

تولید نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) 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 آموخته 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 و منوسیت‌های بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشرشیاکلی پیش و پس از مصرف آنتی‌بیوتیک در تولید نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) از این سلولها در محیط کشت مواد و روشها: تعداد ۴۵ بیمار خانم مبتلا به عفونت ادراری ناشی از اشرشیاکلی 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 دژ 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 ۶ ساعته با PMA برای نوتروفیلها (شرایط *ex vivo*) و همچنین فعال‌کننده‌های مذکور و آنتی‌بیوتیک 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 H₂O₂ به روش فلورومتري استفاده گردید.

نتایج: نتایج *in vitro* و *ex vivo* نشان داد که میزان NO و H₂O₂ سلولهای منوسیت و نوتروفیل بیماران در دو گروه پیش از درمان و پس از آن در مقایسه با نمونه 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 H₂O₂ 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 پراکسید هیدروژن (H₂O₂) تأثیری ندارد. ضمناً نتایج *in vitro* نشان می‌دهد که این افزایش فقط در داخل بدن صورت گرفته و در *in vitro* که مقایسه درون‌گروهی هریک از گروههاست، دیده نمی‌شود.

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

۱- مقدمه

سیستم ایمنی دارند [۱-۱۰]. سیستم ایمنی دارای مکانیزم‌های مختلفی برای دفاع در برابر عوامل مهاجم بوده که یکی از این

در سالهای اخیر توجه زیادی به اثر آنتی‌بیوتیکها روی سیستم ایمنی شده و نشان داده است که آنتی‌بیوتیکها آثار مختلفی بر

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ۳۰۹۰

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 کوتاهاند و توانایی فوق‌العاده‌ای 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 [۱۴]. 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 [۱۶]. منوسیتها و نوتروفیلها از استراتژیهای مشابهی برای کنترل مهاجم میکروبی استفاده می‌کنند؛ ولی نوتروفیلها 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 فاگولیزوزومی فاگوسیتها 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 بر این فاگوسیتها دارای دومین سیستم تولید رادیکال آزاد می‌باشند که آنزیم آن نیتریک اکساید سنتاز بوده که یک آنزیم سیتوزولی است. سه ژن مسؤل 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 (NOS₂ یا iNOS) می‌باشد که در فاگوسیتها در حال استراحت وجود ندارد و پس از تحریک، تولید آن القا می‌شود [۲۰]. فعال شدن ماکروفاژها به‌وسیله سایتوکاینها به تولید واسطه‌های فعال اکسیژن (ROIs) و

واسطه‌های فعال نیتروزن (RNIs) منجر می‌شوند که فعالیتهاى ضد میکروبی بالقوه دارند. تیمار سلولهای آلوده و ماکروفاژهای اولیه با اینترفرون گاما به تولید فزاینده نیتریک اکساید (NO) و هیدروژن پراکسید (H₂O₂) منجر می‌شود. تحریک اینترفرون گاما به فعال شدن NADPH oxidase و iNOS منجر می‌گردد [۲۱]. بنابراین آنزیمهای تولیدکننده آنها، القاپذیر است. بتازگی تولید NO را در نوتروفیلها بررسی کرده و داشته‌اند که نوتروفیلها قادرند پس از تحریک به‌وسیله برخی از محرکها، نظیر PMA (فربول میریستات استات) که یک محرک مستقیم پروتئین کیناز C می‌باشد NO تولید کنند که تولید آن به‌وسیله مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) مثل N^G نومیتیل - ال - آرژینین مهار می‌شود [۲۲]. به‌علاوه اینترفرون گاما mRNA ی این آنزیم NOS₂ 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 تجزیه‌گشاهای سلولی از جمله غشای پلاسمایی و غشای ارگانلهاى داخل سلولی، تجزیه اجزای ریبوزومی، تغییر ماهیت پروتئینها و آسیب به DNA سلولی هستند. فاگوسیتها بخصوص نوتروفیلها پس از فعال شدن در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن به‌وسیله سیستم انفجار تنفسی بسیار کارآمد هستند و در این سلولها واسطه‌های فعال اکسیژن (ROS) تقریباً به‌طور انحصاری به‌وسیله NADPH اکسیداز متعلق به خانواده پروتئینهای NOX تولید می‌شوند [۲۴].

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 (uUTI)؛
ب - عفونت دستگاه ادراری پیچیده (cUTI).

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 کارآمدی 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 [۲۶]. 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

بیماران مبتلا به عفونت ادراری ناشی از اشرشیا کولی جدا شد و اثر سیپروفلوکساسین در تولید نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) 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 ۴۵ بیمار خانم 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) به وسیله 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 مشاهده میکروسکوپی 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 نیتريت مشاهده می‌شد، برای انجام مراحل بعدی تحقیق انتخاب شدند. زیرا باکتریهای گروه انتروباکتریاسه و در نتیجه اشرشیا کولی باعث تبدیل نیترات به نیتريت 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 اولیه خون وریدی به عمل آمد و بقیه بیماران از چرخه تحقیق حذف شدند. پس از انجام کشت ادرار و انکوباسیون ۲۴ 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 چرخه تحقیق حذف و فقط بیماران مبتلا به عفونت ادراری ناشی از باکتری اشرشیا کلی و حساس به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برای ادامه تحقیق انتخاب شدند.

از بیماران یکبار پس از ورود به آزمایشگاه و انجام تست U/A و U/C نمونه‌گیری خون محیطی به عمل آمد و بار دیگر طبق برنامه‌ریزی و هماهنگی به عمل 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 دوز 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 به عمل آمده و در صورت بهبودی کامل (عدم

ساعت پس از تجویز یک دوز ۵۰۰ میلی‌گرمی خوراکی در حدود ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر است. نیمه عمر آن حدود ۳/۵ تا ۴/۵ ساعت است. در عفونتهای ادراری خفیف تا متوسط ۵۰۰ mg/day خوراکی (معادل ۴۰۰mg/day فرم وریدی) در دو دوز منقسم روزانه به مدت 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^۱ و سفالور^۲ و کلوفازیمین^۳ باعث افزایش فعالیتهای فاگوسیتی می‌شوند. آنتی‌بیوتیکهای متعددی نظیر برخی ماکرولیدها، آنساماسینها^۴، آمینو گلیکوزیدها^۵ و ایزونیزید^۶ و غیره می‌توانند باعث کاهش پاسخ فاگوسیتی شوند و برخی صفات ضد التهابی را نشان دهند [۶].

تغییر عملکردهای فاگوسیتی به وسیله 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 (به صورت 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 به وسیله سیستم ایمنی و همچنین جلوگیری از تهاجم میکروارگانیزمهای فرصت طلب در پی سرکوب ایمنی، به ترتیب داروهای سرکوب‌کننده 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 سرکوب‌کننده 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

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

گلوبولهای 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 گلوبولهای قرمز آن لیز گردید. سپس لوله با محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ پر نموده و در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. نوتروفیلها را ۲ بار با محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ شستشو داده و در حجم یک میلی‌لیتر تعداد سلولها را شمارش کرده و به تعداد 2×10^6 سلول در میلی‌لیتر رساندیم. در پایان درصد زنده ماندن سلولها را با رنگ تریپان بلو ۰/۲ درصد تعیین کردیم.

۲-۴- تهیه رقت مناسب سپیروفلوکسازین برای

استفاده در محیط کشت

فرم تزریقی آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکسازین 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 سپیروفلوکسازین 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 منونوکلتر در ده چاهک کشت سلول ریخته شد که دو به دو مشابه بودند و سپس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C حاوی ۵٪ CO₂ نگهداری شد که با استفاده از خاصیت اتصال منوسیتها به کف چاهک، منوسیتها از لئوسیتها جدا شدند که این عمل با برداشتن مایع‌رویی پس از ۲ ساعت که محتوی لئوسیتهای 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 (IFN-γ/ml) (۱۰۰ IU) و در جفت چاهک سوم منوسیت، (IFN-γ) و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر LPS و در جفت چاهک چهارم منوسیت، (IFN-γ) و LPS و مهار کننده آمینوگوانیدین (AG) ۱ میلی مولار و در

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 بقیه 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^۱ 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 ۴۰۰ g سانتریفیوژ گردید. پس از ۳۰ دقیقه عناصر خونی در چند لایه مختلف در لوله جایگزین شدند که سلولهای منونوکلتر بین فایکول و پلاسما قرار می‌گیرند. لایه منونوکلتر با دقت و به‌وسیله پست پاستور استریل جدا شده و در لوله‌های استریل در پیچ‌دار ۱۵ میلی‌لیتری سه بار شستشو شدند، در شستشو هر بار ۴ تا ۵ میلی‌لیتر بافر هنکس روی سلولها اضافه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰ g سانتریفیوژ 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 منونوکلتر ته لوله یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و به تعداد 1×10^6 سلول در میلی‌لیتر رسانده و گلوبولهای قرمز آن لیز شد و درصد زنده بودن سلولهای معلق تعیین گردید [۳۲].

۲-۳- روش جداسازی نوتروفیل

برای این منظور از روش بایوم^۲ استفاده شد [۳۳-۳۵]. به‌طور خلاصه ۵ میلی‌لیتر خون انسانی را در داخل لوله ۱۵ میلی‌لیتری، که حاوی هپارین به مقدار ۵۰ IU (به‌ازای هر میلی‌لیتر خون ۱۰ IU) می‌باشد، اضافه شد [۳۶]. سپس ۵ میلی‌لیتر دکستران ۶ درصد را به خون کامل در لوله اضافه و به آرامی مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C قرار دادیم. مایع رویی، که غنی از گلبول سفید بود، را به آرامی در لوله دیگر که حاوی ۳ میلی‌لیتر فایکول بود افزوده و در دور ۲۵۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ کردیم. مایع رویی حاوی پلاسما - فایکول و لایه

1. Hanks
2. Boyum

۲-۷- روش کار برای اندازه‌گیری نیتریک

اکساید

مابع‌رویی کشتهای سلولی نوتروفیل و منوسیتی، که قبلاً جمع‌آوری و در فریزر 20°C - 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 ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف گریس (به فرمول نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید ۰/۱ درصد در آب مقطر و سولفانیل آمید یک درصد در اسید فسفریک ۵ درصد) را به آنها اضافه نموده، پس از ۱۰ دقیقه اینکوباسیون در دمای اتاق، طیفی از رنگهای ارغوانی با شدتهای مختلف براساس میزان نیتريت موجود در آنها ایجاد شد که با طول موج ۵۴۰ نانومتر و فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر میزان جذب (OD) خوانده شد [۳۸، ۳۹]. سپس منحنی استاندارد براساس غلظتهای نیتريت سدیم ترسیم گردید و با استفاده از خط رگرسیون و معادله خطی غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها با استفاده از عدد جذب (OD) آنها محاسبه و به‌صورت میکرومولار نیتريت بیان شد.

۲-۸- محاسبات آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، برای مقایسه سه گروه قبل و بعد از درمان و گروه کنترل با یکدیگر از آزمون غیر پارامتری کروسکال وایس^۵ و همچنین مقایسه گروه کنترل با بیماران گروههای پیش و پس از درمان و نیز مقایسه گروه پیش از درمان با گروه پس از درمان با یکدیگر از آزمون غیر پارامتری من ویتنی^۶ استفاده شد و در صورت $P < 0/05$ 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 نیتريك 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

جفت چاهک پنجم منوسیت و ایتترفرون گاما ($\text{IFN-}\gamma$) و LPS و ۲ 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 37°C 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 و PMA (به‌عنوان فعال کننده) و در جفت چاهک سوم سلولهای نوتروفیل، PMA و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر سیپروفلوکساسین تیمار شد سپس سلولهای کشت شده به‌مدت ۶ ساعت در اینکوباتور CO_2 دار 37°C نگهداری شدند و در نهایت، مابع‌رویی کشت سلولی در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تا زمان اندازه‌گیری NO و H_2O_2 در فریزر 20°C - نگهداری شدند.

۲-۶- اندازه‌گیری H_2O_2

برای تشخیص فعالیت سلولهای مذکور می‌توان مقدار تولید H_2O_2 را اندازه‌گیری کرد. در این مطالعه از روش والتر راج^۱ و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شده است [۳۷] در این آزمایش از همووانیلیک اسید به فرمول $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ و $M=182/18\text{g/mol}$ (غلظت ۱۰۰ میکرومول در بافر هنکس) از شرکت مرک^۲ و هورس رادیش پراکسیداز نوع ۱۲ غلظتی معادل یک واحد در میلی‌لیتر (۱IU/ml) از شرکت سیگما استفاده شد. که واکنش همووانیلیک 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^۴ با رسم منحنی استاندارد بین رفتهای ۰/۲ تا ۵۱/۲ nmol به‌دست آمد. برای مطالعه شدت واکنش و تولید فلئورسانس از دستگاه اسپکترو فلورومتر SHIMADZU-RF 5000 استفاده شد.

برای یافتن طول موج جذبی و طول موج نشری از دو لوله استاندارد استفاده گردید که به ترتیب عبارت بودند از $EM=420/8\text{nm}$ و $EX=310\text{nm}$ و سپس تمام نمونه‌ها با طول موجهای به‌دست آمده، خوانده شدند. چهار مرتبه لوله‌های استاندارد با رفتهای مختلف تهیه شد و در پنجمین مرتبه منحنی استاندارد مناسب به‌دست آمد. سپس فلئورسانس نمونه به‌وسیله دستگاه خوانده شد و از روی منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن نمونه به‌دست آمد.

1. Walter.R
2. Marck
3. (horseradish peroxidase type XII) HRP
4. Fluorescence Intensity

5. Kruskal Wallis
6. Mann -Whitney

مقایسه با گروه پیش از درمان وجود ندارد ($P < 0/05$) (نمودار ۲).

۳-۲- مقایسه غلظت NO و H₂O₂ 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. مقایسه 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 بالاتر است ($P < 0/05$). همچنین غلظت آن در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان بالاتر است ($P < 0/05$) (نمودار ۳).

مقایسه مقدار H₂O₂ 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 ($P < 0/05$). اما اختلاف معنی داری در مقدار H₂O₂ در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان وجود ندارد ($P < 0/05$) (جدول ۱).

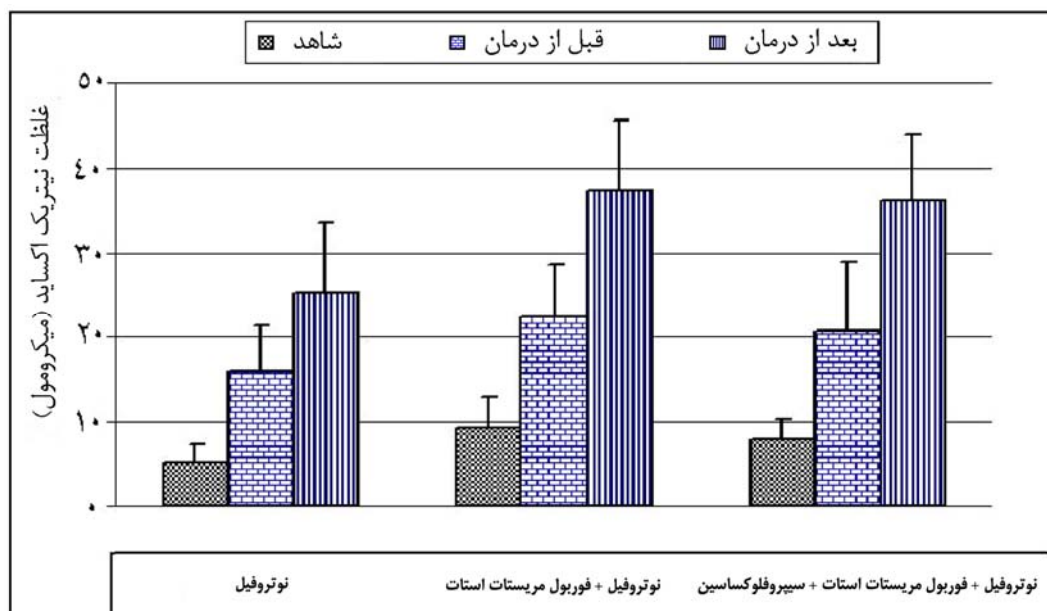
نشان داد که از لحاظ آماری با یکدیگر متفاوت هستند ($P < 0/0001$). منوسیتها و نوتروفیلهای بیماران بیشترین مقدار نیتریک اکساید (NO) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و گروه کنترل کمترین مقدار آن را تولید کرده اند.

۳-۱- مقایسه غلظت NO و H₂O₂ در چاهکهای

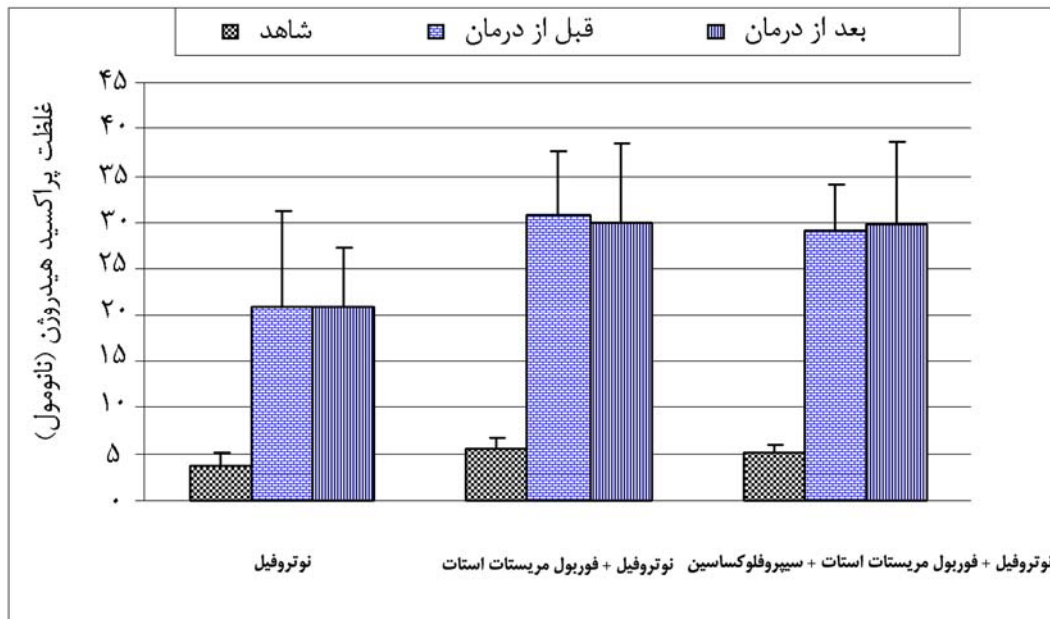
مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل

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 ($P < 0/05$). همچنین غلظت آن در گروه پس از درمان در مقایسه با گروه پیش از درمان بالاتر است ($P < 0/05$) (نمودار ۱).

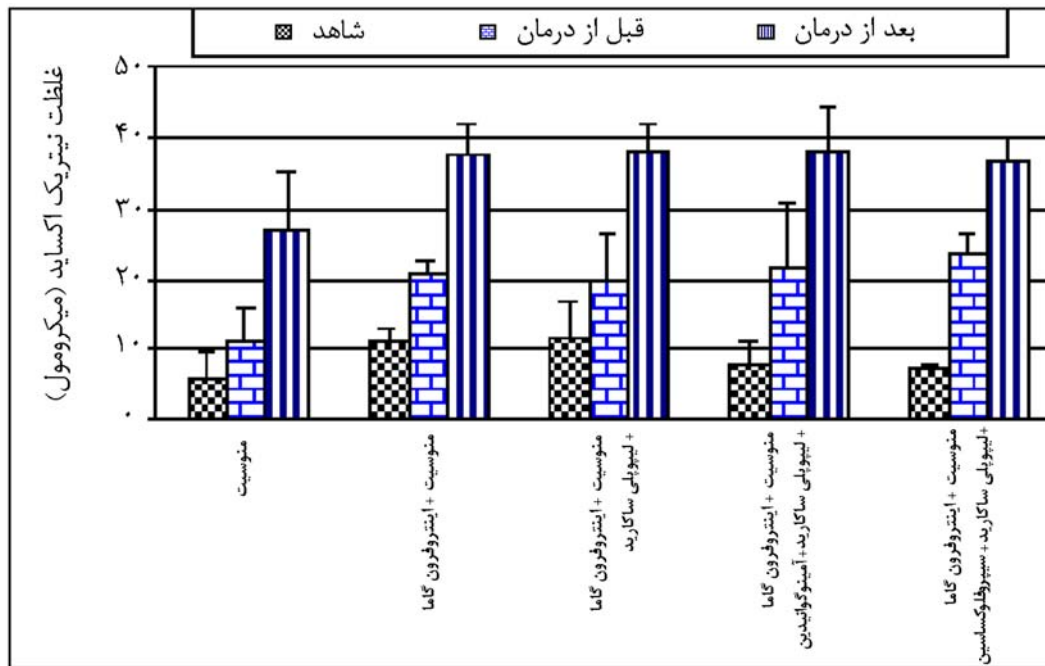
مقایسه مقدار H₂O₂ سه گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای نوتروفیل نشان داد که مقدار آن در گروه پیش از درمان و پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است ($P < 0/05$). اما اختلاف معنی داری در مقدار H₂O₂ در گروه پس از درمان در



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



نمودار ۲ مقایسه غلظت H₂O₂ (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 H₂O₂ (بر حسب نانومول) در پنج گروه چاهک مربوط به کشت سلولهای منوسیت

چاهک	شاهد	قبل از درمان	بعد از درمان
منوسیت	7 ± 1/9	18/85 ± 4/4	18/05 ± 3/3
منوسیت + اینتروفرون گاما	7/2 ± 1/8	30 ± 6/6	29/11 ± 4/9
منوسیت + اینتروفرون گاما + لیپوپلی ساکارید	7/9 ± 2	29/2 ± 7/4	29/58 ± 6/2
منوسیت + اینتروفرون گاما + لیپوپلی ساکارید + آمینوگوانیدین	7/7 ± 0/9	29/17 ± 8/1	29/7 ± 6/8
منوسیت + اینتروفرون گاما + لیپوپلی ساکارید + سیپروفلوکسائین	7/45 ± 3/1	28/92 ± 1/9	30/11 ± 4/8

$P > 0.05$ است. جدول ۱ بیانگر غلظت H₂O₂ (بر حسب نانومول) تولید شده در منوسیت‌هاست که افزایشی در مقدار این محصول نیز دیده نمی‌شود و مقایسه درون‌گروهی آن نشان می‌دهد که در همه موارد $P > 0.05$ است.

۴- 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 تعدیل‌کننده 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 نیمه عمر سلولها نیز مؤثر می‌باشند [۴۰]. 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^۱ و همکاران اثر فلوروکینولونها از جمله سیپروفلوکساسین را در افزایش تولید IL-۲ و اینترفرون گاما، IL-۱ α ، IL-۳ و IL-۴ و GM-CSF و TNF- α و لنفوتوکسین در لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده در *in Vitro* نشان دادند [۴۱]. 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 [۴۲] و از طرفی از داروهای نفوذکننده به‌داخل سلول است. برای مثال غلظت آن در داخل نوتروفیلها و منوسیتها به ترتیب ۴ تا ۸ و ۵ تا ۱۰ 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 [۴۳] و دارای اثر مستقیم بر آنزیم مؤثر در همانند سازی DNA است. نتایج مقایسه سه گروه مختلف نشان می‌دهد که میزان نیتریک

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 به صورت مجزا به دست آمده است که به صورت مقایسه درون‌گروهی غلظت NO و H₂O₂ در چاهکهای حاوی سلولهای نوتروفیل و منوسیت با چاهکهای مشابه همراه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین انجام شده که به صورت 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 به ترتیب (۶/۴ \pm ۲۲/۱۸) و (۸/۳ \pm ۲۰/۶۸) و در گروه بعد از درمان به ترتیب (۸/۲ \pm ۳۷/۳۹) و (۷/۷ \pm ۳۶/۴۲) و در گروه کنترل به ترتیب (۳/۸ \pm ۸/۲) و (۲/۲ \pm ۹/۱) به دست آمده است که مقایسه درون‌گروهی این چاهکهای مشابه نشان می‌دهد که مقدار غلظت NO افزایش نیافته است ($P > 0.05$). غلظت H₂O₂ (بر حسب نانومول) در گروه قبل از درمان به ترتیب (۶/۸ \pm ۳۰/۸۵) و (۴/۸ \pm ۲۹/۲۵) و در گروه بعد از درمان به ترتیب (۸/۴ \pm ۳۰/۱) و (۹ \pm ۲۹/۷) و در گروه کنترل به ترتیب (۱/۱ \pm ۵/۶) و (۰/۹ \pm ۵/۱۱) به دست آمده است که مقایسه درون‌گروهی آنها نشان می‌دهد که افزایشی در مقدار غلظت H₂O₂ (بر حسب نانومول) نیز مشاهده نمی‌شود ($P > 0.05$).

۳-۳-۲- منوسیتها

غلظت NO (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 به ترتیب (۶/۵ \pm ۲۰/۰۲) و (۲/۷ \pm ۲۳/۵۸) و در گروه پس از درمان به ترتیب (۳/۸ \pm ۳۷/۸۷) و (۳/۴ \pm ۳۶/۶۷) و در گروه کنترل به ترتیب (۵/۱ \pm ۱۱/۷) و (۰/۹ \pm ۷) به دست آمده است که مقایسه درون‌گروهی این چاهکهای مشابه نشان می‌دهد اثری از افزایش غلظت NO مشاهده نمی‌شود و در همه موارد

و تنها اثر آن بر چگونگی بلع و فاگوسیتوز باکتری بررسی شده است همچنین رازیبیک^۱ و همکاران بیان داشته‌اند که فلوروکینولونها از جمله سپروفلوکساسین با اثر روی لنفوسیتها باعث افزایش تولید $IFN-\gamma$ می‌شوند [۴۱] که یکی از محرکهای مهم در تولید NO است؛ بنابراین تأییدکننده نتیجه این تحقیق در *Vivo* و *Vitro* بوده و نشاندهنده 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 ($P < 0.05$) و این تفاوت بین دو گروه پیش و پس از درمان مشاهده نمی‌شود ($P < 0.05$). البته دلیل آن با توجه به تحقیق انجام شده اس ال نیل سون^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۷، مبنی بر نبود اثر چهار آنتی‌بیوتیک خانواده فلوروکینولونها از جمله سپروفلوکساسین بر مکانیسم کشتن وابسته به اکسیژن و عدم تولید آنیون سوپراکساید با این آنتی‌بیوتیک است [۴۵] و نیز می‌تواند دلیل دیگری داشته باشد، که به وسیله جوسوس ردوناس^۳ اثبات کرده است، مبنی بر این‌که افزایش تولید NO از طریق اثر مستقیم آن روی آنزیم NADPH اکسیداز لکوسیتها چند هسته‌ای باعث مهار تولید سوپراکسید آنیون می‌شود [۴۶].

در جفت چاهک چهارم به منوسیتها علاوه بر $IFN-\gamma$ و LPS مهارکننده آمینوگوانیدین نیز اضافه شد که این ماده یک مهارکننده آنزیم NOS_۲ است. این ملکور از نظر شباهتی که با آرژینین دارد به جای آرژینین در واکنش تولید NO به وسیله NOS_۲ شرکت می‌کند اما مانند آرژینین توانایی تولید NO را ندارد. مقدار ۱mM از مهارکننده 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 مهارکننده آمینوگوانیدین روی سلولهای منوسیت انسانی و نیاز احتمالی آن مقداری بالاتر مشخص شد.

مقایسه 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 ($P > 0.05$) که به نظر می‌رسد آنتی‌بیوتیک مذکور از این نظر هیچ اثر مستقیم یا غیرمستقیم بر سلولهای نوتروفیل ندارد. با توجه به

اکساید (NO) مترشح از نوتروفیلها و منوسیتها در گروه بیماران (پیش و پس از درمان) در مقایسه با گروه کنترل بسیار بالاتر است ($P < 0.05$) که دلیل آن وجود عفونت و عامل بیماریزا، یعنی باکتری اشرشیاکلی در گروه بیماران و نبود آن در گروه شاهد یا کنترل است که به علت 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 ($P < 0.05$) 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 در تحریک 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 به نام آنتی‌بیوتیک سپروفلوکساسین است که نشاندهنده اثر تحریکی آنتی‌بیوتیک در تولید NO به وسیله نوتروفیلها و منوسیتهاست. برای بررسی این‌که آیا تغییر ایجاد شده مستقیماً روی نوتروفیلها و منوسیتها اعمال شده و یا به طور غیر مستقیم از طریق عوامل مختلف در بدن اعمال شده، مقایسه درون‌گروهی انجام شده است که در آن دو گروه چاهک مربوط به نوتروفیلها و منوسیتها که فقط در وجود آنتی‌بیوتیک سپروفلوکساسین با هم متفاوتند با هم مقایسه شده‌اند که تفاوت معنی‌داری بین این دو چاهک مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقایسه 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 ($P > 0.05$). وجود افزایش غلظت NO در داخل بدن، نشاندهنده نبود 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 شده فورسگرن^۱ و همکاران در سال ۱۹۸۵ بیانگر آن است که کینولونها تست شده از جمله سپروفلوکساسین مستقیماً بر سلولهای فاگوسیت اثر نداشته، اما می‌توانند باکتری را برای فاگوسیتوز و کشتن مستعد کنند [۴۴] 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 سپروفلوکساسین در بدن نداشته

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

1. Forsgren

جدا شده از موشهای سالم و آلوده انجام گرفته، نشانگر تفاوت اثر برخی کینولونها مانند اوربی فلوکساسین از نظر تولید NO و درصد سولهای NBT مثبت و درصد فاگوسیتوز ماکروفاژها در دو گروه ذکر شده، است [۵۰]. بنابراین آنتی بیوتیک 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.

۵- 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.

نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد تغییرات موجود ناشی از اثر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین روی عوامل مختلف از قبیل فاکتورهای نسخه برداری، تولید سایتوکاین [۴۷] و غیره باشد؛ زیرا رایزیک و همکاران [۴۸] و هلن اف^۱ و همکاران [۴۹] نشان داده‌اند که سیپروفلوکساسین باعث افزایش القای ژن کدکننده IL-۲ شده و همچنین غلظت فاکتورهای هسته‌ای سلولهای T فعال شده نوع یک (NF-AT-۱) و پروتئین فعال کننده نوع یک (AP-۱) را افزایش می‌دهد و این فاکتورها از فاکتورهای نسخه برداری هستند. بنابراین سیپروفلوکساسین با مسیر مشترک تنظیمی چندین سایتوکاین تداخل می‌کند. بنابراین همانطور که همین متخصصان ثابت کرده‌اند، باعث افزایش سطح mRNA کدکننده بسیاری از سایتوکاین‌ها می‌شود. باید خاطر نشان کرد که تحقیقات انجام شده به وسیله محققان اغلب روی سلولهای فاگوسیت افراد داوطلب سالم و در *Vitro* انجام شده است و تحقیقات *Szczyпка* که روی دو گروه سلولهای منوسیت موشی

۶- 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 functional heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 1988; 1: 26–35.

1. Helen F

- [14] Labro M T. Antibacterial agents—phagocytes: new concepts 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, Locksley RM. 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 oxide related antimicrobial activity. *J Clin Investig* 1997; 99: 2818-2825.
- [21] Brennan R E, Russel K, Zhang G, Samuel E. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH Oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infection. *Infect 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. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *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 fluoroquinolone 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 staphylococcus aureus 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 granulocytes 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, Baggolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils

- 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; **74**: 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 proinflammatory 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 Staphylococcus 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 - κ B, 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.