Archive of SID

مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۵۱۵-۵۰۷)

اثر حفاظتی رانیتیدین بر پاسخ اختصاصی سیستم‌ایمنی موشهای پرتو دیده

سوسن کبودانیان اردستانی[۱]، مجتبی امانی[۱] و آمینا کریمی‌نیا[۲]
[۱] مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک صندوق پستی ۱۳۸۴- ۱۳۱۴۵ دانشگاه تهران، تهران، ایران.
ardestani@ibb.ut.ac.ir
[۲] انستیتو پاستور بخش ایمنی‌شناسی، تهران، ایران.
(دریافت: ۸۱/۶/۱۰ ؛ پذیرش:۸۳/۸/۱۹)

چکیده

در اثر پرتوهای یونساز، میزان زیادی رادیکالهای آزاد ایجاد می‌شود که می‌تواند سبب صدمات جبران‌ناپذیری به سیستم ایمنی بدن شود. از سوی دیگرنشان داده شده است که رانیتیدین (مهار کننده‌گیرنده**H۲**) توانایی جارو کردن رادیکالهای آزاد را دارند. از این رو اثر رانیتیدین، بر ایمنی اختصاصی موشهای **BALB/c** که در معرض اشعه گاما قرار داده شده بودند مورد مطالعه قرار گرفت. بدین جهت چندگروه موش انتخاب شدند و به نیمی از آنها **mg/Lit** ۰/۵ رانیتیدین داده شد و نیمی از موشهای درمان شده و درمان نشده تحت **Gy/day** ۱ پرتو گاما بمدت سه روز قرار گرفتند. بعد موشها با بروسلا ملی‌تنسیس ضعیف شده ایمن شدند و بدنبال آن میزان پاسخ اختصاصی آنتی‌بادی سازی، ازدیاد حساسیت تأخیری وآزمون تکثیر لنفوسیتها انجام شد. نتایج نشان داد که رانیتیدین پاسخ ایمنی را در موشهای اشعه دیده افزایش داده و آنرا به حد موشهای اشعه ندیده رسانده است.

واژه‌های کلیدی: *پاسخ اختصاصی ایمنی، پرتو گاما، رانیتیدین، موشBALB/c ، رادیکالهای آزاد.*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اشعه گاما (۱-۲Gy) بصورت وابسته به دوز باعث مهار پاسخ ایمنی هومورال و پاسخ لنفوسیتهای T به میتوژن می‌شود (Sharetskii, 1998; Sun, 1995). حتی دوزهای خیلی پایین ۰/۰۲۴ Gy و ۰/۱۶۸و ۰/۳۳۶ باعث کاهش پاسخ ایمنی در موشهای DBA و (DBA× C57BL) F1 می‌شود (Malyzhev, 1993). اشعه گاما با افزایش رادیکالهای آزاد از جمله هیدروژن پراکسید (Takusa *et al.,* 1988) میزان Ca^{2+} آزاد سیتوپلاسمی را افزایش می‌دهد و درنتیجه پروتئین کیناز C را فعال می‌کند و در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شود (Unkun *et al.,* 1992). رادیکالهای آزاد محصول متابولیزم طبیعی بدن درطی‌فرآیند تولید انرژی در زنجیره انتقال الکترون هستند و یا بواسطه مواد خارجی مثل دما، اشعه X، γ و UV و فعالیت در برابر مواد خارجی در سلولهای بدن تولید می‌شوند (Pryor, 1982)،که با مکانیسمهای متفاوتی به بدن صدمه می‌زنند و باعث ایجاد بیماری و در نهایت مرگ می شوند (Corral-Debrinski, 1992; Machlin, 1987).

رانیتیدین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار قادر است که از تولید رادیکال آزاد هیدروکسیل ممانعت بعمل آورد (Lapenna, 1994) چون این دارو مشابه اکسی پیرازولوپیریمیدینها هستند احتمالاً مهار آنزیم گزانتین اکسیداز را باعث می‌شوند (Lapenna, 1994). این دارو در غلظت میکرومولار قادر است که تولید سوپر اکسید آنیون را مهار نمایند و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز را تحریک می‌کنند (Zimmerman & Millard, 1989). ازسوی دیگر رانیتیدین می‌تواند پاسخهای سلولهای سیستم ایمنی را نسبت به محرکهای میتوژنیک مانند LPS و PHA افزایش دهد (Mohrana, 2000). این گونه محرکها دارای اثر بسیار قوی روی سلول می‌باشند و قادر هستند که تقریباً تمامی رده‌های سلولی را در جهت تولید سیتوکینها و درنهایت تکثیر فعال سازد. درحالیکه پاسخ سیستم ایمنی به آنتی‌ژنها بسیار محدود می‌باشد و رده‌های معدودی از سلولهای ویژه آنتی‌ژن فعال می‌شود. تاکنون تاثیر رانیتیدین بر روی حفاظت از پاسخهای اختصاصی بررسی نشده بود. در این تحقیق تاثیر رانیتیدین بر سیستم ایمنی اختصاصی موشهایی که بطور کم اما طولانی مدت در معرض پرتوγ قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روشها

تمام مواد از شرکت سیگما (st.Louis, Mo USA) خریداری شده‌است.

www.SID.ir

Archive of SID

حیوان و نوع تغذیه

موش‌ماده BALB/c به سن ۸-۶ هفته از انستیتو رازی کرج خریداری گردید و بـه آنهـا غـذای معمولی(chow) داده شد. موش‌ها در گروههای پنج تایی دریک قفس شفاف با سرپوش میله‌ای استیل نگهداری‌گردید. دمای اتاق حیوانـات $^{\circ}C$۲۲-۲۰ و رطوبـت ثابـت بـود و دوره تـاریکی و روشنایی دوازده ساعته برای آنها فراهم گردید. بعد از سه هفته که موشها با وضع جدید تطـابق یافتند به دوگروه تقسیم شدند. موشهای گروه اول (۲۰ موش) از سه روز قبل از اشعه دهـی تـا پایان آزمایشها در آب مصرفیشان رانیتیدین به میزان صد میلی‌گرم در لیتر قـرار داده شـد. بـه گروه‌دوم گروه کنترل (۲۰ موش) آب معمولی داده شد.

پرتودهی

موشها در سازمان انرژی اتمی ایران تحت تأثیرپرتو گاما با استفاده از دستگاه گاما سل۲۲۰ قرار گرفتند. موشهایی که رانیتیدین دریافت کرده بودند (گروه اول) وگروه دوم یا کنترل هرکدام به دو دسته تقسیم شدند و یک دسته از گروه‌اول (۱۰ موش) ویک دسته ازگـروه دوم (۱۰ مـوش) بمدت سـه روز و هـر روز درمعـرض ۱Gyپرتـو γ باآهنـگ دز ۰/۱Gy/s پرتـوγ حاصـل از Co^{60} قرارگرفتند.

ایمنی زایی

از واکسـن Rev1 کـه حـاوی *Brucella mellitensis* ضـعیف شـده اسـت (تهیـه شـده از انستیتوواکسن و سرم‌سازی رازی کرج) برای ایمنی زایی استفاده گردید. پس ازپایان سـه روز اشـعه دهـی بـه موشـها، واکسـن‌مذکوربـه میـزان 5×10^{5} CFU/ml بـه داخـل صـفاق‌و یـا 1×10^{8}CFU/ml زیر جلدی در قاعده دم آنها تزریق شدو به ترتیب بعد ازگذشت ۴ هفته، پاسخ هومورال و یا دو هفته پاسخ سلولی موشها مورد بررسی قرار گرفت.

۱-پاسخ هومورال

آنتی بادی بر علیه بروسلا با روش Dot-Elisa مورد بررسی قرار گرفت.

روش Dot-Elisa: باکتری که در ۱٪ فورمالین فیکس شده بود را سه بار با بـافر فسـفات‌سـیلین pH=۷ شسته و سپس باکتری را به غلظت 10^{13} سلول درمیلی‌لیتر رسانده و حجم ۵ میکرولیتر از آنرا روی‌کاغذ نیتروسلولز که قـبلاً بـه صـورت دایـره‌هـای ۵ میلـی‌متـری بریـده شـده بـود (0.22µm pore size Millipore Inc Bedford, Mass) قرار داده تا کاملاً خشک شود. تمام مواد

www.SID.ir

Archive of SID

در بافر فسفات‌سیلین (PBS) حل شدند. هر دیسک حاوی آنتی‌ژن، در یک چاهک از پلیت‌های ۹۶ تایی ته صاف قرار داده‌شد. سپس ۱۰۰µl ازمحلول ۱ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در بافر PBS را در روی هر دیسک‌ریخته، تا مناطقی از سطح کاغذ نیتروسلولز که آنتی‌ژن به آن متصل نشده بود به این وسیله پوشیده شود. بعد از یکساعت، این محلول را خارج کرده و پلیت، سه بار با بافر(PBS % ۰/۰۵ Tween) شسته شد. سپس به مدت نیم‌ساعت ۱۰۰µl از سرم با رقتهای۱/۴و ۱/۸و ۱/۱۶و ۱/۳۲و ۱/۶۴و ۱/۱۲۸ را به هر چاهک اضافه کرده و نیم‌ساعت در$^{\circ}$C ۳۷ گذاشته شد. مجدداً سه بار پلیت را با بافر شستشو داده و۱۰۰µl از محلول 1/2000 رقیق شده‌آنتی‌بادی بزی ضد ایمنوگلوبولین M موشی (Goat anti- mouse IgM) رابه هر چاهک اضافه کرده و بمدت یکساعت در $^{\circ}$C ۳۷ نگهداری گردید. سپس‌پلیت را سه بار شستشو داده و بعد ۱۰۰µlاز محلول1/2000 رقیق شده آنتی‌بادی موشی ضد ایمنوگلوبولین بز (Mouse anti goat IgG) که باآنزیم هورس ردیش پراکسید از (HRP) کونژوگه شده بود به هرچاهک اضافه کرده و بمدت‌یکساعت در $^{\circ}$C ۳۷ قرار داده شد. و مجدداً سه بار شستشو داده شد و در چاهک ۱۰۰ µl از محلول۴-کلرو-۱- نفتول که به آن هیدروژن پراکسید۳۰٪ افزوده بودیم، اضافه‌گردید و بعد از ۲۰ دقیقه سوبسترا را خارج کرده و پلیت، با آب مقطر شسته شد. رنگهای آبی روی کاغذ نیترو سلولز که نشان دهنده وجود آنتی‌بادی بر علیه بروسلا در سرم بود، ظاهرگردید. در رقتهای مختلف، آخرین چاهکی که‌رنگ ایجاد کرده بود به عنوان تیتر آنتی‌بادی بر علیه بروسلا گزارش گردید.

۲- *پاسخ سلولی*

برای بررسی ایمنی سلولی، از دو روش پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری و آزمون تکثیر لنفوسیتها، استفاده‌شد.

ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH: (DTH، پاسخ اختصاصی سلولی را در بدن ارزیابی می‌کند (Paris *et al.,* 1998). این روش با اندازه‌گیری ضخامت کف پای موشها انجام شد. به این ترتیب که موشها سه روزدر معرض اشعه قرار گرفتند. سپس بطور زیر جلدی در قاعده دم آنها ^{8} ۱۰ عدد باکتری بروسلا ضعیف شده درحجم ۱۰۰µlتزریق شد و دو هفته بعد در کف پای راست موشها، ۵۰µl از آنتی ژن بروسلا (CFU ^{8}x۱۰ ۱) بطورزیر جلدی تزریق گردید. به عنوان کنترل منفی درکف پای چپ این موشها، ۵۰ µl ازPBS به اضافه فرمالین تزریق شد و ضخامت پاها بعد از ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت با کولیس اندازه‌گیری گردید. پاسخ ازدیاد حساسیت

www.SID.ir

Archive of SID

تاخیری بعد از ۲۴ ساعت بعنوان اندازه مطلق افزایش ضخامت پا برحسب میلی‌متر گزارش شد و درصد افزایش قطر پا از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{در صد افزایش قطر پا} = \frac{\text{ضخامت پای تزریق شده} - \text{ضخامت پای تزریق نشده}}{\text{ضخامت پای تزریق نشده}}$$

آزمون تکثیر لنفوسیتها (LTT): بعد از سه روز اشعه دهی‌به موشها، بطور زیر جلدی درقاعده دم آنها 10^8 باکتری بروسلا ضعیف شده به حجم ۱۰۰µl تزریق شد. دو هفته بعد طحال و غدد لنفاوی موشها خارج شد و لنفوسیتهای آن خارج گردید و در محیط کشت کامل [RPMI 1640 که حاوی L-گلوتامین (2mM)،پنی سیلین (۱۰۰۰۰۰ IU/L)، استرپتومایسین (۱۰۰ mg/L) و سرم جنین گاوی(FCS) (۱۰٪)] شسته شد و با استفاده از لایزین بافر گلبول‌های قرمز آن لیز گردید. مجدداً سه بار با محیط کشت کامل شسته و تعداد سلولها با استفاده از تریپان بلو شمارش شد و به تعداد 4×10^6 سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. ۱۰۰ µl از هر سوسپانسیون سلولی به صورت سه تایی به هر چاهک درمیکروپلیت‌های ۹۶ تایی ته صاف اضافه شد. سپس ۱۰۰ µl از آنتی‌ژن رقیق شده (10^6 باکتری بروسلای کشته شده) درمحیط‌کامل، یا ۱۰۰ µl محیط کامل کشت و یا ۱۰۰ µl از ۵µg/ml ، Con A به سه چاهک (بعنوان کنترل مثبت) از سلولها اضافه شد و بمدت ۵۴ ساعت درانکوباتور مرطوب$37^\circ C$ که حاوی ۵٪ CO_2 بود کشت داده شد. بعد ۱µCi از تایمیدین رادیواکتیو (Radiochemical Amersham, UK) به هر چاهک اضافه گردید و بعد از ۱۸ ساعت با جمع‌آوری سلولها توسط هاروستور اتوماتیک MASH (pharmacia) و به کشت خاتمه داده شد. نتایج برحسب اختلاف میان‌جذب تایمیدین توسط سلولهای تحریک شده با آنتی‌ژن و سلولهای تحریک نشده ارزیابی شد.

روشهای آماری

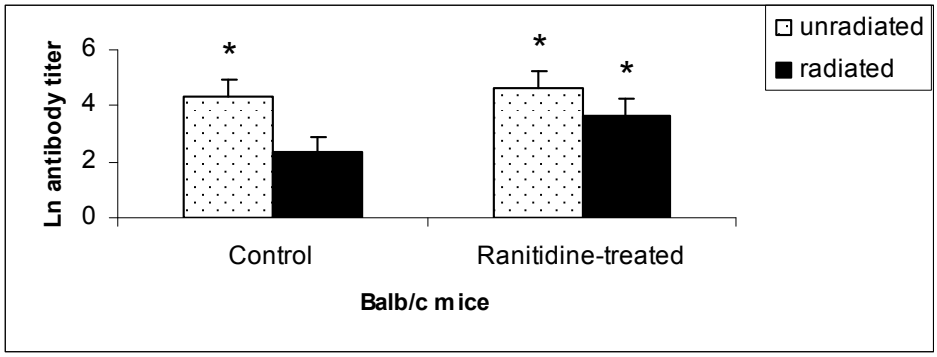
برای مقایسه نمونه‌ها از تست T یک دامنه با انحراف معیار نامساوی (نوع سوم) استفاده شد. درصورتی‌که اختلاف P value کمتر از ۰/۰۵ بود اختلاف معنی‌دار گزارش شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

نتایج پاسخ هومورال موشهایی که با واکسن بروسلاملی‌تنسیس (Rev-1) ایمن شده بودند در شکل۱ آمده است. اشعه بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) باعث کاهش تولید آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن بروسلا می‌شود درحالیکه رانیتیدین کاهش را جبران نموده و موشهایی که دارو دریافت کرده‌اند نسبت به کنترل اشعه ندیده اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند درصورتیکه با کنترل اشعه دیده اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵)را نشان می‌دهند.



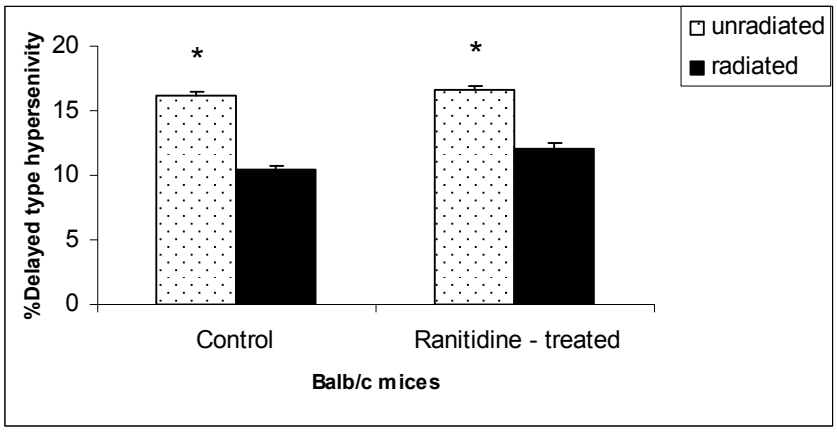
* اختلاف با کنترل اشعه معنی‌دار است(P<۰/۰۵)

شکل۱- تولید آنتی‌بادی در پاسخ به بروسلا در موشهای تیمار شده رانیتیدین بعد از پرتودهی به میزان ۱ گری بمدت سه روز

اشعه باعث کاهش پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری و تکثیر لنفوسیتها می‌شود و اختلاف بین کنترل اشعه دیده واشعه ندیده معنی‌دار (P<۰/۰۵) است (شکل ۲و۳). همچنین رانیتیدین قادر است که پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری را در موشهای اشعه دیده افزایش دهد، اما این اختلاف با کنترل اشعه دیده‌معنی‌دار نیست (شکل۲). درحالیکه رانیتیدین نسبت تکثیر لنفوسیتها را در موشهای اشعه دیده بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به کنترل اشعه دیده افزایش می‌دهد (شکل۳).

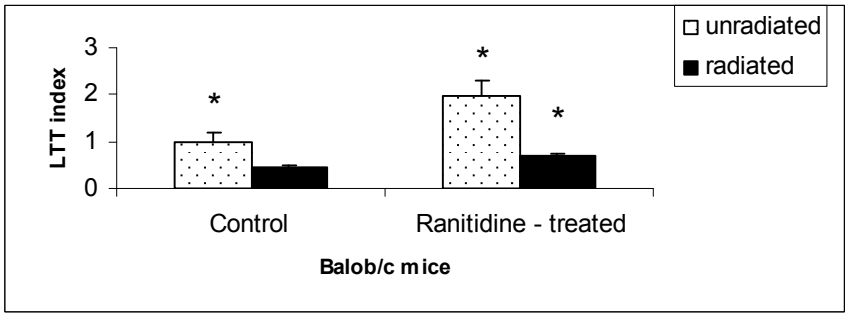
www.SID.ir

Archive of SID



* اختلاف با کنترل اشعه معنی‌دار است($P<0/05$)

شکل۲- پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به بروسلا در موشهای تیمار شده با رانیتیدین بعد از پرتودهی به میزان ۱ گری به مدت سه روز



* اختلاف با کنترل اشعه معنی‌دار است($P<0/05$)

شکل۳- نسبت ایندکس تکثیر لنفوسیتها در پاسخ به بروسلا

درمطالعه‌ای که با دوز کم اشعه گاما (۴CGy در روز برای ۵ روز درهفته یعنی کلاً ۲۰ CGy) نشان دادند که پاسخ تکثیر لنفوسیتهای T به میتوژن بستگی به گونه موش دارد. در موشهای LTT،C57BL/6 کاهش یافته است. درصورتیکه در موش LTT،BALB/c کاهش و DTH افزایش یافته است (Shankar, 1999) و یا در مطالعه‌ای نشان دادند که اشعه گاما با دوز sublethal در موش BALB/c باعث می‌شود که تعداد باکتری *Brucella abortus* بیماری‌زا در مقایسه با موش موش کنترل درکبد و طحال موشهای اشعه دیده تا دو یا سه هفته بعد از

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق باکتری تا ۱۰۰۰ مرتبه کمتر است و بعد از این تعداد باکتری در طحال این موشها افزایش می‌یابد و نشان دادند که فعالیت ماکروفاژها در هفته اول درموشهای اشعه دیده مخصوصاً آنها که آلوده با بروسلا آبرتوس شدند خیلی بیشتر است و پاسخ ایمنی این موشها در این فاصله زمانی خیلی مهار شده‌است (Elzer *et al.,* 1991). نتایج بررسی حاضر نیز با بررسی‌های فوق مطابقت دارد. تضعیف پاسخ DTH و هومورال احتمالاً به دلیل کاهش درتولید IL-4 و بروز ژن P۵۳ در موشهای BALB/c (Shankar *et al.*, 1999) و افزایش سلولهای مهاری (Malyzhev *et al.,* 1993) ذکرشده است. همچنین نشان دادندکه اشعه باعث پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش آنتی‌اکسیدانتهای ضروری بدن می‌شود (Neyfah *et al.,* 1998) و این مشکل بوسیله سلنیوم(Se) مرتفع و پاسخ لنفوسیتها به میتوژن و تولید IgG به حالت طبیعی باز می‌گردد (Sun *et al.,* 1995). در این مطالعه با افزودن رانیتیدین به آب‌خوراکی موشها میزان لیپید پراکسیداسیون سلولهای غشاء کاهش یافته (Ardestani *et al.,* 2004) و افزایش پاسخ ایمنی هومورال وسلولی مشاهده می‌شود که با نتایجی که از کار با سلینیوم بدست آوردند مطابقت دارد و شاید این فعالیت خود را رانیتیدین با مهار آنزیم دی‌آمین اکسیداز و آلکالین فسفاتاز (Metaye *et al.,* 1989) انجام دهد که منجر به اثر آنتی‌اکسیدانتی این دارو شود (Lapenna *et al.,* 1994; Zimmerman *et al.,* 1989). در این تحقیق اثرات حفاظتی رانیتیدین را بر روی تابش کم ولی دیر پای گاما نشان دادیم. این یافته‌ها، با یافته‌های قبلی روی دوزهای کوتاه ولی قوی گاما همخوانی دارد. از این رو مطالعه روی این دارو برای نشان دادن سازوکار آن می‌تواند مفید باشد.

References

Ardestani, S.K., Janlow, M.M., Kariminia, A., and Tavakoli, Z. (2004) *Effect of cimitidine and ranitidine on lipid profile and lipid peroxidation in γ-irradiated mice.* Acta Medica Iranica, **42(3)**,198-205.

Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T. and Wallace, D.C. (1992) *Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease*. Mutat. Res., **275**(3-6), 169-80.

Elzer, PH., Rowe, GE, Enright, FM., Winter, AJ. (1991) *Effects of gamma radiation and azathioprine on Brucella abortus infection in BALB/c mice*. Am. J. Vet.Res. **52**(6) 838-44.

Lapenna, D., Degioia, S., Mezzehi, A., grossi, L. (1994) *Blood cardioplegia reduces oxidant burden in the ischemic reprefused human mucardium*. Exp. J. Clin . invest. **24**, 471-479.

Machlin, L.J., and Bendich, A. (1987) *Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients*. FASEB, **1(6)**, 441-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Malyzhev, V.A., Pelevina, I.I., Afanasev, G.G., Gordienko, S.M., Gubrii, I.B., Klimenko, T.I., Lukashova, R.G., Petrova, I.V., Sergeeva, T.V. (1993) *Immune system status under effect of low levels of ionizing radiation:studies within the 10 kilometerzone of accident at chernobyl nuclear plant*. Radiats. Biol. Radioecol. **33(4)**, 470-8.

Metaye, T., Baudry, M., La and Iegeric, P. (1989) *Enhancement of mitogen-induced lymphocyte proliferation by some inhibitors of alkaline phosphatase and diamine oxidase*. Int. J. Immunopharmacol. **11(6)**, 629-36.

Moharana, A.K., Bhattacharya, S.K. (2000) *Possible role of histamine receptors in the central regulation of immune responses*. Indian. J. Physiol. Pharmacol., **44(2)** 153-60.

Neyfah, E.A., Alimbekova, A.I., and Ivaneko, G.F. (1998) *Radiation-induced lipid peroxidation stress in children coupled with deficient of essential antioxidants*. Biochemistry (Mosc) **63**, 977-987.

Paris, T.F., Silva, R.A., Smedegaaid, B., Appelberg, R. and Andersen, P., (1998) *Analysis of T cell recrited during delayed -type hypersensitivity to purified proteinderivative (PPD) versus challenge with tuberculosis infection*. Immunology, **95(1)**, 62–75.

Pryor, W.A., (1982) *Free radical in biology*, Xenobioties, cancer and aging, Ann NY Acad. Sci., **393**, 1-22..

Rabesandratana, H., Fournier, A.M., Chateau, M.T., Serre, A., Dornand, J. (1992) *Increased oxidative metabolism in PMA-activated lymphocytes: a flow cytometric study*. Int. J. Immunopharmacol. **14(5)**, 895-902.

Shankar, B., Premachandran, S., Bharambe, S.D., Sundaresan, P., Sainis, K.B. (1999) *Modification of immune response by low dose ionizing radiation*: *role of apoptosis*. Immunol. Lett. **68(2-3)**, 237-45.

Sharetskii, A.N., Surinove, B.P., Abramova, M.R. (1998) *separate and combine deffects of ionizing radiation and cyclosphamide on thymus-dependent humoral immune response.* Radiats. Biol. Radioecol**. 38(5)**, 696-700.

Sun, E., Xu, H., Liu, Q., Zhou, J., Zuo, P., Wang, J. (1995) *Effect of selenium in recovery of immunity damaged by H_2O_2 and 60 Co radiation*. Biol. Trace. Elem.Res. **48(3)**, 239-50.

Takusu, N., Komatsu, M., Aizawa, T., and Yamada, T. (1988) *Hydrogen peroxide generation in whole rat pancreatic islets*: Synergistic regulation by cytoplasmic free calcium and protein kinase C. Biochem. Biophys,. Res. Commun. **155**, 569-575.

Uckun, F.M., Tuel-Ahlgren, L., Song, C.W., Waddick, K., Myers, D.E., Kirihara, J., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L. (1992) *Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocyte precursors,triggering apoptosis and clonogenic cell death*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **89(19)**, 9005-9.

Zimmerman, J., and Millard, J., (1989) *H_2-receptor antagonist inhibition of human neutrophil superoxide anion synthesis*. Clin. Pharmacol. Ther., **45,** 487-94.

www.SID.ir