

اثر حفاظتی رانیتیدین بر پاسخ اختصاصی سیستم ایمنی 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 دیگر نشان داده شده است که رانیتیدین (مهار کننده گیرنده H₂) 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 ۰/۵ mg/Lit رانیتیدین داده شد و نیمی از موشهای درمان شده و درمان نشده تحت ۱ Gy/day پرتو گاما بمدت سه روز قرار گرفتند. بعد موشها با بروسلا ملی‌تنسیس ضعیف شده ایمن شدند و بدنبال آن میزان پاسخ اختصاصی آنتی‌بادی سازی، از دیاد حساسیت تأخیری و آزمون 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، موش BALB/c، رادیکالهای آزاد.

مقدمه

اشعه گاما (۱-۲Gy) بصورت وابسته به دوز باعث مهار پاسخ ایمنی هومورال و پاسخ لنفوسیت‌های T به میتوز می‌شود (Sharetskii, 1998; Sun, 1995). حتی دوزهای خیلی پایین ۰/۰۲۴ Gy و ۰/۱۶۸ و ۰/۳۳۶ باعث کاهش پاسخ ایمنی در موش‌های DBA و F1 (DBA× C57BL) 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 در نتیجه پروتئین کیناز C را فعال می‌کند و در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شود (Unkun *et al.*, 1992). رادیکال‌های آزاد محصول متابولیسم طبیعی بدن در طی فرآیند 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 می‌شوند (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). از سوی دیگر رانیتیدین می‌تواند پاسخ‌های سلول‌های سیستم ایمنی را نسبت به محرک‌های میتوزنیک 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 در نهایت 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 پرتو قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روشها

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

حیوان و نوع تغذیه

موش ماده BALB/c به سن ۸-۶ هفته از انستیتو رازی کرج خریداری گردید و به آنها غذای معمولی (chow) داده شد. موش‌ها در گروه‌های پنج تایی در یک قفس شفاف با سرپوش میله‌ای استیل نگهداری گردید. دمای اتاق حیوانات 22°C - 20°C و رطوبت ثابت بود و دوره تاریکی و روشنایی دوازده ساعته برای آنها فراهم گردید. بعد از سه هفته که موشها با وضع جدید تطابق یافتند به دو گروه تقسیم شدند. موشهای گروه اول (۲۰ موش) از سه روز قبل از اشعه دهی تا پایان آزمایشها در آب مصرفیشان رانیتیدین به میزان صد میلی گرم در لیتر قرار داده شد. به گروه دوم گروه کنترل (۲۰ موش) آب معمولی داده شد.

پرتو دهی

موشها در سازمان انرژی اتمی ایران تحت تأثیر پرتو گاما با استفاده از دستگاه گاما سل ۲۲۰ قرار گرفتند. موشهایی که رانیتیدین دریافت کرده بودند (گروه اول) و گروه دوم یا کنترل هر کدام به دو دسته تقسیم شدند و یک دسته از گروه اول (۱۰ موش) و یک دسته از گروه دوم (۱۰ موش) بمدت سه روز و هر روز در معرض ۱ Gy پرتو γ با آهنگ دز 0.1Gy/s پرتو حاصل از ^{60}Co قرار گرفتند.

ایمنی زایی

از واکسن Rev1 که حاوی *Brucella mellitensis* ضعیف شده است (تهیه شده از انستیتو واکسن و سرم سازی رازی کرج) برای ایمنی زایی استفاده گردید. پس از پایان سه روز اشعه دهی به موشها، واکسن مذکور به میزان 5×10^5 CFU/ml به داخل صفاق و یا 1×10^8 CFU/ml زیر جلدی در قاعده دم آنها تزریق شدو به ترتیب بعد از گذشت 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 بافر فسفات سیلین pH=7 شسته و سپس باکتری را به غلظت 10^{13} سلول در میلی لیتر رسانده و حجم ۵ میکرو لیتر از آنرا روی کاغذ نیتروسولوز که قبلاً به صورت دایره‌های ۵ میلی متری بریده شده بود (0.22 μm pore size Millipore Inc Bedford, Mass) قرار داده تا کاملاً خشک شود. تمام مواد

در بافر فسفات‌سیلین (PBS) حل شدند. هر دیسک حاوی آنتی‌ژن، در یک چاهک از پلیت‌های ۹۶ تایی ته صاف قرار داده شد. سپس ۱۰۰ μl از محلول ۱ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در بافر PBS را در روی هر دیسک ریخته، تا مناطقی از سطح کاغذ نیتروسولوز 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 ۱۰۰ μl از سرم با رفته‌های ۱/۴ و ۱/۸ و ۱/۱۶ و ۱/۳۲ و ۱/۶۴ و ۱/۱۲۸ را به هر چاهک اضافه کرده و نیم‌ساعت در ۳۷ °C گذاشته شد. مجدداً سه بار پلیت را با بافر شستشو داده و ۱۰۰ μl از محلول 1/2000 رقیق شده آنتی‌بادی بزی ضد ایمنوگلوبولین M موشی (Goat anti- mouse IgM) را به هر چاهک اضافه کرده و بمدت یکساعت در ۳۷ °C نگهداری گردید. سپس پلیت را سه بار شستشو داده و بعد ۱۰۰ μl از محلول 1/2000 رقیق شده آنتی‌بادی موشی ضد ایمنوگلوبولین بز (Mouse anti goat IgG) که با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز (HRP) کوئزوگه شده بود به هر چاهک اضافه کرده و بمدت یکساعت در ۳۷ °C قرار داده شد. و مجدداً سه بار شستشو داده شد و در چاهک ۱۰۰ μl از محلول ۴-کلرو-۱- نفتول که به آن هیدروژن پراکسید ۳۰٪ افزوده بودیم، اضافه گردید و بعد از ۲۰ دقیقه سوبسترا را خارج کرده و پلیت، با آب مقطر شسته شد. رنگهای آبی روی کاغذ نیتروسولوز که نشان دهنده وجود آنتی‌بادی بر علیه بروسلا در سرم بود، ظاهر گردید. در رفته‌های مختلف، آخرین چاهکی که رنگ ایجاد کرده بود به عنوان تیترا آنتی‌بادی بر علیه بروسلا گزارش گردید.

۲- پاسخ سلولی

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

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 روز در معرض اشعه قرار گرفتند. سپس بطور زیر جلدی در قاعده دم آنها 10^8 عدد باکتری بروسلا ضعیف شده در حجم ۱۰۰ μl تزریق شد و دو هفته بعد در کف پای راست موشها، ۵۰ μl از آنتی ژن بروسلا (1×10^8 CFU) بطور زیر جلدی تزریق گردید. به عنوان کنترل منفی در کف پای چپ این موشها، ۵۰ μl از PBS به اضافه فرمالین تزریق شد و ضخامت پاها بعد از ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت با کولیس اندازه‌گیری گردید. پاسخ ازدیاد حساسیت

تاخیری بعد از ۲۴ ساعت بعنوان اندازه مطلق افزایش ضخامت پا بر حسب میلی متر گزارش شد و درصد افزایش قطر پا از فرمول زیر محاسبه گردید.

ضخامت پای تزریق شده - ضخامت پای تزریق نشده

----- = درصد افزایش قطر پا

ضخامت پای تزریق نشده

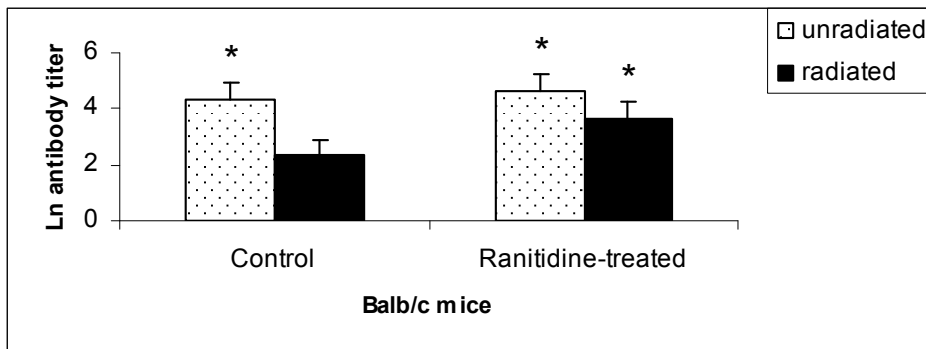
آزمون تکثیر لنفوسیتها (LTT): بعد از سه روز اشعه دهی به موشها، بطور زیر جلدی در قاعده دم آنها 10^8 باکتری بروسلا ضعیف شده به حجم $100 \mu\text{l}$ تزریق شد. دو هفته بعد طحال و غدد لنفاوی موشها خارج شد و لنفوسیتهای آن خارج گردید و در محیط کشت کامل [RPMI 1640] که حاوی L-گلوتامین (2mM)، پنی سیلین (10000 IU/L)، استرپتومایسین (100 mg/L) و سرم جنین گاوی (FCS) (10%) 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 میلی لیتر تهیه گردید. $100 \mu\text{l}$ از هر سوسپانسیون سلولی به صورت سه تایی به هر چاهک در میکروپلیت های ۹۶ تایی ته صاف اضافه شد. سپس $100 \mu\text{l}$ از آنتی ژن رقیق شده (10^6 باکتری بروسلا کشته شده) در محیط کامل، یا $100 \mu\text{l}$ محیط کامل کشت و یا $100 \mu\text{l}$ از $5 \mu\text{g/ml}$ Con A، به سه چاهک (بعنوان کنترل مثبت) از سلولها اضافه شد و بمدت ۵۴ ساعت در انکوباتور مرطوب 37°C که حاوی $5\% \text{CO}_2$ بود کشت داده شد. بعد $1 \mu\text{Ci}$ از تایمیدین رادیواکتیو (Radiochemical Amersham, UK) به هر چاهک اضافه گردید و بعد از ۱۸ ساعت با جمع آوری سلولها توسط هاروستور اتوماتیک MASH (pharmacia) و به کشت خاتمه داده شد. نتایج بر حسب اختلاف میان جذب تایمیدین توسط سلولهای تحریک شده با آنتی ژن و سلولهای تحریک نشده ارزیابی شد.

روشهای آماری

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

نتایج و بحث

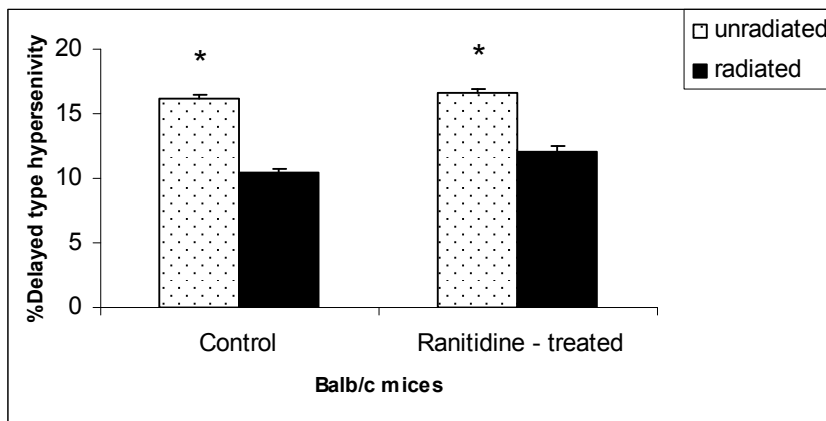
نتایج پاسخ هومورال موشهایی که با واکسن بروسلاملی تنسیس (Rev-1) ایمن شده بودند در شکل ۱ آمده است. اشعه بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) باعث کاهش تولید آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن بروسلا می‌شود درحالی‌که رانیتیدین کاهش را جبران نموده و موشهایی که دارو دریافت کرده‌اند نسبت به کنترل اشعه ندیده اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند در صورتیکه با کنترل اشعه دیده اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان می‌دهند.



* اختلاف با کنترل اشعه معنی‌دار است ($P < 0.05$)

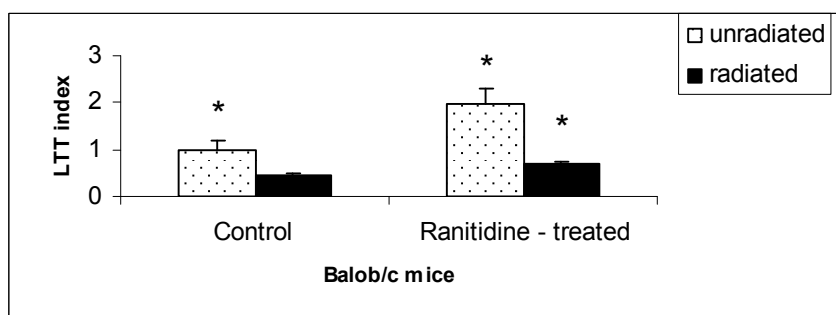
شکل ۱- تولید آنتی‌بادی در پاسخ به بروسلا در موشهای تیمار شده رانیتیدین بعد از پرتودهی به میزان ۱ گری بمدت سه روز

اشعه باعث کاهش پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری و تکثیر لنفوسیتها می‌شود و اختلاف بین کنترل اشعه دیده و اشعه ندیده معنی‌دار ($P < 0.05$) است (شکل ۲ و ۳). همچنین رانیتیدین قادر است که پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری را در موشهای اشعه دیده افزایش دهد، اما این اختلاف با کنترل اشعه دیده معنی‌دار نیست (شکل ۲). درحالی‌که رانیتیدین نسبت تکثیر لنفوسیتها را در موشهای اشعه دیده بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به کنترل اشعه دیده افزایش می‌دهد (شکل ۳).



* اختلاف با کنترل اشعه معنی دار است ($P < 0.05$)

شکل ۲- پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری نسبت به بروسلا در موشهای تیمار شده با رانیتیدین بعد از پرتو دهی به میزان ۱ گری به مدت سه روز



* اختلاف با کنترل اشعه معنی دار است ($P < 0.05$)

شکل ۳- نسبت ایندکس تکثیر لنفوسیتها در پاسخ به بروسلا

در مطالعه‌ای که با دوز کم اشعه گاما (۴ CGy) در روز برای ۵ روز در هفته یعنی کلاً ۲۰ CGy نشان دادند که پاسخ تکثیر لنفوسیت‌های T به میتوزن بستگی به گونه موش دارد. در موشهای DTH، BALB/c، LTT کاهش یافته است. در صورتیکه در موش BALB/c، LTT 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 کنترل در کبد و طحال موشهای اشعه دیده تا دو یا سه هفته بعد از

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 شده است (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 P53 در موشهای BALB/c (Shankar *et al.*, 1999) و افزایش سلولهای مہاری (Malyzhev *et al.*, 1993) ذکر شده است. همچنین نشان دادند که 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 میتوزن 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 و سلولی 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 آنتی‌اکسیدانتهای 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 reperfused 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.

- 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 recited 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, Xenobiotics, 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 defects of ionizing radiation and cyclophamide 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 H₂O₂ 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) *H₂-receptor antagonist inhibition of human neutrophil superoxide anion synthesis*. Clin. Pharmacol. Ther., **45**, 487-94.