای B با تولید آنتی بادیهای مختلف موجب تشکیل کمپلکسهای ایمنی شده که در مفاصل رسوب کرده و همین امر موجب فعال شدن سلولهای التهابی برای حذف این کمپلکسها می‌شود که بدنبال مزمن شدن بیماری و فعالیت بیش از حد این سلولها ضایعات مفصلی جبران ناپذیری را برجای می‌گذارند(۱۳).

MMPs خانواده ای از آنزیم‌های پروتئولیکی هستند که توانایی تجزیه اکثر ساختارهای شناخته شده در ماتریکس خارج سلولی(کلاژنها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌ها) را دارند. اگر اهمیت سوبستراهایی که متالوپروتئینازهای فعال می‌توانند تجزیه کنند را در نظر بگیریم وجود کنترل شدید برفعالیت آنها تعجب بر انگیز نخواهد بود. این کنترل‌ها در سطوح مختلفی صورت می‌گیرد و باعث می‌شود که اغلب سلولها در حالت طبیعی مقدار بسیار اندکی از این آنزیم ها را تولید کنند. از نقش‌های پاتولوژیک MMPها در ایجاد بیماری های قلبی – عروقی است.

آترواسکلروزیس فرایند التهابی مزمنی است که درآن تجمع ماتریکس خارج سلولی سلول های عضله صاف و ماکروفاژها در لایه انتهایی عروق، باعث تشکیل پلاک‌هایی در ناحیه ملتهب می‌شود .در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که فعال کننده‌های پلاسمینوژن سبب فعال شدن MMP های مربوط به ماکروفاژها ی مهاجر محل آترواسکلروز شده و سبب تخریب آنها می‌شوند(۱۶-۱٤).

استراتژی بکار رفته برای درمان بعضی از بیماریهای التهابی استفاده از داروهای ضد التهابی مانند کورتیکواستروئیدها به منظور کاهش آزار بافتی به ویژه در مراحل اجرائی پاسخهای ایمنی پاتولوژیک است. داروهای دیگری مثل آنتاگونیستهای سایتو کاینهای التهابی(IL-1 وTNF) و نیز عواملی که از مهاجرت لکوسیتها به بافتها ممانعت بعمل می‌آورند، از نظر اثرات ضد التهابی هنوز در حال بررسی می‌باشند(۱۷). علیرغم پیشرفتهای علوم پزشکی در زمینه درمان بیماریهای التهابی خودایمن تا کنون درمان قطعی برای این گونه بیماریها شناخته نشده است. ما در این مطالعه سعی بر آن داشتیم که روند پیشرفت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

واکنشهای التهابی را با مکانیسمی متفاوت از آنچه که در مورد مکانیسمهای ضد التهابی داروهای استروئیدی و غیر استروئیدی وجود دارد کند و یا حتی متوقف کنیم.

داروی 4-APو3,4DA در سالهای اخیر برای درمان بیماری خود ایمن التهابی نظیر MS مورد استفاده قرار گرفته‌اند و از آنجا که این مواد بلوک کننده کانالهای پتاسیمی می‌باشند و هر یک از سلولهای بدن نیز توسط رسپتور خاصی از کانالهای یونی مشخص می‌شوند و یک حالت اختصاصی- تمایزی در میان کانالهای وابسته به ولتاژ(KV) در سلولهای مختلف وجود دارد می‌توان با بلوک کردن این کانالها از فعالیت بیش از حد و زیانبار آنها جلوگیری کرد(۱۸). کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ(KV) که در پرولیفراسیون سلولی دخالت دارند، یک گروه بزرگ و متنوع از پروتئینهای ساختاری و عملکردی می‌باشند.چهار نوع اصلی از کانالهای پتاسیمی، یعنیKV-1،KV-2،KV-3 و KV-4 در سلولها شناخته شده‌اند. نتایج حاصل از تحقیقات مشابه برروی مدل تجربی آسیب طناب نخاعی در سال ۱۹۹٦توسط Peres Espejo و همکارانش، نشان داد که سیگنالهای عصبی و عملکرد طناب نخاعی در حضور 4-AP بهبود یافته است و علائم التهابی(همچون انفیلتراسیون سلولهای التهابی) ایجاد شده در اثر آسیب وارده کاهش یافته است(۱۸). در مطالعه دیگری که در سال۲۰۰٦ توسط Sonia Franciosi و همکارانش بر روی سیگنال سلولی و پاسخهای عملکردی میکروگلیال انسانی انجام شد، نشان داد که داروی-4 AP بعنوان یک ممانعت کننده پاسخهای التهابی عمل می‌کند(۱۹). یک دلیل برای بهبودی علائم بیماریهای مرتبط با T-Cell در هنگام استفاده از بلوکرهای کانالهای پتاسیمی، افزایش داخل سلولی کلسیم و شروع آپپتوز است. عملکرد کانالهای پتاسیمی برای پرولیفراسیون سلولهایT بالغ ضروری است(۲۰).

نتیجه گیری

آنچه که از نتایج و آنالیزهای آماری و مشاهدات رادیو گرافی و هیستوپاتولوژی بدست آمد نشان داد که داروی4-AP شدت التهاب را در حیواناتی که این دارو را دریافت کرده بودند به طور چشمگیری کاهش داده بود. گروهی که غلظت بالای دارو را دریافت کرده بودند(revention2 وTreatment2)نسبت به گروههائی که غلظت پائین دارو را دریافت کرده بودند (Prevention-1وTreatment-1)علائم التهابی را درحد پائین‌تری نشان دادند.

همچنین گروههای Prevention-1 وPrevention-2 نسبت به گروههایTreatment-1 وTreatment-2 علائم التهابی را در حد کمتری نشان دادند. این یافته دو دستاورد مهم داشت: اول اینکه نشان داد که دارو احتمالاً نقش پیشگیری کننده‌ای در ایجاد واکنش التهابی داشته باشد، چراکه گروههایPrevention-1 و Prevention-2 که یک هفته قبل از ایجاد واکنش التهابی روزانه ۰/۱ میکرولیتر از دارو را دریافت می‌کردند در مقایسه با گروههایTreatment-1 و Treatment2 که یک هفته بعداز ایجاد واکنش التهابی روزانه ۰/۱میکرولیتر از دارو را دریافت می‌کردند، علائم التهابی خفیفتری را بروز دادند. دوم اینکه دارو احتمالاً از طریق بلوک کردن کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ (KV) باعث سرکوب شدن سلولهای ایمنی و جلوگیری از پرولیفراسیون بیشتر سلولهای التهابی و پیشرفت التهاب شده است. نکته قابل توجه، تاثیر داروی4-AP بر کاهش تولید آنتی بادیBSA است و همین یافته ما را به آینده امیدوارتر می‌کند که می‌توان با استفاده از این دارو مانع از پیشرفت بیماریهای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

التهابی شد. اگر چه انتظار می‌رفت که داروی4-AP بتواند میزان فعالیت MMP-2 را کاهش دهد اما یافته‌های ما نشان داد که علیرغم کاهش اندک میزان فعالیت این آنزیم در گروه Prevention-2 ، این کاهش معنی دار نبوده و نشان می‌دهد که 4-AP بر فعالیت MMP-2 بی تاثیر است. دستاورد مهم این تحقیق تاثیر قابل قبول داروی 4-AP در کاهش شدت التهاب با استفاده از کاهش انفیلتراسیون سلولهای التهابی و کاهش میزان تولید آنتی بادی ضد آنتی ژن تزریقی(BSA) بود که به نظر می‌رسد دارو با استفاده از بلوک کردن کانالهای پتاسیمی سلولهایB و یا احتمالاً از طریق آپپتوز این سلولها توانسته است میزان تولید آنتی بادی ضد BSA را کاهش دهد. البته این یافته‌ها بررسی‌های بیشتری را می‌طلبد و این تحقیق بنیادی کمک بیشتری در راستای درک بیشتر ما از چگونگی مکانیسم واکنشهای التهابی و درمان کارآمدتر بیماریهای التهابی می‌کند.

منابع

1. Peretz B.Refuat Hapeh Vehashinayim. Inflammation--a defense mechanism only?2008 Nov; 25(4):84.

2. Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M.Innate immunity and inflammation--two facets of the same anti-infectious reaction.Clin Exp Immunol 2009 May; 156(2): 194-8.

3. Kim H, Kim J, Park H. Correlation of Anti-Cyclic citrullinated Antibody with Handjoint Erosion Score in Rheumatoid Arthritis Patients.2010; 25(2):201.

4. Park Ji H, Lee HS, Son JD, Oh WK, Kim HK, Song HS, etal. Antiarthritic Effect of Bee Venom. Arthritis & Rheumatism 2004; 50: 3504-3515.

5. Loboda A, Armstrong M.A model for 4-Aminopyridine Action on K channels: similarities to tetraethylammonium. Ion action biophysical journal 2001;81:895-904.

6. WiseyWM. Diaminopyridine treatment of neurological disorders. 2003.

7. Judge VIS, Lee MJ, Jr Bever TC, Hoffman MP.Voltage-gate potassium channel in Multiple Sclerosis: Overview and new implication for treatment of centeral nervous cystem inflammation and degeneration. Journal of Rehabilitation Research & Development 2006; 43:111-122.

8. Straussa V ,Wissela k, Ung S ,Wulff H, Hänselc W, Zhu J, etal. K+ channel-blocking alkoxypsoralens inhibit the immune +'~ responseo f encephalitogeniTc line cells and lymphocytesf rom t;c Lewis rats challenged für experimental auto immune Encephalomyelitis. Immunopharmacolog 2000; 5: 1-63.

9. Jennifer M, McCoy jM, Wicks jR, Audoly LP. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Clin Invest 2002 ; 110:651–658.

10. Bradl M, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis. Semin Immunopathol 2009.

11. Georgiadis NA, Papavasiliou CE, Laida SE, Alamanos Y, Kostara C,Tselepis DA, etal. Atherogenic lipid profile is a feature characteristic of patients with early rheumatoid arthritis :effect of early treatment –a prospective,controlled study. Arthritis Research&therapy 2006 ; 8:82.

12. Agmon-Levin N, Paz Z, Israeli E, Shoenfeld Y. Vaccines and autoimmunity 2009; 5: 648-52.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

13.Weissmann G.The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases 2006 ; 64 (1-2).

14. Ingersoll EP, Pendharkar NC. Characterization and expression of two matrix metalloproteinase genes during sea urchin development. 2005; 5: 727-32.

15. Amline C, Caruntu ID, Eliza SH, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvementin pathologic condition 2010; 51(2): 215-228.

16. Moss N, Barbolina M V,Lin Y, Sun L, Munshi HO, Stack M S. Ovarian Cancer Cell Detachment and Multicellular Aggregate Formation Are Regulated by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase: A Potential Role in I.p. Metastatic Dissemination 2009.

17. Douni E, Sfikakis PP, Haralambus S, Fernandes P, Kollias G. Attenuation of inflammation poly arthritis in TNF transgenic mice by diacerein:comparative analysis with dexamethason,methotrexate and anti-TNF protocols. Arthritis Res ther 2004; 6: 65-72.

18. Thorneloe KS,Chen TT. Molecular Composition of 4-Aminopyridine SensitiveVoltage-Gated K_ Channels of Vascular Smooth Muscle. 2001;89:1030-1037.

19- Matsumoto S,Tanimoto T,Yoshida S, Ikeda M, Takeda M, Saiki C, etal. Effects of Acetazolamide and 4-Aminopyridine on CO2-induced Slowly Adapting Pulmonary Stretch Receptor Inhibition in Rats. Chem Senses 2004; 29: 351–361.

20. Sadanaga T, Ohya J, Ohtsubo T, Goto K. Decreased 4-aminopyridine sensitive K+currents in endothelial cells from hypertensive rats. Hypertens Res 2002; 25: 589-596.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]