

## بررسی اثر داروی ۴-آمینوپیریدین (4-AP) بر ایمنوپاتوزنر واکنش التهابی در مدل تجربی

رضا غلام نژاد<sup>۱\*</sup>، دکتر محمد رضا خرمنی زاده<sup>۲</sup>، دکتر علیرضا رضوی<sup>۳</sup>، علیرضا صالحی نوده<sup>۴</sup>،  
محمد مهدی امیری<sup>۵</sup>، وحید ملاکامی<sup>۶</sup>، دکتر سید عباس میر شفیعی<sup>۷</sup>

### 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 پروتئولایتنکی مانند ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) است. از این رو در این مطالعه به بررسی اثر داروی ۴-آمینوپیریدین (4-AP) بر روند پیشرفت التهاب دریک واکنش التهابی در مدل تجربی پرداخته شد.

**روش بررسی:** مطالعه انجام شده از نوع استنباطی بود که در آن تعداد ۴۸ راس رات Out bred از نژاد Sprague Dawely همگی ماده با وزن حدود ۲۰۰-۱۵۰ گرم و سنین ۶ تا ۸ هفتگی و سالم برای القای یک واکنش التهابی تجربی [توسط آلبومین سرم گاو (BSA) + ادجوانت کامل فروند (CFA)] مورد استفاده قرار گرفتند. رات ها در ۶ گروه ۸ تایی شامل: گروه نرمال، گروه بیمار، گروههای Treatment-1 و Treatment-2 و گروههای Prevention-1 و Prevention-2 قرار گرفتند. داروی 4-AP در غلظتهای مختلف (۵۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم) به گروههای Treatment-1,2 و Prevention-1,2 به میزان (۰/۱ میکرولیتر) تزریق گردید و ۷۲ تا ۴۸ ساعت بعد از تزریق دوز یادآور (فقط BSA) شدت التهاب مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

**یافته ها:** از ۴۸ راتی که مورد مطالعه قرار گرفتند، ۸ رات (۱۶/۶۶٪) هیچ گونه علائم التهابی، هیستوپاتولوژی و یا تولید آنتی بادی ضد BSA را نشان ندادند و این همان گروه نرمال ما بودند. ۸ رات (۱۶/۶۶٪) علائم شدید و واضح التهاب را نشان دادند که گروه بیمار ما بودند. تعداد ۳۲ رات (۶۶/۶۶٪) 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 در بررسی های کلینیکی، رادیولوژی، هیستوپاتولوژی و تولید آنتی بادی ضد BSA نشان می دهد که داروی 4-AP باعث کاهش شدت التهاب در گروههای دریافت کننده دارو نسبت به گروههای نرمال و بیمار شده بود که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). اگرچه آنالیزهای آماری، نشان از عدم تاثیر داروی 4-AP بر میزان تولید MMPs در سل لاین فیبروسارکوما Whi-164 داشت و اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود.

**واژه های کلیدی:** آرتریت روماتوئید، واکنش التهابی، ماتریکس متالوپروتئینازها، ۴-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

### مقدمه

هنگامی که آسیب بافتی بر اثر باکتریها، انگلها، ویروسها، ضربه، تروما، مواد شیمیایی، گرما، واکنش ایمنی بدن علیه بافتهای خودی و یا هر پدیده دیگری بوجود می آید، مدیاتورهای التهابی که توسط بافتهای آسیب دیده آزاد می شوند، موجب بروز تغییرات ثانویه

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> استادیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۳</sup> دانشیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۶</sup> کارشناس میکروبیولوژی استیتو پاستور ایران

<sup>۷</sup> استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

بسیار شدیدی در بافتها می گردند. تمامی این تغییرات ثانویه روی هم التهاب یا آماس نامیده می شوند (۱-۲). هنگامی که بافتی دچار التهاب می شود، فرآورده های مختلفی تولید می شوند که می توانند موجب کموناکتی سلولهای التهابی به سوی ناحیه ملتهب شوند. این مواد عبارتند از: برخی از سموم باکتریها، فرآورده های تخریبی خود بافتهای ملتهب، چندین فرآورده ناشی از واکنش مواد پیچیده که در بافتهای ملتهب فعال می شوند، فرآورده های ناشی از لخته شدن پلازما 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 بینوژن، سیستم فیبرینولیزین و به دنبال آن تولید و ترشح مولکولهای کموناکتیک (کموکاینها)، باعث مهاجرت سلولهای التهابی از دیواره اندوتلیوم عروق بافتهای ملتهب می شوند که در راستای حذف عامل التهابی ممکن است عوارض ناخواسته ای نیز برجای بگذارند (۳).

به طور مثال بیماری RA که یکی از بیماریهای التهابی مزمن سیستمیک بسیار پیچیده با اتیولوژی نامشخص است و تقریباً ۰/۱-۰/۵ درصد از جمعیت دنیا را گرفتار کرده است، یک عارضه فرسایشی است که سبب تخریب مفاصل و نهایتاً موجب آسیب های ساختاری و ناتوانی می شود. RA همچنین با افزایش رخ دادن لنفوما در ارتباط است که این امر ممکن است به دلیل فعالیت سلولهای التهابی باشد (۴).

امروزه برای درمان بیماریهای التهابی نظیر RA و MS از روش های مختلفی استفاده می شود؛ از طب سنتی گرفته (استفاده از سم زنبورعسل در آسیای شرقی) تا استفاده از داروهای بیولوژیکی نظیر اینترلوکین یک-بتا (IL-1 $\beta$ )، فاکتور نکروزدهنده تومور-آلفا (TNF- $\alpha$ ) و گلوکوکورتیکواستروئیدها و داروهای ضدالتهابی غیر

استروئیدی که امروزه به طور گسترده ای در درمان بیماریهای التهابی به کار می روند و هر کدام با مکانیسم ویژه ای باعث کاهش علائم این دسته از بیماریها می شوند (۵). داروی 4-AP با فرمول مولکولی C5H6N2 و وزن مولکولی ۹۴/۱۲ میکروگرم یکی از داروهای سنتتیک است که برای درمان بیماریهای نظیر میاستنی گراویس، لامبرت ایتون و MS مورد استفاده قرار گرفته است (۶). با توجه به اینکه این دارو و داروهای نظیر TEA (تترااتیلن آمونیوم)، کوئینین، سم زنبورعسل، سم مار و سم شقایق های دریائی با مکانیسم بلوک کردن کانالهای پتاسیمی سلولها اثر خود را اعمال می کنند؛ این فرضیه وجود دارد که بتوان با استفاده از این داروها و بلوک کردن کانالهای پتاسیمی در سلولهای التهابی و لنفوسیت های T و B روند التهاب را در بیماریهای التهابی کند و یا حتی متوقف کرد. با توجه به اینکه در سالهای اخیر محققین توانسته اند با کمک 4-AP و ۳-۴-دی آمینو پیریدین (3,4-DAP) علائم عصبی بیماری MS را کاهش دهند (۷-۸). از این رو تحقیقات بنیادین در رابطه با این بیماری ها می تواند کمک فراوانی به درک مکانیسم های موثر در پاتوژنز این بیماری ها و اتخاذ پروتکل های درمانی جدید و مناسب تری برای این بیماران نماید.

### روش بررسی

در این مطالعه، تعداد ۴۸ راس رات Out bred از نژاد Spragu Dawely همگی ماده با وزن حدود ۲۰۰-۱۵۰ گرم و سنین ۶ تا ۸ هفتگی و سالم برای القای یک واکنش التهابی تجربی مورد استفاده قرار گرفتند. راتها به صورت تصادفی در ۶ گروه ۸ تائی شامل: گروه نرمال، گروه بیمار، گروه های Treatment-1 و Treatment-2، گروه های Prevention-1 و Prevention-2 قرار گرفتند. BSA (ساخت شرکت

- 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 می باشد. طیف درجه بندی در هرپا از ۳-۰ است. که صفر برای حالت نرمال و ۳ برای حالت ماکزیم ضایعات التهابی در نظر گرفته شد.
  - بررسی هیستوپاتولوژیک التهاب و پرولیفراسیون سلولها همچنین با درجه بندی هیستولوژی قطعاتی از پای حیوانات ارزیابی شد. راتها در روز سوم با سدیم پنتوباریتورات به صورت داخل شکمی بیهوش و سپس کشته شدند و اعضای پاهائی که در آنها واکنش التهابی ایجاد شده بود برداشته شد و در فرمالین ۱۰٪ 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) از ۰-۴ انجام شد.
  - بررسی آنتی بادی ضد BSA  
برای تعیین میزان آنتی بادی ضد BSA پلیتهای ۹۶ تائی پلی ونیل کلراید با ۱ میکرولیتر از BSA (یک میکرولیتر در هرچاهک) که با بافرسدیم کربنات ۰/۱ مولار رقیق شده بود به مدت یک ساعت در دمای ۳۷° سانتی گراد و سپس به مدت ۱۶ ساعت در ۴° سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از ۱۶ ساعت چاهکها بوسیله Tween20 (۵٪) شرکت سیگما آلدریج) 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
- سیگما آلدریج) به میزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد که با حجم مساوی از CFA حاوی مایکو باکتریوم توبرکلوزیس ۵ میلی گرم بر میلی لیتر (ساخت شرکت سیگما آلدریج) مخلوط گردید و به صورت امولسیون در آمده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از امولسیون به صورت داخل جلدی در قاعده دم راتها تزریق گردید. تزریق یادآور ۴ روز بعد از تزریق اول بوسیله BSA در کف پای راتها انجام شد. داروی 4-AP در غلظتهای مختلف (۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم) از یک هفته قبل از القاء واکنش التهابی (گروههای 1,2-Prevention) و یک هفته بعد از القاء واکنش التهابی (گروههای 1,2-Treatment) به میزان ۰/۱ میکرولیتر به صورت داخل شکمی تزریق گردید. راتها ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق دوز یادآور BSA (۱۵ روز بعد از القاء واکنش التهابی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. درگروه نرمال بیماری ایجاد نشد و حیوانات هیچ گونه دارویی دریافت نکردند. درگروه بیمار یک واکنش التهابی طبق پروتکل ذکر شده ایجاد شد اما داروی 4-AP را دریافت نکردند.
- آنالیزهای آماری  
استفاده از روش T-test برای نتایج حاصل از بررسی آنتی بادی ضد BSA به روش الایزا و میزان تولید MMPs و روش Mann-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 افزار SPSS15 استفاده شد.
- بررسی کلینیکی  
پای راتها از نظر قطر واکنش التهابی و با توجه به علائم کلینیکی بوسیله کولیس اندازه گیری شدند و نتایج روزانه ثبت و در پایان از لحاظ آماری مورد بررسی قرار گرفتند.

انکوبه شدن چاهک‌ها با Tween 20 (۵٪) شستشو داده شدند تا مولکولهای اتصال نیافته خارج شوند. بعد از شستشو آنتی رات خرگوشی کنژوکه شده با پراکسیداز که به نسبت ۱/۲۵۰ با Tween 20 (۵٪) 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 سوبسترای O-متیل آلدئید آمین و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> اضافه شد تا عمل شناسایی آنتی بادی انجام شود. سپس 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (شرکت مرک آلمان) برای متوقف کردن واکنشها به چاهک‌ها اضافه شد و در پایان جذب نوری نمونه‌ها در ۶۳۰ نانومتر بوسیله الیزایدر (شرکت DANA مدل DA-36) قرائت شد.

#### • بررسی میزان تولید MMPs

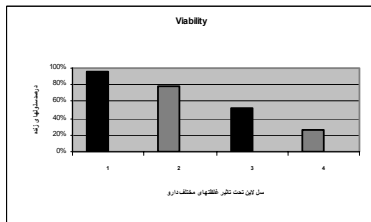
برای بررسی میزان تولید MMPs (نقش عمده‌ای در ضایعات التهابی دارند) در حضور دارو در بدن (In vivo) از سلول لاین فیروسارکوما Whi-164 با منشأ موشی که شباهت زیادی با سلولهای حیوانات مورد آزمایش دارند از بانک سلولی انستیتوی پاستور ایران تهیه شد و به تعداد ۷۰۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در محیط کشت RPMI-6401 با ۵٪ سرم، پنی سیلین ۱۰۰ میکرو یونیت در میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تحت شرایط ۵٪ دی اکسید در دمای ۳۷° سانتیگراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند. رقت های مختلف 4-AP (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶) میکروگرم بر میلی لیتر) به کشت سلول‌ها اضافه شد. پس از ۴۸ 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 (۲/۰ درصد 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 هر میلی لیتر، سلولهای یک مربع ۱۶ 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 آنزیمی MMPs تکنیک هیوسن و دودل (Heussen&Dowdle) که برای تشخیص ژلاتیناز (کلاژناز چهار یا MMP-2) مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید حاوی دو میلی گرم بر میلی لیتر ژلاتین در حضور سدیم دودسیل سولفات و تحت شرایط غیر کاهنده به مدت سه ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکترو فورز شدند. سپس ژل با Triton×100 (شرکت سیگما آلدریچ) با غلظت ۲/۵٪ در جهت حذف سدیم دودسیل سولفات، شسته شد. ژل حاصل به مدت یک شب در ۳۷° سانتی گراد درون محلول حاوی ۰/۱ مولار تریس هیدروکلراید و ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلراید نگهداری و سرانجام با کوماسی بلو ۰/۰۵ 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.

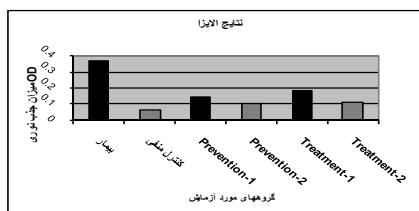
#### یافته ها

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 دیجیتالی)، غلظتهای مختلف داروی 4-AP به طور چشمگیری شدت التهاب را نسبت به گروه بیمار

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

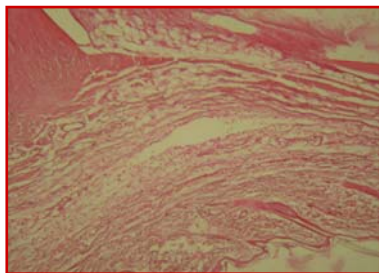


**نمودار ۳- درصد سلولهای زنده را در غلظتهای مختلف دارو نشان می‌دهد**



**نمودار ۴- جذب نوری میزان تولید آنتی بادی ضد BSA را در غلظتهای مختلف دارو نشان می‌دهد؛ به کاهش میزان تولید آنتی بادی در گروههایی که دارو دریافت کرده‌اند توجه شود.**

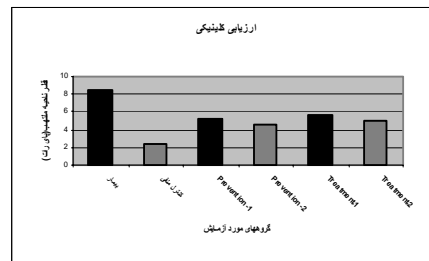
نتایج به دست آمده از بررسی‌های پاتولوژیک و آنالیزهای آماری حاکی از اختلاف معنی داری در شدت التهاب ایجاد شده، ادم، پرخونی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در گروه‌های مختلف نسبت به گروه بیمار و گروه نرمال می‌باشد.



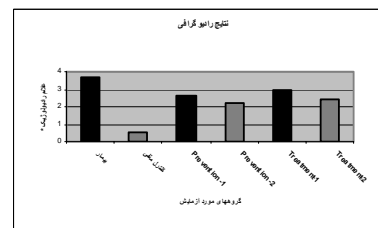
**تصویر ۱- مقطعی از پای یک رات نرمال که در آن اثری از التهاب، ادم، یا انفیلتراسیون سلولهای التهابی دیده نمی‌شود.**

کاهش داده بودند (نمودار ۱). آنالیزهای آماری نیز این یافته‌ها را تأیید کردند و اختلاف معنی داری بین گروه‌های مورد آزمایش، گروه بیمار و گروه نرمال وجود داشت ( $P < 0/05$ ).

در بررسی رادیو گرافی ما به دنبال یافته‌هایی بودیم که بروز واکنش التهابی را با استفاده از معیارهایی همچون درجه نرمی التهاب بافتی، نازکی محل التهاب، کدورت محل التهاب در اثر انفیلتراسیون سلولها و شدت التهاب در گروه‌های تجربی مورد تأیید 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 و گروه‌های مورد آزمایش وجود داشت (نمودار ۲).



**نمودار ۱- نتایج ارزیابی قطر نامیه ملتعب را نشان می‌دهد که با کولیس دیجیتال اندازه گیری شده است**

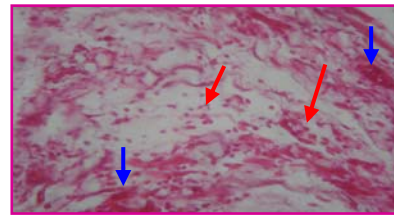


**نمودار ۲- نتایج رادیوگرافی را نشان می‌دهد که با استفاده از درجه بندی استاندارد توسط متخصص رادیولوژی بررسی شده‌اند**

در نمودار (۳) نتایج مربوط به Viability و اثر سایتو توکسیته 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 تأیید می‌کنند و ( $P < 0/05$ ) می‌باشد.

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 ۴) 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 تأیید کردند ( $P_v < 0.05$ ).

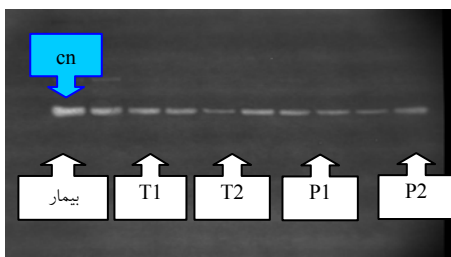
در بررسی میزان فعالیت MMPs بر روی ژل کروماتوگرافی که در اینجا کلاژناز چهار که یکی از MMPs است مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که میزان تولید این آنزیم در غلظت‌های مختلف داروی AP-4 استفاده شده بر روی سلول لاین فیبروسارکوما Whi-164 نسبت به گروه‌های نرمال و کنترل اختلاف معنی داری ندارد؛ کما اینکه آنالیزهای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



تصویر 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.

راتهایی که غلظت‌های مختلفی از دارو را دریافت کرده بودند درجات مختلفی انفیلتراسیون سلولهای التهابی، پرخونی، ادم و شدت التهاب را نشان دادند. تصویر (۳) مقطعی از پای یک رات را نشان می‌دهد که غلظت ۴۰۰ میکروگرم دارو را دریافت کرده است و تصویر (۴) مقطعی از پای یک رات را نشان می‌دهد که غلظت ۸۰۰ میکروگرم دارو را دریافت کرده است.

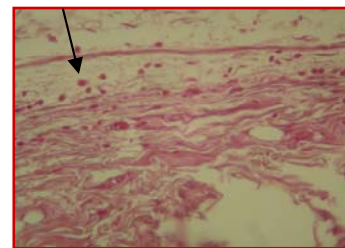


تصویر ۵- زایموگرافی MMPs را بر روی ژل کروماتوگرافی

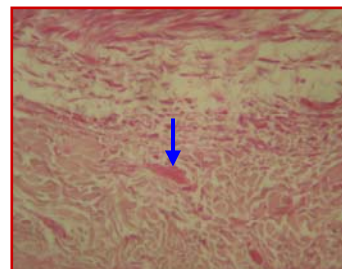
نشان می‌دهد cn=کنترل نرمال،

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 گروه‌هایی که دارو دریافت کرده اند نسبت به گروه بیمار وجود ندارد و این مورد باتوجه به آنالیزهای آماری تأیید شد.



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



تصویر ۴- تعداد بسیار اندک سلولهای التهابی و پرفونی محدود در تصویر دیده می‌شود (فلش)

## بحث

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 متالوپروتئین‌های فعال می‌توانند تجزیه کنند را در نظر بگیریم وجود کنترل شدید بر فعالیت 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 آنزیم‌ها را تولید کنند. از نقش‌های پاتولوژیک MMPها در ایجاد بیماری‌های قلبی - عروقی است.

آترواسکلروزیس فرایند التهابی مزمنی است که در آن تجمع ماتریکس خارج سلولی سلول‌های 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(۱۶-۱۴).

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 و TNF) 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

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(۹ و ۱۰). در مشاهدات پاتولوژی بیماری MS که شایعترین بیماری التهابی نورولوژیک در جوانان است، التهاب در ماده 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 بیماری RA 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- $\alpha$  در مایع سینوویال یافت شده‌اند که به نظر می‌رسد این سایتوکاینها باعث فراخوانی بیشتر سلولهای التهابی و تولید آنزیمهای هیدرولیتیک نظیر کلاژنازها(یک نوع از MMPs) توسط این سلولها و دیگر سلولهای حاضر در 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

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-AP و 3,4DA 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، یعنی KV-1، KV-2، KV-3، KV-4 در سلولها شناخته شده‌اند. نتایج حاصل از تحقیقات مشابه بر روی مدل تجربی آسیب طناب نخاعی در سال ۱۹۹۶ توسط 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 سال ۲۰۰۶ 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 آپتوز است. عملکرد کانالهای پتاسیمی برای پرولیفراسیون سلولهای T بالغ ضروری است (۲۰).

### نتیجه گیری

آنچه که از نتایج و آنالیزهای آماری و مشاهدات رادیو گرافی و هیستوپاتولوژی بدست آمد نشان داد که داروی 4-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 و Treatment2) نسبت به گروههایی که غلظت پائین دارو را دریافت کرده بودند (Prevention-1 و Treatment-1) علائم التهابی را در حد پائین تری نشان دادند.

همچنین گروههای Prevention-1 و Prevention-2 نسبت به گروههای Treatment-1 و Treatment-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 گروههای Prevention-1 و Prevention-2 که یک هفته قبل از ایجاد واکنش التهابی روزانه ۰/۱ میکرولیتر از دارو را دریافت می‌کردند در مقایسه با گروههای Treatment-1 و Treatment2 که یک هفته بعد از ایجاد واکنش التهابی روزانه ۰/۱ میکرولیتر 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 داروی 4-AP بر کاهش تولید آنتی بادی BSA است و همین یافته ما را به آینده امیدوارتر می‌کند که می‌توان با استفاده از این دارو مانع از پیشرفت بیماریهای



تزریقی (BSA) بود که به نظر می‌رسد دارو با استفاده از بلوک کردن کانالهای پتاسیمی سلولهای B و یا احتمالاً از طریق آپتوز 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.

التهابی شد. اگر چه انتظار می‌رفت که داروی 4-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 بی‌تاثیر 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

## 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, et al. 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. Wisely WM. 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 central nervous system 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, et al. K<sup>+</sup> channel-blocking alkoxy psoralens inhibit the immune response of encephalitogen Tc line cells and lymphocytes from 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, et al. 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.

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 involvement in 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, Sfrikakis 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 Sensitive Voltage-Gated K<sub>+</sub> Channels of Vascular Smooth Muscle. 2001; 89: 1030-1037.
- 19- Matsumoto S, Tanimoto T, Yoshida S, Ikeda M, Takeda M, Saiki C, et al. Effects of Acetazolamide and 4-Aminopyridine on CO<sub>2</sub>-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<sup>+</sup> currents in endothelial cells from hypertensive rats. *Hypertens Res* 2002; 25: 589-596.