مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۹، شمارهٔ ۲، از ۱ تا ۱۲
تابستان ۱۳۸۵
Archive of SID

تولید نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در نوتروفیلها و منوسیتهای بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشرشیاکلی پیش و پس از مصرف آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین

جمال محمدی آینه‌ده[۱]، احمد زواران حسینی[۲*]

۱- دانش آموختهٔ کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد گروه ایمنی‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف: بررسی اثر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بر نوتروفیلها ومنوسیتهای بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشرشیا کولی پیش و پس از مصرف آنتی‌بیوتیک در تولید نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از این سلولها در محیط کشت.

مواد و روشها: تعداد ٤٥ بیمار خانم مبتلا به عفونت ادراری ناشی از اشرشیا کولی بین سنین ۱۸ تا ۵۰ سال انتخاب و سلولهای منوسیت و نوتروفیل این بیماران در دو مرحله، یکبار بلافاصله پس از تشخیص عفونت ادراری از طریق تست آنالیز ادراری و پیش از درمان و دیگری پس از درمان با یک دُز کامل سیپروفلوکساسین ۵۰۰ میلیگرمی جدا شدند، سپس با انکوباسیون و تیمار متفاوت ۱۸ ساعته با فعال‌کننده‌های اینترفرون گاما (IFN-γ) و LPS برای سلولهای منوسیت و ٦ ساعته باPMA برای نوتروفیلها (شرایط *ex vivo*) و همچنین فعال‌کننده‌های مذکور وآنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (شرایط *in vitro*) کشت داده شدند و مایع رویی کشت سلولی جدا شد و از آن برای اندازه‌گیری NO به روش کالریمتری گریس و H_2O_2 به روش فلورومتری استفاده گردید.

نتایج: نتایج *in vitro* و *ex vivo* نشان داد که میزان NO و H_2O_2 سلولهای منوسیت و نوتروفیل بیماران در دو گروه پیش از درمان و پس از آن در مقایسهٔ با نمونهٔ شاهد از افراد داوطلب سالم بیشتر است ($P<0/0001$) و تولید NO پس از درمان در مقایسه با پیش از درمان نیز افزایش داشته است ($P<0/0001$) ولی تولید H_2O_2 در گروههای پیش و پس از درمان، تغییرات معنی‌داری نداشته است ($P>0/05$).

نتیجه‌گیری: آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین علاوه بر فعالیت باکتریسیدال خود قادر است روی سیستم ایمنی اثر گذاشته و باعث افزایش تولید نیتریک اکساید شود. بنابراین مصرف آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در بیماران، موجب افزایش مقدار نیتریک اکساید (NO) شده ولی روی مقادیر پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) تأثیری ندارد. ضمناً نتایج *in vitro* نشان می‌دهد که این افزایش فقط در داخل بدن صورت گرفته و در *in vitro* که مقایسهٔ درون‌گروهی هریک از گروههاست، دیده نمی‌شود.

کلید واژگان: نیتریک اکساید، پراکسید هیدروژن، سیپروفلوکساسین، عفونت دستگاه ادراری، نوتروفیل و منوسیت.

۱- مقدمه

در سالهای اخیر توجه زیادی به اثر آنتی‌بیوتیکها روی سیستم ایمنی شده و نشان داده است که آنتی‌بیوتیکها آثار مختلفی بر سیستم ایمنی دارند [۱ - ۱۰]. سیستم ایمنی دارای مکانیزمهای مختلفی برای دفاع در برابر عوامل مهاجم بوده که یکی از این

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ۳۰۹۰
E-mail: Zavarana@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مکانیزمها، ایمنی ذاتی است که در واقع اهمیت ایمنی اکتسابی هم به نوعی تقویت اثر ایمنی ذاتی است و یکی از عوامل اصلی آن سلولهای بیگانه‌خوار (فاگوسیتها) هستند که در دفاع علیه عوامل مهاجم نقش اصلی را برعهده دارند [۱۱] دو گروه اصلی این سلولها، گرانولوسیتهای نوتروفیلی چند هسته‌ای و فاگوسیتهای تک هسته‌ای هستند [۱۲، ۱۳]. نوتروفیلها سلولهای چند هسته‌ای با نیمه عمر کوتاهند وتوانایی فوق العاده‌ای در سازگاری برابر عوامل و سیگنالهای مختلف محیطی دارند که از طریق افزایش و یا کاهش تنظیم گیرنده‌ها به آنها پاسخ داده و همچنین پروتئین‌های ترشحی نظیر سایتوکاین‌ها را سنتز و ترشح می‌کنند و قادرند عملکرد خود و حتی سلولهای دیگر نظیر لنفوسیت‌ها، پلاکتها و منوسیتها را نیز تنظیم کنند [۱٤]. منوسیتها و ماکروفاژها جزو سیستم فاگوسیتهای تک هسته‌ای هستند [۱۵] فاگوسیتهای تک هسته‌ای در مقایسه با نوتروفیلها نیمه عمر طولانیتری دارند و به بسیاری از عوامل و سیگنالهای محیطی حساسند [۱٦]. منوسیتها و نوتروفیلها از استراتژیهای مشابهی برای کنترل تهاجم میکروبی استفاده می‌کنند؛ ولی نوتروفیلهای چند هسته‌ای به مراتب سیستم دفاع ضد میکروبی قویتری بخصوص در تولید عوامل اکسیژنی دارند [۱۷] به‌علاوه محصولات ترشحی فاگوسیتها در دفاع علیه میکروارگانیسمها، عواقب وخیمی برای بدن داشته و باعث تخریب بافتهای میزبان می‌شوند [۱۸].

یکی از مکانیزمهای انتقال سیگنال در فاگوسیتها، که به تولید رادیکال آزاد منجر می‌شود، سیستم اکسیداز فاگوسیتی است که این سیستم دارای آنزیم اکسیداز فاگوسیتی بوده که از چندین زیر واحد تشکیل شده و در غشای پلاسمایی و غشای فاگولیزوزمی فاگوسیتهای فعال یافت می‌شود و عمل آن احیای اکسیژن ملکولی و تبدیل آن به واسطه‌های فعال اکسیژن (ROIs) نظیر سوپراکساید است و دیسموتاسیون آنزیمی آن به تولید پراکسید هیدروژن منجر می‌شود که این فرایند تولید (ROIs) را *انفجار تنفسی* گویند [۱۹]. علاوه براین فاگوسیتها دارای دومین سیستم تولید رادیکال آزاد می‌باشند که آنزیم آن نیتریک اکساید سنتاز بوده که یک آنزیم سیتوزولی است. سه ژن مسؤول تولید سه نوع آنزیم نیتریک اکساید سنتاز می‌باشند که در سلولهای مختلف بیان می‌شوند و آنزیم تولید شده در فاگوسیتها نوع قابل القای آن، یعنی نیتریک اکساید سنتاز نوع II یا قابل القا (NOS_2 یا iNOS) می‌باشد که در فاگوسیتهای در حال استراحت وجود ندارد و پس از تحریک، تولید آن القا می‌شود [۲۰]. فعال شدن ماکروفاژها به‌وسیلهٔ سایتوکاینها به تولید واسطه‌های فعال اکسیژن (ROIs) و واسطه‌های فعال نیتروژن (RNIs) منجر می‌شوند که فعالیتهای ضد میکروبی بالقوه دارند. تیمار سلولهای آلوده و ماکروفاژهای اولیه با اینترفرون گاما به تولید فزاینده نیتریک اکساید (NO) و هیدروژن پراکساید (H_2O_2) منجر می‌شود. تحریک اینترفرون گاما به فعال شدن NADPH oxidase و iNOS منجر می‌گردد [۲۱]. بنابراین آنزیمهای تولیدکنندهٔ آنها، القاپذیراست. بتازگی تولید NO را در نوتروفیلها بررسی کرده و داشته‌اند که نوتروفیلها قادرند پس از تحریک به‌وسیلهٔ برخی از محرکها، نظیر PMA (فربول میریستات استات) که یک محرک مستقیم پروتئین کنیاز C می‌باشد NO تولید کنند که تولید آن به‌وسیلهٔ مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) مثل N^G منومتیل – ال – آرژینین مهار می‌شود [۲۲]. به‌علاوه اینترفرون گاما mRNA ی این آنزیم NOS_2 را پایدار می‌کند و IL-۱ و IL-۲ نیز توانایی القای آن را دارند [۲۳]. رادیکالهای آزاد از جمله پراکسید هیدروژن مواد سمی با اهداف تجزیه غشاهای سلولی از جمله غشای پلاسمایی و غشای ارگانلهای داخل سلولی، تجزیهٔ اجزای ریبوزومی، تغییر ماهیت پروتئینها و آسیب به DNA سلولی هستند. فاگوسیتها بخصوص نوتروفیلها پس از فعال شدن در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن به‌وسیلهٔ سیستم انفجار تنفسی بسیار کارامد هستند و در این سلولها واسطه‌های فعال اکسیژن (ROS) تقریباً به‌طور انحصاری به‌وسیلهٔ NADPH اکسیداز متعلق به خانواده پروتئینهای NOX تولید می‌شوند [۲٤].

عفونت دستگاه ادراری (UTI) عفونتی شایع در دنیاست. این عفونت وقتی ایجاد می‌شود که باکتری وارد دستگاه ادراری شده و تکثیر یابد. زنان در ابتلا به این نوع عفونت مستعدتر از مردان هستند. این عفونت به دو دسته تقسیم می‌شود:

الف – عفونت دستگاه ادراری غیر پیچیده (u UTI)؛

ب – عفونت دستگاه ادراری پیچیده (c UTI).

علت بیش از ۸۰ درصد موارد ابتلا به عفونت uUTI یک باکتری از گروه باکتریهای انتر و باکتری اسه به‌نام اشرشیاکولی (E.coli) است [۲۵]. درمان آنتی‌بیوتیکی کوتاه مدت برای بیماران سرپایی با عفونت uUTI بسیار مؤثر می‌باشد. فلوروکینولونها فعالیت بسیار کارامدی علیه طیف وسیعی از پاتوژنهای در ارتباط با عفونت ادراری دارند و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به‌دلیل مقاومت کمتر باکتریها به آن انتخابی بسیار مناسب برای این موارد است [۲٦]. این آنتی‌بیوتیک جذب خوب و سریعی از دستگاه گوارش و نفوذ بسیار بالایی در داخل سلولهای فاگوسیت دارد [۲۷] اوج غلظت پلاسمایی آن ۱ تا ۲

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت پس از تجویز یک دُز ۵۰۰ میلی‌گرمی خوراکی در حدود ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر است. نیمه عمر آن حدود ۳/۵ تا ٤/٥ ساعت است. در عفونتهای ادراری خفیف تا متوسط ۵۰۰ mg/day خوراکی (معادل ٤۰۰mg/day فرم وریدی) در دو دُز منقسم روزانه به‌مدت ۳ تا ۵ روز تجویز می‌شود. نوتروفیلها حداقل دو مکانیسم قابل اشباع برای جذب این دارو دارند [۲۸]. شایعترین عوارض جانبی ناشی از مصرف سیپروفلوکساسین عوارض گوارشی و دستگاه عصبی مرکزی می‌باشد [۲۹]. سیپروفلوکساسین پایین‌ترین MIC را در بین فلوروکینولونها دارد (۰/۵ میکروگرم) و سطوح درمانی این دارو در پلاسما تقریباً چهار برابر آن (۲ میکروگرم) است [۳۰] عوامل ضد باکتریایی نفوذکننده در داخل سلولها نظیر کینولونها و ماکرولیدها می‌توانند با تقویت مکانیزمهای باکتری‌کشی برخی بتالاکتام‌ها مثل سفوتاکسین[1] و سفاکلور[2] و کلوفازیمین[3] باعث افزایش فعالیتهای فاگوسیتی می‌شوند. آنتی‌بیوتیکهای متعددی نظیر برخی ماکرولیدها، آنساماسین‌ها[4]، آمینو گلیکوزیدها[5] و ایزونیازید[6] و غیره می‌توانند باعث کاهش پاسخ فاگوسیتی شوند و برخی صفات ضد التهابی را نشان دهند [٦].

تغییر عملکردهای فاگوسیتی به‌وسیلهٔ عوامل ضد باکتریایی، بایستی در بیماریهای عفونی و غیر عفونی در نظر گرفته شود و تغییر در عملکرد فاگوسیتی در سه گروه اصلی شامل آثار سمی آنها روی فاگوسیتها و پیشسازهای آنها (به‌صورت مستقیم یا وابسته به ایمنی)، ایجاد تغییرات روی باکتریها و عوامل بیماریزایی آنها و تغییر در اهداف سلولی درگیر در مسیرهای انتقال سیگنال طبقه بندی می‌شوند [۳۱]. برای مثال در مورد انجام پیوند، برای جلوگیری از رد پیوند به‌وسیلهٔ سیستم ایمنی و همچنین جلوگیری از تهاجم میکروارگانیسمهای فرصت‌طلب در پی سرکوب ایمنی، به‌ترتیب داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی و آنتی‌بیوتیکهای با طیف اثر وسیع تجویز می‌شود. بنابراین استفاده از آنتی‌بیوتیکی که هر دو اثر را یکجا داشته باشد و از طرفی اثر داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی را خنثی نکند بسیار مفید و مقرون به صرفه خواهد بود.

از آنجا که برخی داروها در حالت طبیعی غیر فعالند و پس از ورود به بدن و اثر آنزیمهای مختلف روی آنها، فعال شده، آثار درمانی دارند، در این مطالعه سلولهای منوسیت و نوتروفیل بیماران مبتلا به عفونت ادراری ناشی از اشرشیا کولی جدا شد و اثر سیپروفلوکساسین در تولید نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) پس از تجویز پزشک معالج، در دو مرحله پیش و پس از درمان و همچنین در محیط کشت ارزیابی شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- نمونه‌گیری خون وریدی

تحت نظر پزشک معالج از ٤۵ بیمارخانم مبتلا به عفونت ادراری به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی پس از طی مراحل زیر جمع‌آوری شد. پس از تجویز آزمایشات اولیه (تست آنالیز ادراری U/A و کشت ادرار U/C) به‌وسیلهٔ پزشک معالج مبنی بر احتمال وجود عفونت ادراری، ابتدا تست آنالیز ادراری انجام شد و موارد احتمالی ابتلا به عفونت ادراری ناشی از اشرشیا کولی، از طریق مشاهدهٔ میکروسکوپیک لکوسیتها و باکتریهای موجود در سدیمان ادراری، جدا شده و برای حذف عفونتهای با عوامل غیر گروه انتروباکتریاسه، با استفاده از نوار ادرار، فقط بیمارانی که در ادرار آنها وجود نیتریت مشاهده می‌شد، برای انجام مراحل بعدی تحقیق انتخاب شدند. زیرا باکتریهای گروه انتروباکتری‌اسه و در نتیجهٔ اشرشیا کولی باعث تبدیل نیترات به نیتریت می‌شوند که با نوار ادرار قابل مشاهده است؛ بنابراین با این کار پس از حدود ۱۰ دقیقه از ورود بیمار به آزمایشگاه، بیماران مورد نظر تحقیق انتخاب شده و از آنها نمونه‌گیری اولیهٔ خون وریدی به‌عمل آمد و بقیهٔ بیماران از چرخهٔ تحقیق حذف شدند. پس از انجام کشت ادرار و انکوباسیون ٢٤ ساعته آن موارد عفونتهای ناشی از اشرشیاکلی پس از انجام تستهای افتراقی و آنتی بیوگرام انتخاب و موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین و عفونتهای با عامل غیر اشرشیاکلی از چرخهٔ تحقیق حذف و فقط بیماران مبتلا به عفونت ادراری ناشی از باکتری اشرشیا کلی و حساس به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برای ادامهٔ تحقیق انتخاب شدند.

از بیماران یکبار پس از ورود به آزمایشگاه و انجام تست U/A و U/C نمونه‌گیری خون محیطی به‌عمل آمد و بار دیگر طبق برنامه‌ریزی و هماهنگی به‌عمل آمده با پزشک مربوطه و تجویز آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (اولین انتخاب آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت ادراری) که در همه موارد از نوع ۵۰۰mg آن و با دُز درمانی هر دوازده ساعت یک قرص و به مدت ۵ روز استفاده شد، ساعاتی پس از مصرف آخرین قرص از بیمار تست U/A و U/C به‌عمل آمده و در صورت بهبودی کامل (عدم

1. Cefotaxime
2. Cefaclor
3. Clofazimine
4. Ansamycins
5. Aminoglyco sides
6. Isoniazid

www.SID.ir

Archive of SID

وجود WBC و باکتری در سدیمان ادراری) مجدداً نمونه‌گیری خون محیطی انجام می‌شد و در هر مرحله چه قبل از مصرف آنتی‌بیوتیک و چه بعد از آن، مقداری از خون محیطی برای انجام تستهای CBC و بقیهٔ تستهای طراحی شده در پرسشنامه، استفاده می‌شد.

۲-۲- جداسازی سلولهای تک هسته‌ای از خون محیطی

۵ میلی‌لیتر خون محیطی به نسبت یک به یک با بافر هنکس[1] مخلوط شد و سپس خون رقیق شده به نسبت ۵ میلی‌لیتر به ۳ میلی‌لیتر با فایکول به‌آرامی و به‌طوری‌که با فایکول مخلوط نشود بر روی فایکول ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در g ٤۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از ۳۰ دقیقه عناصر خونی در چند لایهٔ مختلف در لوله جایگزین شدند که سلولهای منونکلئر بین فایکول و پلاسما قرار می‌گیرند. لایهٔ منونوکلئر با دقت و به‌وسیلهٔ پیپت پاستور استریل جدا شده و در لوله‌های استریل در پیچ‌دار ۱۵ میلی‌لیتری سه بار شستشو شدند، در شستشو هر بار ٤ تا ۵ میلی‌لیتر بافر هنکس روی سلولها اضافه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در g ٤۰۰ سانتریفوژ و در بار سوم علاوه بر بافر هنکس، یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI اضافه شده تا درصد زنده بودن سلولها حفظ شود و دوباره سانتریفیوژ شدند. پس از آخرین شستشو و دور ریختن محلول رویی به سلولهای منونوکلئر ته لوله یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و به تعداد ۱×۱۰^{٦} سلول در میلی‌لیتر رسانده و گلبولهای قرمز آن لیز شد و درصد زنده بودن سلولهای معلق تعیین گردید [۳۲].

۲-۳- روش جداسازی نوتروفیل

برای این منظور از روش بایوم[2] استفاده شد [۳۳-۳۵]. به طور خلاصه ۵ میلی‌لیتر خون انسانی را در داخل لوله ۱۵ میلی‌لیتری، که حاوی هپارین به مقدار IU ۵۰ (به‌ازای هر میلی‌لیتر خون ۱۰IU) می‌باشد، اضافه شد [۳٦]. سپس ۵ میلی‌لیتر دکستران ٦ درصد را به خون کامل در لوله اضافه و به آرامی مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در دمای ^{oC} ۳۷ قرار دادیم. مایع رویی، که غنی از گلبول سفید بود، را به آرامی در لولهٔ دیگر که حاوی ۳ میلی‌لیتر فایکول بود افزوده و در دور ۲۵۰۰ به‌مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ کردیم. مایع رویی حاوی پلاسما – فایکول و لایهٔ گلبولهای تک هسته‌ای را دور ریخته و رسوب، که حاوی نوتروفیل و تعداد کمی گلبول قرمز بود، را با محلول کلرید آمونیوم ۰/۸ درصد مجاور نموده و گلبولهای قرمز آن لیز گردید. سپس لوله با محیط کشت RPMI–۱٦٤۰ پر نموده و در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. نوتروفیلها را ۲ بار با محیط کشت RPMI–۱٦٤۰ شستشو داده و در حجم یک میلی‌لیتر تعداد سلولها را شمارش کرده و به تعداد ۲×۱۰^{٦} سلول در میلی‌لیتر رساندیم. در پایان درصد زنده ماندن سلولها را با رنگ تریپان بلو ۰/۲ درصد تعیین کردیم.

۲-٤- تهیهٔ رقت مناسب سیپروفلوکساسین برای استفاده در محیط کشت

فرم تزریقی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین محتوی ۲۰۰ mg/dl آنتی‌بیوتیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر است. بنابراین در هر میلی‌لیتر از این محلول ۲۰۰۰ µg/ml از آنتی‌بیوتیک وجود دارد و با توجه به این‌که سیپروفلوکساسین جذب خوب و سریعی از دستگاه گوارش دارد و اوج غلظت پلاسمایی آن ۱ تا ۲ ساعت پس از تجویز یک دور ۵۰۰ میلی‌گرمی خوراکی در حدود ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، برای رسیدن به غلظت مذکور از فرم تزریقی آن (۲۰۰ mg/dl) مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته و در ۹۵۰ میکرولیتر بافر PBS حل نموده و از محلول حاصل ۵ میکرولیتر در هر چاهک که حاوی ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت بود، اضافه کردیم.

۲-۵- کشت منوسیتها و نوتروفیلها

سلولهای منونوکلئر در ده چاهک کشت سلول ریخته شد که دو به دو مشابه بودند و سپس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ^{oC} ۳۷ حاوی ۵٪ CO_2 نگهداری شد که با استفاده از خاصیت اتصال منوسیتها به کف چاهک، منوسیتها از لنفوسیتها جدا شدند که این عمل با برداشتن مایع‌رویی پس از ۲ ساعت که محتوی لنفوسیتهای شناور بود، انجام شد. پس از شستشوی چاهکها، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI اضافه و سپس در جفت چاهک اول فقط سلولهای منوسیت و در جفت چاهک دوم منوسیت و اینترفرون گاما (۱۰۰IU IFN-γ/ml) و در جفت چاهک سوم منوسیت، (IFN-γ) و ۱۰ میکرگرم در میلی‌لیتر LPS و در جفت چاهک چهارم منوسیت، (IFN-γ) و LPS و مهار کنندهٔ آمینوگوانیدین (AG) ۱ میلی مولار و در

1. Hanks
2. Boyum

www.SID.ir

Archive of SID

جفت چاهک پنجم منوسیت و اینترفرون گاما (IFN-γ) و LPS و۲ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و در انتها حجم هر چاهک با افزودن محیط کشت RPMI به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس اینکوباسیون ۱۸ ساعته در اینکوباتور CO_2 دار ^{oC} ۳۷ انجام شد.

سلولهای نوتروفیل در شش چاهک کشت سلول ریخته شد که دو به دو مشابه بودند در جفت چاهک اول فقط سلولهای نوتروفیل و در جفت چاهک دوم سلولهای نوتروفیل وPMA (به‌عنوان فعال کننده) و در جفت چاهک سوم سلولهای نوتروفیل، PMA و۲ میکروگرم در میلی‌لیتر سیپروفلوکساسین تیمار شد سپس سلولهای کشت شده به‌مدت ٦ ساعت در انکوباتور CO_2 دار ^{oC} ۳۷ نگهداری شدند و در نهایت، مایع‌رویی کشت سلولی در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تا زمان اندازه‌گیری NO و H_2O_2 در فریز ^{oC} ۲۰ – نگهداری شدند.

۲-٦- اندازه‌گیری H_2O_2

برای تشخیص فعالیت سلولهای مذکور می‌توان مقدار تولید H_2O_2 را اندازه‌گیری کرد. در این مطالعه از روش والتر راچ[1] و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شده است [۳۷] در این آزمایش از هموانیلیک اسید به فرمول C9H10O4 و M=۱۸۲/۱۸g/mol (غلظت ۱۰۰ میکرومول در بافر هنکس) از شرکت مرک[2] و هورس رادیش پراکسیداز نوع ۱۲[3] غلظتی معادل یک واحد در میلی‌لیتر (۱IU/ml) از شرکت سیگما استفاده شد. که واکنش هموانیلیک اسید و H_2O_2 تحت اثر آنزیم HRP باعث تولید فلئورسانس می‌شود و ارتباط خطی بین مقدار H_2O_2 و شدت فلئورسانس ایجاد شده[4] با رسم منحنی استاندارد بین رقتهای nmol ۰/۲ تا ۵۱/۲ به‌دست آمد. برای مطالعه شدت واکنش و تولید فلئورسانس از دستگاه اسپکترو فلورومتر *SHIMADZU – RF ۵۰۰۰* استفاده شد.

برای یافتن طول موج جذبی و طول موج نشری از دو لوله استاندارد استفاده گردید که به ترتیب عبارت بودند از EM=٤۲۰/۸nm و EX=۳۱۵nm و سپس تمام نمونه‌ها با طول موجهای به‌دست آمده، خوانده شدند. چهار مرتبه لوله‌های استاندارد با رقتهای مختلف تهیه شد و در پنجمین مرتبه منحنی استاندارد مناسب به‌دست آمد. سپس فلوئورسانس نمونه به‌وسیلهٔ دستگاه خوانده شد و از روی منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن نمونه به‌دست آمد.

۲-۷- روش کار برای اندازه‌گیری نیتریک اکساید

مایع‌رویی کشتهای سلولی نوتروفیل و منوسیتی، که قبلاً جمع‌آوری و در فریزر ^{oC} ۲۰ – نگهداری شده بود، را در دمای اتاق قرار داده و سپس تمام میکروتیوب‌های حاوی محیط‌رویی کشت سلولی را یک دقیقه در دور (۲۵۰ g) سانتریفوژ کردیم. سپس از غلظتهای استاندارد و نمونه‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر در چاهکهای میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای ته تخت ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف گریس (به فرمول نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید ۰/۱ درصد در آب مقطر وسولفانیل آمید یک درصد در اسید فسفریک ۵ درصد) را به آنها اضافه نموده، پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، طیفی از رنگهای ارغوانی با شدتهای مختلف براساس میزان نیتریت موجود در آنها ایجاد شد که با طول موج ٥٤۰ نانومتر و فیلتر مرجع ٦۳۰ نانومتر میزان جذب (OD) خوانده شد [۳۸ ، ۳۹]. سپس منحنی استاندارد براساس غلظتهای نیتریت سدیم ترسیم گردید و با استفاده از خط رگرسیون و معادلهٔ خطی غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها با استفاده از عدد جذب (OD) آنها محاسبه و به‌صورت میکرومولار نیتریت بیان شد.

۲-۸- محاسبات آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، برای مقایسهٔ سه گروه قبل و بعد از درمان و گروه کنترل با یکدیگر از آزمون غیر پارامتری کروسکال والیس[5] و همچنین مقایسهٔ گروه کنترل با بیماران گروههای پیش و پس از درمان و نیز مقایسهٔ گروه پیش از درمان با گروه پس از درمان با یکدیگر از آزمون غیر پارامتری من ویتنی[6] استفاده شد و در صورت P<۰/۰۵ تفاوت معنادار در نظر گرفته شد و همچنین از بسته‌های نرم‌افزاری SPSS ویرایش ۱۳ برای محاسبات آماری ذکر شده و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد.

۳- نتایج

مطابق کشت منوسیتها و نوتروفیلها، سنجش نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در گروه پیش و پس از درمان و گروه کنترل انجام شد و مقایسه این سه گروه با یکدیگر

1. Walter.R
2. Marck
3. (horseradish peroxidase type XII) HRP
4. Fluorescence Intensity
5. Kruskal Wallis
6. Mann –Whitney

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داد که از لحاظ آماری با یکدیگر متفاوت هستند (P<۰/۰۰۰۱). منوسیتها و نوتروفیلهای بیماران بیشترین مقدار نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و گروه کنترل کمترین مقدار آن را تولید کرده‌اند.

۳-۱- مقایسه غلظت NO و H_2O_2 در چاهکهای مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل

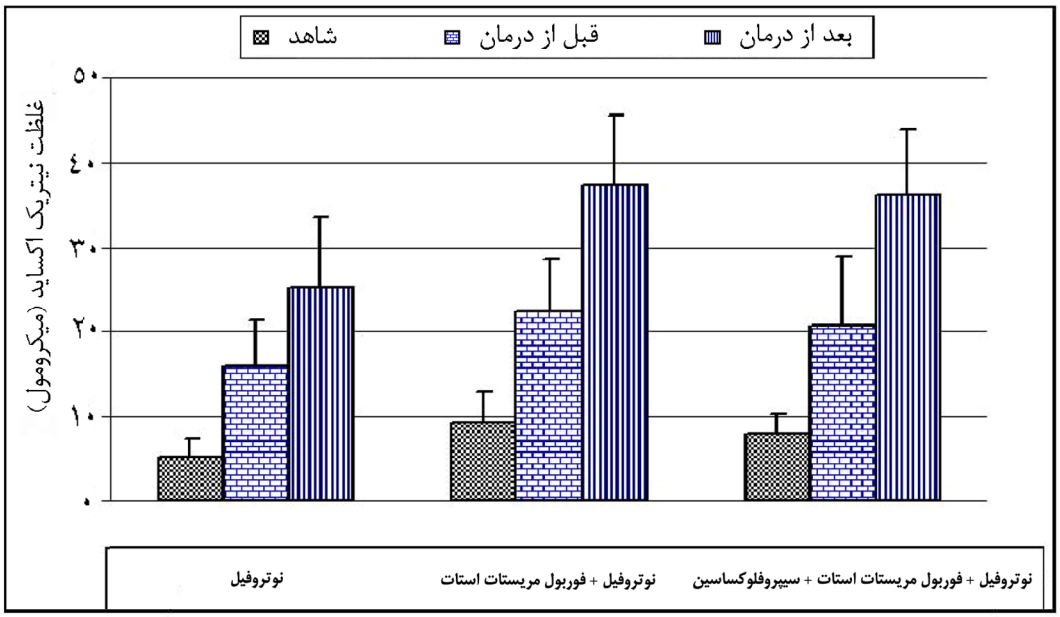
در هر سه گروه (قبل و بعد از درمان و کنترل)، سلولهای نوتروفیل جدا و در سه دسته چاهک دوتایی کشت شدند که در اینجا چاهکهای مشابه در هر گروه با یکدیگر مقایسه شدند و مقایسه مقدار NO در هر سه گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل نشان داد که مقدار آن در گروه پیش از درمان و پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است(P<۰/۰۵). همچنین غلظت آن در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان بالاتر است (P<۰/۰۵) (نمودار ۱).

مقایسه مقدار H_2O_2 سه گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل نشان داد که مقدار آن در گروه پیش از درمان و پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است (P<۰/۰۵). اما اختلاف معنی‌داری در مقدار H_2O_2 در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان وجود ندارد (P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

۳-۲- مقایسه غلظت NO و H_2O_2 در چاهکهای مربوط به کشت سلولهای منوسیت

در هر یک از سه گروه (پیش و پس از درمان و کنترل) سلولهای منوسیت جدا و در پنج دسته چاهک دوتایی کشت شدند که چاهکهای مشابه در هر گروه با یکدیگر مقایسه شدند. مقایسهٔ مقدار NO در هر پنج گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای منوسیت نشان داد که مقدار آن در گروه پیش از درمان و پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل بالاتراست (P<۰/۰۵). همچنین غلظت آن در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان بالاتر است (P<۰/۰۵) (نمودار ۳).

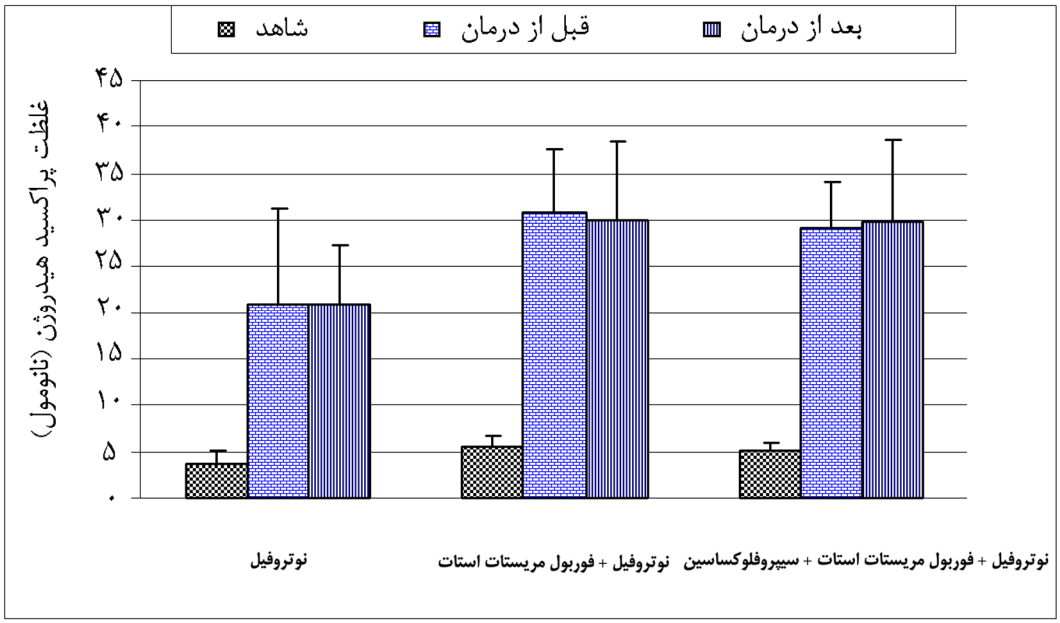
مقایسه مقدار H_2O_2 در پنج گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای منوسیت نشان داد که مقدار آن در گروه پیش از درمان و پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است (P<۰/۰۵). اما اختلاف معنی‌داری در مقدار H_2O_2 در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان وجود ندارد (P<۰/۰۵) (جدول ۱).



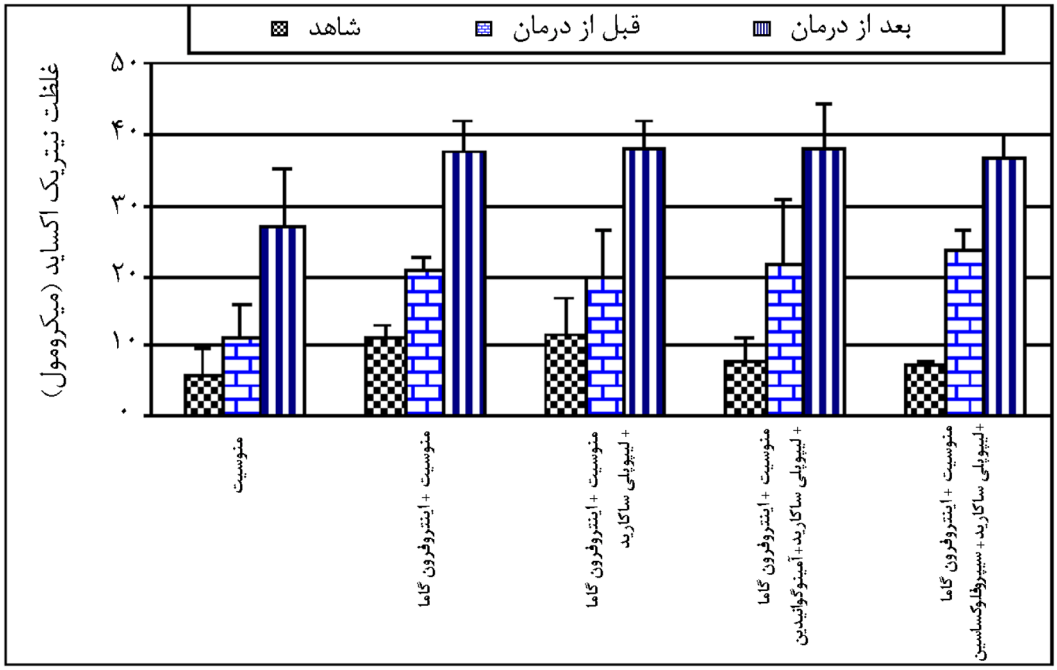
نمودار ۱ مقایسه غلظت نیتریک اکساید (بر حسب میکرومول) در چاهکهای مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲ مقایسه غلظت H_2O_2 (بر حسب نانومول) در چاهکهای مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل



نمودار ۳ مقایسه غلظت نیتریک اکساید (بر حسب میکرومول) در چاهکهای مربوط به کشت سلولهای منوسیت

جدول ۱ مقدار H_2O_2 (بر حسب نانومول) در پنج گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای منوسیت

چاهک	شاهد	قبل از درمان	بعد از درمان
منوسیت	۷ ± ۱/۹	۱۸/۸۵ ± ٤/٤	۱۸/۰۵ ± ۳/۳
منوسیت + اینتروفرون گاما	۷/۲ ± ۱/۸	۳۰ ± ٦/٦	۲۹/۱۱ ± ٤/۹
منوسیت + اینتروفرون گاما + لیپوپلی ساکارید	۷/۹ ± ۲	۲۹/۲ ± ۷/٤	۲۹/۵۸ ± ٦/۲
منوسیت + اینتروفرون گاما + لیپوپلی ساکارید + آمینوگوانیدین	۷/۷ ± ۰/۹	۲۹/۱۷ ± ۸/۱	۲۹/۷ ± ٦/۸
منوسیت + اینتروفرون گاما + لیپوپلی ساکارید + سیپروفلوکساسین	۷/٤۵ ± ۳/۱	۲۸/۹۲ ± ۱/۹	۳۰/۱۱ ± ٤/۸

www.SID.ir

Archive of SID

۳-۳- نتایج مقایسه درون‌گروهی گروههای پیش از درمان و پس از درمان و گروه کنترل با یکدیگر در نوتروفیلها و منوسیتها

نتایج *in vitro* که در واقع نتایج حاصل از اثر سیپروفلوکساسین روی سلولهای منوسیت و نوتروفیل در محیط کشت می‌باشد از درون هر گروه به‌صورت مجزا به‌دست آمده است که به‌صورت مقایسهٔ درون‌گروهی غلظت NO و H_2O_2 در چاهکهای حاوی سلولهای نوتروفیل و منوسیت با چاهکهای مشابه همراه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین انجام شده که به‌صورت زیر است.

۳-۳-۱- نوتروفیلها

غلظت NO (بر حسب میکرومول) در نوتروفیلها در چاهکهای حاوی سلولهای نوتروفیل و PMA (جفت چاهک دوم) و چاهکهای مشابه همراه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (جفت چاهک سوم) در گروه پیش از درمان به‌ترتیب (٦/٤ ± ٢٢/١٨) و (٨/٣ ± ٢٠/٦٨) و در گروه بعد از درمان به‌ترتیب (٨/٢ ± ٣٧/٣٩) و (٧/٧ ± ٣٦/٤٢) و در گروه کنترل به‌ترتیب (٣/٨ ± ٨/٢) و (٢/٢ ± ٩/١) به‌دست آمده است که مقایسهٔ درون‌گروهی این چاهکهای مشابه نشان می‌دهد که مقدار غلظت NO افزایش نیافته است ($P>0/05$). غلظت H_2O_2 (بر حسب نانومول) در گروه قبل از درمان به‌ترتیب (٦/٨ ± ٣٠/٨٥) و (٤/٨ ± ٢٩/٢٥) و درگروه بعد از درمان به‌ترتیب (٨/٤ ± ٣٠/١) و (٩ ± ٢٩/٧) و در گروه کنترل به‌ترتیب (١/١ ± ٥/٦) و (٠/٩ ± ٥/١١) به‌دست آمده است که مقایسهٔ درون گروهی آنها نشان می‌دهد که افزایشی در مقدار غلظت H_2O_2 (بر حسب نانومول) نیز مشاهده نمی‌شود ($P>0/05$).

۳-۳-۲- منوسیتها

غلظتNO (بر حسب میکرومول) در منوسیتها در چاهکهای حاوی سلولهای منوسیت، اینترفرون گاما (IFN-γ) و LPS (جفت چاهک سوم) و چاهکهای مشابه همراه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (جفت چاهک پنجم) در گروه پیش از درمان به‌ترتیب (٦/٥ ± ٢٠/٠٢) و (٢/٧ ± ٢٣/٥٨) و در گروه پس از درمان به‌ترتیب (٣/٨ ± ٣٧/٨٧) و (٣/٤ ± ٣٦/٦٧) و در گروه کنترل به‌ترتیب (٥/١ ± ١١/٧) و (٠/٩ ± ٧) به‌دست آمده است که مقایسهٔ درون‌گروهی این چاهکهای مشابه نشان می‌دهد اثری از افزایش غلظت NO مشاهده نمی‌شود و در همهٔ موارد $P>0/05$ است. جدول ١ بیانگر غلظت H_2O_2 (بر حسب نانومول) تولید شده در منوسیتهاست که افزایشی در مقدار این محصول نیز دیده نمی‌شود و مقایسهٔ درون‌گروهی آن نشان می‌دهد که در همه موارد $P>0/05$ است.

٤- بحث

علاوه بر واکنشهای متقابل بین آنتی‌بیوتیکها با باکتریها و سیستم ایمنی با باکتریها، آنتی‌بیوتیکها نیز مستقیماً در واکنش متقابل با سیستم ایمنی هستند که آثار تعدیل‌کنندهٔ ایمنی مختلفی شامل اثر بر فاگوسیتوز، کموتاکسی، آزادی اندوتوکسین و تولید سایتوکاین را دارند و همچنین برخی آنتی‌بیوتیکها از طریق القا یا مهار آپوپتوزیس در نیمهٔ عمر سلولها نیز مؤثر می‌باشند [٤٠]. سالها تحقیقات دانشمندان معطوف به اثر مستقیم آنتی‌بیوتیکها بر روی باکتری بود؛ اما در سالهای اخیر دانشمندان دریافتند که آنتی‌بیوتیکها نه تنها مستقیماً روی باکتریها اثر دارند، بلکه از طریق اثر بر سیستم ایمنی نیز می‌توانند آثار غیر مستقیم خود را اعمال کنند. برای مثال رایزبیک[1] و همکاران اثر فلوروکینولونها از جمله سیپروفلوکساسین را در افزایش تولید IL-٢ و اینترفرون گاما، IL-١α و IL-٣ و IL-٤ و GM-CSF و TNF-α و لنفوتوکسین در لنفوسیتهای خون محیطی تحریک شده در *in Vitro* نشان دادند [٤١]. بر این اساس تحقیق حاضر انجام شد تا نقش آنتی‌بیوتیک وسیع الطیف سیپروفلوکساسین، که عمدتاً پزشکان در درمان انواع مختلف عفونتها تجویز می‌کنند، در سیستم ایمنی بررسی شود. زیرا در این دارو مقاومت باکتریایی از نوع کروموزومال بوده و موارد کمی از مقاومت پلاسمیدی مشاهده شده است [٤٢] و از طرفی از داروهای نفوذکننده به‌داخل سلول است. برای مثال غلظت آن در داخل نوتروفیلها و منوسیتها به‌ترتیب ٤ تا ٨ و ٥ تا ١٠ برابر غلظت خارج سلولی آن است و براین اساس در مجاورت بیشتر با عوامل و فاکتورهای متعدد داخل سلولی هستند و نیز محققان را نسبت به خروج فاگوسیتهای بارگذاری شده در داخل سلول قادر کرده و اثر آنتی‌بیوتیک را در محیط کشت روی این سلولها مشاهده کنند. همچنین توزیع مناسب در بدن دارد و نیز جذب آن از دستگاه گوارش سریع و مناسب است. از طرفی استفاده گسترده از آن رو درمان انواع مختلفی از عفونتها و وسیع‌الطیف بودن آن است [٤٣] و دارای اثر مستقیم بر آنزیم مؤثر در همانند سازی DNA است.

نتایج مقایسهٔ سه گروه مختلف نشان می‌دهد که میزان نیتریک

1. Riesbeck

www.SID.ir

Archive of SID

اکساید (NO) مترشحه از نوتروفیلها و منوسیتها در گروه بیماران (پیش و پس از درمان) در مقایسه با گروه کنترل بسیار بالاتر است (P<۰/۰۵) که دلیل آن وجود عفونت و عامل بیماریزا، یعنی باکتری اشرشیاکلی در گروه بیماران و نبودِ آن در گروه شاهد یا کنترل است که به‌علت وجود عفونت و تحریک فاگوسیتها مقدار NO بالا رفته است.

در سلولهای گروه بیماران نیز میزان NO ترشح شده از سلولهای گروه پس از درمان نسبت به میزان آن در پیش از درمان بیشتر است (P<۰/۰۵) که علت این تفاوت را می‌توان یکسان نبودن شرایط موجود در گروهها دانست که در گروه پیش از درمان علت افزایش NO را می‌توان وجود عفونت و اثر عامل ایجادکننده آن درتحریک سیستم ایمنی و فاگوسیتها دانست و در گروه پس از درمان کلیه شرایط شبیه به گروه پیش است با این تفاوت که گروه پس از درمان با مصرف آنتی‌بیوتیک و کاهش شدت عفونت همراه بوده که دلیل اصلی تفاوت وجود عامل خارجی به‌نام آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین است که نشاندهندهٔ اثر تحریکی آنتی‌بیوتیک در تولید NO به‌وسیلهٔ نوتروفیلها و منوسیتهاست. برای بررسی این‌که آیا تغییر ایجاد شده مستقیماً روی نوتروفیلها و منوسیتها اعمال شده و یا به‌طور غیر مستقیم از طریق عوامل مختلف در بدن اعمال شده، مقایسهٔ درون گروهی انجام شده است که در آن دو گروه چاهک مربوط به نوتروفیلها و منوسیتها که فقط در وجود آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با هم متفاوتند با هم مقایسه شده‌اند که تفاوت معنی‌داری بین این دو چاهک مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقایسهٔ مذکور هم در گروه پیش از درمان و هم گروه پس از درمان و هم در گروه کنترل انجام شد و در هیچکدام تفاوت معنی دار نبود (P>۰/۰۵). وجود افزایش غلظت NO در داخل بدن، نشاندهندهٔ نبودِ اثر مستقیم آنتی‌بیوتیک روی سلول بوده و یا این‌که افزایش غلظت متأثر از متابولیتهای دیگر آنتی‌بیوتیک در بدن و همچنین اثر غیر مستقیم آن از طریق سلولهای دیگر ایمنی است. تحقیق انجام شدهٔ فورسگرن[1] و همکاران در سال ۱۹۸۵ بیانگر آن است که کینولونهای تست شده از جمله سیپروفلوکساسین مستقیماً بر سلولهای فاگوسیت اثر نداشته، اما می‌توانند باکتری را برای فاگوسیتوز و کشتن مستعد کنند [٤٤] و این تحقیق نیز اثر غیرمستقیم آنتی‌بیوتیک را روی سلولهای فاگوسیت تأیید می‌کند؛ با این تفاوت که تحقیق انجام شده کاملاً در *Vitro* انجام شده و اشاره‌ای به متابولیتهای احتمالی سیپروفلوکساسین در بدن نداشته و تنها اثر آن برچگونگی بلع و فاگوسیتوز باکتری بررسی شده است همچنین رایزبیک[2] و همکاران بیان داشته‌اند که فلوروکینولونها از جمله سیپروفلوکساسین بااثر روی لنفوسیتها باعث افزایش تولید IFN-γ می‌شوند [٤١] که یکی از محرکهای مهم در تولید NO است؛ بنابراین تأییدکنندهٔ نتیجه این تحقیق در *Vitro* و *Vivo* بوده و نشاندهندهٔ اثر غیرمستقیم آنتی‌بیوتیک در ترشح NO است.

در مورد میزان H_2O_2 ترشح شده از نوتروفیلها و منوسیتها وضع متفاوت است که گروه پیش و پس از درمان با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) و این تفاوت بین دو گروه پیش و پس از درمان مشاهده نمی‌شود (P<۰/۰۵). البته دلیل آن با توجه به تحقیق انجام شدهٔ اس ال نیل سون[3] و همکاران در سال ۱۹۹۷، مبنی بر نبود اثر چهار آنتی‌بیوتیک خانواده فلوروکینولونها از جمله سیپروفلوکساسین بر مکانیسم کشتن وابسته به اکسیژن و عدم تولید آنیون سوپراکساید با این آنتی‌بیوتیک است [٤٥] و نیز می‌تواند دلیل دیگری داشته باشد، که به‌وسیلهٔ جسوس ردوناس[4] اثبات کرده است، مبنی بر این‌که افزایش تولید NO از طریق اثر مستقیم آن روی آنزیم NADPH اکسیداز لکوسیتهای چند هسته‌ای باعث مهار تولید سوپراکسید آنیون می‌شود [۴۶].

در جفت چاهک چهارم به منوسیتها علاوه بر IFN-γ و LPS مهارکنندهٔ آمینوگوانیدین نیز اضافه شد که این ماده یک مهارکنندهٔ آنزیم NOS_2 است. این ملکول از نظر شباهتی که با آرژینین دارد به جای آرژینین در واکنش تولیدNO به‌وسیلهٔ NOS_2 شرکت می‌کند اما مانند آرژینین توانایی تولید NO را ندارد. مقدار ۱mM از مهارکنندهٔ آمینوگوانیدین باعث مهار تولید NO در منوسیتهای موشها می‌شود. هدف از این جفت چاهک بررسی این مقدار بر سلولهای منوسیت انسان می‌باشد که در این بررسی بی‌تأثیر بودن این مقدار از مهارکنندهٔ آمینوگوانیدین روی سلولهای منوسیت انسانی و نیاز احتمالی آن مقداری بالاتر مشخص شد.

مقایسهٔ درون‌گروهی چاهکهای نوتروفیلها و منوسیتها از نظر تولید H_2O_2 در چاهکهای نوتروفیل، که فقط در محتوای آنتی‌بیوتیک متفاوت بودند، نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵) که به‌نظر می‌رسد آنتی‌بیوتیک مذکور از این نظر هیچ اثر مستقیم یا غیرمستقیم بر سلولهای نوتروفیل ندارد. با توجه به

1. Forsgren

2. Riesbeck
3. S.L. Nielsen
4. Jesus Rodenas

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج به‌دست آمده، به نظر می‌رسد تغییرات موجود ناشی از اثر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین روی عوامل مختلف از قبیل فاکتورهای نسخه برداری، تولید سایتوکاین [٤٧] و غیره باشد؛ زیرا رایزبیک و همکاران [٤٨] و هلن اف[1] و همکاران [٤٩] نشان داده‌اند که سیپروفلوکساسین باعث افزایش القای ژن کدکننده IL-٢ شده و همچنین غلظت فاکتورهای هسته‌ای سلولهای T فعال شده نوع یک (NF – AT-١) و پروتئین فعال‌کنندهٔ نوع یک (AP-١) را افزایش می‌دهد و این فاکتورها از فاکتورهای نسخه‌برداری هستند. بنابراین سیپروفلوکساسین با مسیر مشترک تنظیمی چندین سایتوکاین تداخل می‌کند. بنابراین همانطور که همین متخصصان ثابت کرده‌اند، باعث افزایش سطح mRNA کدکنندهٔ بسیاری از سایتوکاین‌ها می‌شود. باید خاطر نشان کرد که تحقیقات انجام شده به‌وسیلهٔ محققان اغلب روی سلولهای فاگوسیت افراد داوطلب سالم و در *Vitro* انجام شده است و تحقیقات *Szczypka* که روی دو گروه سلولهای منوسیت موشی جدا شده از موشهای سالم و آلوده انجام گرفته، نشانگر تفاوت اثر برخی کینولونها مانند اوربی‌فلوکساسین از نظر تولید NO و درصد سولهای NBT مثبت و درصد فاگوسیتوز ماکروفاژها در دو گروه ذکر شده، است [٥٠]. بنابراین آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین علاوه بر فعالیت باکتریسیدال خود، قادر است با سیستم ایمنی در ارتباط بوده و باعث افزایش کارایی آن شود و چگونگی این واکنش و شناسایی اهداف ملکولی درگیر، نیازمند تحقیقات بسیار است.

٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از سرکار خانم دکتر بطحایی، دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس و خانم اعتمادی، کارشناس محترم گروه، برای همکاری در اجرای آزمایشها اعلان می‌دارند.

٦- منابع

[1] Labro MT. Interaction between antimicrobial drugs and phagocytes: an overview. Int J Antimicrob Agents 1993; 3: 73–87.

[2] Broek PJ. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. Rev Infect Dis 1989; 11: 213 – 245.

[3] Labro MT. Effect of antimicrobial agents on polymorphonuclear neutrophil functions. In: D Raoult Editor. Antimicrob Agents Int Pathogens CRC Press 1993; 87–135.

[4] Labro MT, Benna J E. Interaction of antibiotics with the phagocyte oxidative burst. In: PD Faist, J Meakins and FW Schildberg Editors, Host Defence Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis. Mechanism and Therapeutic Approaches Springer Verlag 1993; 953–964.

[5] Ritts RE, Antibiotics as biological response modifiers. J Antimicrob Chemother 1993; 26: 31–36.

[6] Labro MT. Interaction entre les agents anti-infectieux et les phagocytes. Press Med 1995 ; 24: 992–998

[7] Gemmell CG. Antibiotics and neutrophil function-potential immunomodulating activities. J Antimicrob Chemother 1993; 31:23–33.

[8] Labro MT. Immunomodulatory actions of antibacterial agents. Clin Immunother 1996; 6:454–464.

[9] Barrett JF. The immunomodulatory activities of antibacterials. Exp Opin Invest Drugs 1995; 4: 551–557.

[10] Labro MT. Immunomodulation by antibacterial agents. Is it clinically relevant?. Rugs 1993; 45:319–328.

[11] Lee W L, Harrison R E, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. Microbes Infect 2003; 5: 1299 – 1306.

[12] Hellewell PG, Williams TJ, editors. Immunopharmacology of neutrophils. London: Academic Press 1994.

[13] Gordon S, Keshav S, Chung LP. Mononuclear phagocytes: tissue distribution and fu nctional heterogeneity. Curr Opin Immunol 1988; 1: 26–35.

1. Helen F

www.SID.ir

Archive of SID

[14] Labro M T. Antibacterial agents—phagocytes: newconcepts for old in immunomodulation. Intern J Antimicrob Agent 1998; 10: 11-21.

[15] Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol 1984; 9: 4–9.

[16] Fearon DT, LoCksleyRM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996; 272: 50–53.

[17] Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. New Engl J Med 1978; 298: 659–668.

[18] Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defence and destruction. Blood 1984; 64: 959–966.

[19] Abbas A K. Cellular and Molecular Immunology. fifth edition 2003; 275 - 297

[20] Fang FC. Mechanisms of nitric oxaide related antimicrobial activity. J Clin Investig 1997; 99: 2818-2825.

[21] Brennan R E, Russel K, Zhang G, Samuel E. Both inducible nitric oxaide synthase and NADPH Oxidase contribute to the controle of virulent pHase I Coxiella burnetii infection. Infec Immun 2004; 72: 6666-75.

[22] Wheeler MA, Smith S D, Dagger GG. Bacterial Infection Induces Nitric Oxide Synthase in Human Neutrophils. 1997; 99:110–116.

[23] Nathan C, Xie Q W. Rrgulation of biosynthesis of nitric oxaide. J Bio Chem 1994; 269: 137- 225.

[24] Babior B M. Oxygen-dependent microbial killing of phagocytes. N Engl J Med. 1978; 298: 659-668.

[25] Talan DA. Treatment of Complicated Urinary Tract infections Emerging Role of Extended-Release Ciprofloxacin (Cipro XR). Long – Term healthcare 2004 Technology & Services.

[26] Sotelo TM. Recurrent Urinary Tract Infections in Women. Women' s Health Care 2004.

[27] Garraffo R, Jambou D, Chichmanin R M, Raviore S, Lapalus P. In vitro and in vivo ciprofloxacin pHarmacokinetics in human neutrophils. Antimicrob Agents Chemothe 1991; 35: 2115 – 2218.

[28] Walters J D, Zhang F, Nakkula R J. Mechanisms of fluoroquonolone transport by human neutrophils. Antimicrob Agents Chemothe 1999; 43: 2710 – 2715.

[29] Riesbeck K, Andersson J, Gullberg M, Forsgren A. Fluorinated 4- quinolones induce hyperproduction of interleukin 2. ProC Nat Acad Sci 1989; 86: 2809 – 2813.

[30] Nilsen S L, Obel N, Storgaard M, Anderson P L. The effect of quinolones on intracellular killing of staphylococuse aureuse in neutrophil granuloCyte. J Antimicrob Chemother 1997; 39:617 – 622.

[31] Rappolee DA , Werb Z. Secretory products of phagocytes. Curr Opin Immunol 1988; 1: 47–55.

[۳۲] چگنی، روزبه، ارزیابی تولید نیتریک اکساید در منوسیتهای کودکان مبتلا به سرطان خون لمفوبلاستیک حاد قبل و بعد از درمان در محیط کشت، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته خونشناسی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۸.

[۳۳] فرقانی اصفهانی، پروین، مطالعه اثرات کشندگی پپتیدها و پروتئینهای ضد میکروبی نوتروفیلهای انسان و خرگوش، پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۰.

[34] Cuffini AM, Tullio V, Mandras M, Scalas D, Belardi P. Impact of co-amoxiclav on polymorphonuclear granuloCutes from chronic hemodialysis patients. Am J Kidney Des 2001; 37:1253-9.

[35] Christiansen NO. A time-course study on superoxide generation and protein kinase C activation in human neutrophils. FEBS Letters 1988 ; 239: 195–198.

[36] Mandell LA, Afnan M. Mechanisms of interaction among subinhibitory concentrations of antibiotics, human polymorphonuclear neutrophils, and gram-negative bacilli. Antimicrob Agent Chemothe 1991; 35:1291-1297.

[37] Walter R, Cooper PH, Baggiolini M. Assay of H_2O_2 production by macrophages and neutrophils

www.SID.ir

Archive of SID

with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. J Immunol Methods. 1983; 63: 347-357.

[38] Green LC. Analysis of nitrate , nitrite and (15 N) nitrate in biological fluids. Anal Chem 2002; 126 – 131.

[39] Kirk A. Killing of plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infet Immun 1991; 99: 3280.

[40] Choi J H, Song MJ, Kim SH, Choi SM, Lee DG, Yoo JH, Shin WS. Effect of mixofloxacin on production of proinflamatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. antimicrob Agent chemothe 2003; 47: 3704 – 3707.

[41] Riesbeck K, Sigvardsson M, Leandersson T, Forsgren A. Superinduction cytokines gene transcription by ciprofloxacin. J Immunol 1994; 153: 343-352.

[42] Sarkozy G. Quinolones ss of antimicrobial agents**.** Med Czech 2001; 46: 257–274.

[43] Walters JD. Mechanisms of fluoroquinolone transport by human neutrophils. antimicrob Agent chemothe 1999; 43:2710–2715.

[44] Forsgren A, Bergkvist PL. Effect of ciprofloxacin on phagocytosis. Euro J Clin Microbiol 1985 ; 6: 575-578.

[45] Nielsen S L. The effect of quinolones on the intracellular killing of Staphylococus aureus in neutrophil granuloCytes. J Antimicrob Chemothe 1997; 39: 617–622.

[46] Ródenas J, Mitjavila MT, Carbonell T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukoCytes. Am J PHysiol Cell PHysiol 1998; 274: 827-830.

[47] Stunkel K G , Hewlett E G, Zeiler H J. Ciprofloxacin enhances T cell function by modulating interleukin activities. Clin Exp Immunol 1991; 86: 525-531.

[48] Riesbeck K. Ciprofloxacin Induces an Immunomodulatory Stress Response in Human T Lymphocytes. antimicrob Agent Chemothe 1998; 42:1923-1930.

[49] Helen F. Effect of ciprofloxacin on the activation of the transcription factors nuclear factor -ḰB, activator protein-1 and nuclear factorinterleukin-6, and interleukin-6 and interleukin-8 mRNA expressionin a human endothelial cell line. Clin Sci 2000 ; 99: 405–410.

[50] Szczypka M. Modulation of cellular immune respance by orbifloxacin in noninfected and E. coli-infected mice. Immunopharmacol Immunotoxicol 2005; 27: 461 – 471.

www.SID.ir