مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۰، شماره ۵ ، صفحات ۳۵۴ تا ۳۶۳، (۱۳۸۱)

بررسی ارتباط بین قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و دو عملکرد سیستم ایمنی (پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها و حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها

دکتر شهین پیش‌بین* (کارشناس ارشد ایمونولوژی)، دکتر نعمت‌ال... خوانساری** (استاد)، دکتر مژگان شایگان ***(استادیار ایمونولوژی)
*دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** سازمان انتقال خون ایران

چکیده

مقدمه: بدن انسان از ابتدای تولد در معرض ترکیبات اکسیدان و رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرد. این ترکیبات به شدت فعال بوده و با مولکولهای حیاتی واکنش می‌دهند. در داخل بدن موجودات زنده جهت مقابله با تهاجم ترکیبات اکسید کننده سیستم دفاعی بیولوژیک آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. ترکیبات فعال اکسیژن در سلول‌های سیستم ایمنی، همانند دیگر سلول‌ها، به عنوان بخشی از متابولیسم طبیعی سلول و نیز در بعضی از این سلول‌ها بعنوان قسمتی از فعالیت اختصاصی آنها (مانند فاگوسیتوز) بوجود می‌آیند. آنتی‌اکسیدان‌ها با ممانعت از بروز آسیب‌های اکسیداتیو وارده به اجزاء مختلف سلول‌های سیستم ایمنی، شرایط را جهت عملکرد بهینهٔ سلولهای این سیستم مهیا می‌سازند.

مواد و روشها: مطالعه حاضر از اسفندماه ۱۳۷۸ لغایت آبان‌ماه ۱۳۷۹ در بخش ایمنولوژی آزمایشگاه مرکزی سازمان انتقال خون ایران و نیز در گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. این مطالعه به روش همخوانی (Correlational) انجام شده که در آن ارتباط بین میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و دو عملکرد عمدهٔ سلولهای سیستم ایمنی شامل پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها [(تست Lymphocyte Transformation Test (LTT به روش الیزا] و حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها (تست کموتاکسی) مورد بررسی قرار گرفته است. افراد تحت مطالعه در این بررسی ۶۰ زن و مرد سالم ۶۰-۲۱ ساله بوده‌اند. پس از اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما [به روش Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay (FRAP)] و انجام تست‌های LTT و کموتاکسی بر روی نمونهٔ خون این افراد، آزمون آماری همبستگی اسپیرمن بین متغیر قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و متغیرهای پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها و حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها انجام گردید.

یافته ها: نتایج بدست آمده نشان دادند که بین قدرت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و دو متغیر نامبرده همبستگی معنی‌داری ($p<0/0001$) وجود دارد.

نتیجه گیری و توصیه ها: به نظر می‌رسد آنچه که اهمیت دارد، حفظ تعادل اکسیدان نسبت به آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این امر معیاری مهم در عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی محسوب می‌شود.

مقدمه

بدن انسان از بدو تولد در معرض ترکیبات اکسیدان و رادیکالهای آزاد قرار دارد. این ترکیبات به شدت فعال بوده و با مولکولهایی چون پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها، DNA و ... واکنش داده و موجب آسیب اکسیداتیو آنها می‌شوند. مولکولهای ذکر شده جهت بقاء و فعالیت تمامی سلولها بسیار حیاتی هستند و آسیب آنها به اختلال در عملکرد سلول منجر می‌شود. چنانچه این آسیب شدید بوده و یا تداوم داشته باشد، می‌تواند به مرگ سلول منتهی شود (۱).

ترکیبات اکسیدان می‌توانند منشاء درونی یا برونی داشته باشند. از مهمترین منابع محیطی این ترکیبات اشعه‌های یونیزان (مانند اشعه ماوراء بنفش)، ازن موجود در هوا، آلاینده‌هایی چون NO_2، دودهای فتوشیمیایی، مواد شیمیایی صنعتی، بعضی از حلال‌های آلی و داروها، ترکیبات بیهوش کننده، DDT، استعمال دخانیات و رادیکال‌های آزاد موجود در غذاهای سرخ کرده می‌باشند (۱،۲،۳).

در بدن موجودات زنده از جمله انسان چهار منبع عمده مولد ترکیبات اکسیدان فعال شامل انتقال الکترون میتوکندریایی، انفجار تنفسی در سلول‌های بیگانه‌خوار، متابولیسم اسیدهای چرب در پرکسیزوم (Proxisome) و نهایتاً واکنش‌های سیتوکروم p450 مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱،۳،۴).

بدن انسان و دیگر موجودات با این عوامل مخرب، همانند دیگر عواملی که سلامتی و حیات انسان را تهدید می‌نمایند، به مبارزه می‌پردازد. در داخل بدن موجودات زنده، جهت مقابله با تهاجم ترکیبات اکسید کننده، سیستم دفاعی بیولوژیک آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. در این سیستم دفاعی ترکیباتی یافت می‌شوند که مستقیماً با عوامل اکسید کننده واکنش داده و آنها را خنثی می‌سازند. این ترکیبات متنوع بوده و از جمله آنها ترکیبات آنتی‌اکسیدان با وزن مولکولی پایین (مانند ویتامین E، ویتامین C، بتاکاروتن، گلوتاتیون، اسیداوریک)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و ترکیبات کیلاتور (Chelator) یون‌های فلزی می‌باشند. علاوه بر این، ترکیبات و آنزیم‌هایی که اجزاء سلولی صدمه دیده توسط عوامل اکسید کننده را ترمیم می‌نمایند (مانند لیپاز، پروتئاز، ترانسفرازها و آنزیم‌های ترمیم DNA) نیز جزء این سیستم دفاعی محسوب می‌شوند (۵).

به هر دلیلی که غلظت سرمی و یا داخل سلولی آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یابد، ترکیبات اکسیدکننده فعال که آزاد مانده و خنثی نشده‌اند، می‌توانند به سلول آسیب برسانند. برای مثال اکسیداسیون پروتئین‌های مهم درون سلولی یعنی آنزیم‌ها موجب اختلال در عملکرد آنها شده، در اثر پراکسیداسیون لیپید غشاءهای سلولی، انسجام و ثبات غشاء از بین رفته و آسیب اکسیداتیو مولکول DNA می‌تواند به ایجاد جهش منجر شود، مضافاً، ترکیبات اکسیدکننده باعث افزایش سرعت میتوز گشته و در نتیجه شانس وقوع بدخیمی را افزایش می‌دهند (۶).

در سلول‌های سیستم ایمنی نیز طی متابولیسم هوازی طبیعی این سلول‌ها و نیز عملکرد اختصاصی بعضی از این سلول‌ها مثل فاگوسیتوز، ترکیبات فعال اکسیدان بوجود می‌آیند. به دلیل آنکه در غشاء این سلول‌ها اسیدهای چرب غیراشباع زیادی وجود دارد، سلولهای سیستم ایمنی به آسیب اکسیداتیو بسیار حساسند. در اثر اکسیداسیون این اسیدهای چرب، شناوری غشاء سلول کاهش می‌یابد و بسیاری از اعمال حیاتی سلولهای این سیستم که غشاء آن در آن دخالت دارد، مختل می‌شود (۷). همچنین مولکول‌های پروتئینی داخل غشاء، گیرنده‌های غشایی، آنزیم‌های داخل سلولی و نیز DNA سلول دچار آسیب اکسیداتیو می‌شوند (۸،۹،۱۰).

مشاهده شده است که در اثر مواجه شدن لنفوسیت‌های انسان با H_2O_2، پاسخ تکثیری این سلول‌ها به میتوژنها و نیز تولید IL-2 در آنها به شدت کاهش می‌یابد. در این مطالعه مشخص شد که آنتی‌اکسیدان‌هایی چون ویتامین E و ان- استیل‌سیستئین موجب حذف این اثرات مهاری می‌شوند (۱۱). در مطالعه درون‌تنی روی موشها مشخص شده است که مصرف کاروتینوئیدها موجب افزایش میزان تکثیر لنفوسیت‌ها در پاسخ به محرک‌ها می‌شود (۱۲). در انسان هم مشاهده شده است که در افراد مسن مصرف ویتامین E همین اثر را دارد (۱۳). ثابت شده است که مصرف روزانهٔ اسیداسکوربیک، آلفاتوکوفرول و بتاکروتن موجب افزایش تولید سایتوکاین‌های TNFα, IL-2, IL-1 و نیز IL-2R می‌شوند (۱۴،۱۵).

نظر به اینکه طی عمل فاگوسیتوز ترکیبات اکسیدان به میزان زیادی تولید می‌شوند، تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بروی مراحل مختلف این روند بررسی شده است. مشخص شده که آنتی‌اکسیدان‌ها غشاء سلول‌های فاگوسیت‌کننده را در قبال اثرات اکسیداتیو ترکیبات اکسیدان تولید شده، محافظت می‌نمایند (۱۶). دیده شده است که در رات‌هایی که دچار کمبود ویتامین E بوده‌اند، کموتاکسی سلولهای PMN مختل می‌شود (۱۷). در تحقیق دیگری مشاهده شده است که آنتی‌اکسیدان‌هایی چون ویتامین E، ویتامین C و گلوتاتیون موجب بهبود کموتاکسی و بلع ذرات بیگانه در ماکروفاژها می‌شود (۱۸).

با توجه به اینکه تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است عمدتاً نشانگر تأثیر مثبت آنتی‌اکسیدان‌ها بر عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی می‌باشد، این موضوع مطرح گردید که سطح خونی ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌تواند معیار ارزشمندی جهت اطمینان از مهار آسیب اکسیداتیو سلولهای سیستم ایمنی باشد. همچنین در صورتی‌که نقص یا ضعف سیستم ایمنی وجود نداشته باشد، از این معیار می‌توانیم جهت اطمینان از عملکرد بهینهٔ سلولهای این سیستم استفاده نمائیم.

تا آنجایی که اطلاعات موجود نشان می‌دهند، در تحقیقاتی که تاکنون در این مورد انجام شده، اثرات آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بر عملکرد سیستم ایمنی بصورت مجزا بررسی شده است. با توجه به اثر متقابل آنتی‌اکسیدان‌ها بر هم و اینکه اندازه‌گیری میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما بسیار ساده‌تر، سریعتر و ارزانتر از سنجش تک‌تک آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌شود، در این تحقیق اندازه‌گیری میزان این قدرت و بررسی ارتباط آن با عملکرد سیستم ایمنی مدنظر قرار گرفت. این روش می‌تواند بصورت تستی رایج در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی درآید. اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما در افراد مسن و نیز افراد تحت استرس اکسیداتیو (مانند اعمال جراحی و عفونت‌ها) برای پزشک معالج حائز اهمیت است که با انجام مرتب این تست و تجویز مکمل‌های غذایی و یا رژیم غذایی خاص می‌توان میزان آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما را در سطح مطلوب نگه داشت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از اسفند ماه ۱۳۷۸ لغایت آبان‌ماه ۱۳۷۹ در بخش ایمنولوژی آزمایشگاه مرکزی سازمان انتقال خون ایران و نیز در گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. این مطالعه به روش همخوانی (Correlational) انجام شده است. در این بررسی جمعیت مورد مطالعه ۶۰ زن و مرد ۲۱ تا ۶۰ ساله بودند. این افراد ظاهراً هیچ بیماری مشخصی نداشته و هیچ نوع دارویی نیز مصرف نمی‌کردند. جهت اطلاع از این وضعیت به گفته خود فرد استناد شده است. در مرحله اول انتخاب افراد، ابتلا به هرگونه عفونت، داشتن هر نوع بدخیمی یا هر نوع آسیب‌بافتی، همچنین مصرف هر نوع دارو، استعمال دخانیات و یا مصرف مشروبات الکلی موجب خروج افراد از مطالعه می‌گردید. در مرحله دوم انتخاب افراد تست‌های تعیین سلامتی شامل اسیداوریک، اوره، بیلی‌روبین، کراتی‌نین، SGOT، SGPT برای تمامی افراد انتخاب شده، انجام شد. این تست‌ها عمدتاً عملکرد کلیه و کبد را می‌سنجند که بیشترین تأثیر را روی تست سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما می‌گذارند. در این مرحله نیز چنانچه تنها یکی از این مقادیر خارج از حد طبیعی بود آن فرد از مطالعه خارج می‌گردید. لازم به ذکر است که افراد تحت مطالعه، داوطلبانه در این تحقیق مشارکت داشته‌اند و از تمامی آنها رضایت‌نامه کتبی اخذ گردیده است. پس از انتخاب نهایی، از افراد تحت مطالعه طی یک نوبت خونگیری نمونه خون کامل و پلاسما گرفته شد و در مرحله بعد تست FRAP جهت اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و تست LTT جهت اندازه‌گیری فعالیت تکثیری لنفوسیت‌ها و نیز تست کموتاکسی جهت تعیین میزان حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها بر روی نمونهٔ گرفته شده از این افراد انجام شد. لازم به ذکر است که تست LTT انجام شده در این بررسی به روش الیزا با استفاده از کیت تکثیر سلولی محصول Bohringer Manheim آلمان انجام گردید (۱۹). در تست کموتاکسی نیز میزان حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها از میان فیلتر مخصوص به سمت غلظت‌های نانومولار ترکیب جاذب شیمیایی [ان- فورمیل‌میتیونیل‌لوسیل‌فنیل‌آلانین (FMLP), Formyl Methionyl lucin phenyl alanin] اندازه‌گیری گردید (۲۰).

روش FRAP جهت اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما

جهت اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام مایعات بیولوژیک روش‌های مختلفی وجود دارد. از میان این روش‌ها، تست FRAP آزمایشی ساده، سریع و ارزان است و علاوه بر آن از صحت و دقت خوبی برخوردار است. همچنین نتایج حاصله از این تست به میزان زیادی قابلیت تکرار دارند (۲۱). در این روش میزان دخالت پروتئین‌های سرم پایین‌تر از دیگر روش‌ها بوده ولی میزان مشارکت آنتی‌اکسیدان‌های غذایی (مانند ویتامین‌های E و C و بتاکاروتن) بالاتر می‌باشد (۲۲). مشاهده شده است که تست سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما به روش FRAP جهت نشان دادن تغییرات ایجاد شده در وضعیت آنتی‌اکسیدانی خون فرد به موازات افزایش دریافت آنتی‌اکسیدان‌های غذایی حساس و دقیق می‌باشد (۲۱). با توجه به دلایل ذکر شده این روش جهت رایج شدن در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، تستی مناسب به نظر می‌رسد.

اساس تست FRAP

اساس این روش به این صورت است که کمپلکس فریک‌تری‌پیریدیل تری‌آزین توسط آنتی‌اکسیدان‌های نمونه، احیاء شده و به فرم فروس در می‌آید که این ترکیب به رنگ آبی تیره است و شدت این رنگ ایجاد شده در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در حقیقت به علت آنکه ترکیبات آنتی‌اکسیدان اصلی که آنتی‌اکسیدان‌های غذایی جزو آنها هستند، با دادن الکترون به ترکیب اکسیدان آنرا احیاء می‌نمایند، در این روش قدرت آنتی‌اکسیدانی با قدرت احیاءکنندگی این ترکیبات برابر گرفته شده است. میزان رنگ ایجاد شده با قدرت تام احیاءکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه نسبت مستقیم دارد. در این تست از محلول دارای Fe^{2} (محلول سولفات آهن) به عنوان استاندارد استفاده می‌شود که واکنش Fe^{2} با معرف کار FRAP نشانگر یک تعویض الکترون بوده که یک واحد محسوب می‌گردد (۲۱).

در روش FRAP هنگامی که آزمایش در شرایطی روی پلاسما انجام شود که Fe^{3} به معرف کار اضافه نشده باشد، هیچ رنگی مشاهده نمی‌شود. این امر نشانگر آن است که فروس آزاد قابل سنجش در پلاسما وجود ندارد و نیز هیچ عامل قابل سنجشی در پلاسما وجود ندارد که مستقیما با 2, 4, 6 tripyridyltiazine (TPTZ) واکنش داده و رنگ ایجاد نماید (۲۱).

مشاهده شده است که در انجام تست FRAP، مخلوط واکنش محتوی پلاسما هیچ کاهشی را در جذب نوری، حداقل طی زمان ۳۰ دقیقه پس از مخلوط نمودن و معرف، نشان نمی‌دهد. از این امر می‌توان چنین نتیجه گرفت که در محیط واکنش هیچ عاملی که موجب مهار احیاء Fe^{3} و یا اکسیداسیون مجدد Fe^{2} شود، وجود ندارد. (قابل ذکر است که سرولوپلاسمین موجود در پلاسما که دارای فعالیت فرواکسیدازی است به علت pH پایین محیط واکنش و نیز غلظت بالای یون کلراید موجود در محیط، فعال نمی‌باشد).

مواد و وسایل مورد نیاز

TPTZ، اسیدکلریدریک، سدیم استات‌تری‌هیدرات، اسید استیک‌گلاسیال، کلرور آهن، اسید اسکوربیک که همگی این مواد از شرکت Merck خریداری شدند. همچنین سولفات آهن ۷ آبه که از شرکت Riedel-de Hean تهیه گردید.

آماده‌سازی مواد

بافر استات ۳۰۰ ملی‌مولار، pH=۳/۶

معرف TPTZ: محلول ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار تهیه می‌شود.

معرف کلرور آهن ۲۰ میلی‌مولار

معرف آماده کار FRAP: جهت تهیه این معرف محلول‌های بافر استات، معرف TPTZ و معرف کلرور آهن به نسبت ۱۰ :۱ :۱ مخلوط می‌شوند. این معرف بایستی تازه و به هنگام نیاز تهیه شود.

معرف استاندارد: محلول سولفات آهن ($FeSO_4.\ 7H_2O$) با غلظت‌های ۱۰۰۰-۱۰۰.

محلول کنترل: محلول اسیدآسکوربیک خالص با غلظت‌های مشخص در آب مقطر تهیه می‌شود.

روش کار

در ابتدا ۳ میلی‌لیتر از معرف کار FRAP را در لوله آزمایش ریخته سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد به آن اضافه می‌شود. پس از مخلوط نمودن، لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه در درجهٔ حرارت اطاق انکوبه می‌شوند. پس از گذشت این زمان شدت رنگ حاصله در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل شاهد (معرف FRAP) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۱).

روش FRAP جهت اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما

جهت اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام مایعات بیولوژیک روش‌های مختلفی وجود دارد. از میان این روش‌ها، تست FRAP آزمایشی ساده، سریع و ارزان است و علاوه بر آن از صحت و دقت خوبی برخوردار است. همچنین نتایج حاصله از این تست به میزان زیادی قابلیت تکرار دارند (۲۱). در این روش میزان دخالت پروتئین‌های سرم پایین‌تر از دیگر روش‌ها بوده ولی میزان مشارکت آنتی‌اکسیدان‌های غذایی (مانند ویتامین‌های E و C و بتاکاروتن) بالاتر می‌باشد (۲۲). مشاهده شده است که تست سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما به روش FRAP جهت نشان دادن تغییرات ایجاد شده در وضعیت آنتی‌اکسیدانی خون فرد به موازات افزایش دریافت آنتی‌اکسیدان‌های غذایی حساس و دقیق می‌باشد (۲۱). با توجه به دلایل ذکر شده این روش جهت رایج شدن در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، تستی مناسب به نظر می‌رسد.

اساس تست FRAP

اساس این روش به این صورت است که کمپلکس فریک‌تری‌پیریدیل تری‌آزین توسط آنتی‌اکسیدان‌های نمونه، احیاء شده و به فرم فروس در می‌آید که این ترکیب به رنگ آبی تیره است و شدت این رنگ ایجاد شده در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در حقیقت به علت آنکه ترکیبات آنتی‌اکسیدان اصلی که آنتی‌اکسیدان‌های غذایی جزو آنها هستند، با دادن الکترون به ترکیب اکسیدان آنرا احیاء می‌نمایند، در این روش قدرت آنتی‌اکسیدانی با قدرت احیاءکنندگی این ترکیبات برابر گرفته شده است. میزان رنگ ایجاد شده با قدرت تام احیاءکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه نسبت مستقیم دارد. در این تست از محلول دارای Fe^{2} (محلول سولفات آهن) به عنوان استاندارد استفاده می‌شود که واکنش Fe^{2} با معرف کار FRAP نشانگر یک تعویض الکترون بوده که یک واحد محسوب می‌گردد (۲۱).

در روش FRAP هنگامی که آزمایش در شرایطی روی پلاسما انجام شود که Fe^{3} به معرف کار اضافه نشده باشد، هیچ رنگی مشاهده نمی‌شود. این امر نشانگر آن است که فروس آزاد قابل سنجش در پلاسما وجود ندارد و نیز هیچ عامل قابل سنجشی در پلاسما وجود ندارد که مستقیما با 2, 4, 6 tripyridyltiazine (TPTZ) واکنش داده و رنگ ایجاد نماید (۲۱).

مشاهده شده است که در انجام تست FRAP، مخلوط واکنش محتوی پلاسما هیچ کاهشی را در جذب نوری، حداقل طی زمان ۳۰ دقیقه پس از مخلوط نمودن و معرف، نشان نمی‌دهد. از این امر می‌توان چنین نتیجه گرفت که در محیط واکنش هیچ عاملی که موجب مهار احیاء Fe^{3} و یا اکسیداسیون مجدد Fe^{2} شود، وجود ندارد. (قابل ذکر است که سرولوپلاسمین موجود در پلاسما که دارای فعالیت فرواکسیدازی است به علت pH پایین محیط واکنش و نیز غلظت بالای یون کلراید موجود در محیط، فعال نمی‌باشد).

مواد و وسایل مورد نیاز

TPTZ، اسیدکلریدریک، سدیم استات‌تری‌هیدرات، اسید استیک‌گلاسیال، کلرور آهن، اسید اسکوربیک که همگی این مواد از شرکت Merck خریداری شدند. همچنین سولفات آهن ۷ آبه که از شرکت Riedel-de Hean تهیه گردید.

آماده‌سازی مواد

بافر استات ۳۰۰ ملی‌مولار، pH=۳/۶

معرف TPTZ: محلول ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار تهیه می‌شود.

معرف کلرور آهن ۲۰ میلی‌مولار

معرف آماده کار FRAP: جهت تهیه این معرف محلول‌های بافر استات، معرف TPTZ و معرف کلرور آهن به نسبت ۱۰ :۱ :۱ مخلوط می‌شوند. این معرف بایستی تازه و به هنگام نیاز تهیه شود.

معرف استاندارد: محلول سولفات آهن ($FeSO_4.\ 7H_2O$) با غلظت‌های ۱۰۰۰-۱۰۰.

محلول کنترل: محلول اسیدآسکوربیک خالص با غلظت‌های مشخص در آب مقطر تهیه می‌شود.

روش کار

در ابتدا ۳ میلی‌لیتر از معرف کار FRAP را در لوله آزمایش ریخته سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد به آن اضافه می‌شود. پس از مخلوط نمودن، لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه در درجهٔ حرارت اطاق انکوبه می‌شوند. پس از گذشت این زمان شدت رنگ حاصله در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل شاهد (معرف FRAP) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۱).

محاسبه نتایج

با استفاده از فرمول زیر قدرت آنتی‌اکسیدانی تام هر نمونه محاسبه گردید:

$$\text{FRAP Value of test sample } (\mu M) = \frac{0-6\ \min \Delta A_{593nm}^{Testsample}}{0-6\ \min \Delta A_{593nm}^{standard}} \times \text{FRAP Value of standard } (\mu M)$$

کنترل کیفی روش FRAP

جهت اطمینان از این امر که نتایج حاصله از این تست با واقعیت منطبق هستند، از روش‌های آماری مناسب استفاده گردید (۲۳). در این بررسی جهت کنترل دقت آزمایش روزانه با هر سری از آزمایشات یک نمونهٔ مشخص (پلاسمای Pooled کهنهٔ فریز شده در ۷۰- درجه که با قرار دادن آن در ۴ درجه به مدت یک شب ذوب شده بود و یا محلول استاندارد با غلظت مشخص) به دفعات زیاد (حداقل ۱۵ بار) نیز تست شد. هر بار درصد ضریب تغییرات (CV) اندازه‌گیری گردید تا اطمینان حاصل شود که این عامل از ۵٪ کمتر بوده و آزمایش از دقت کافی برخوردار است.

جهت بررسی خطی بودن پاسخ‌ها غلظت‌های مختلفی از استاندارد تهیه و میزان FRAP آنها اندازه‌گیری گردید. منحنی بدست آمده در اغلب موارد نشانگر خطی بودن پاسخ‌ها بود.

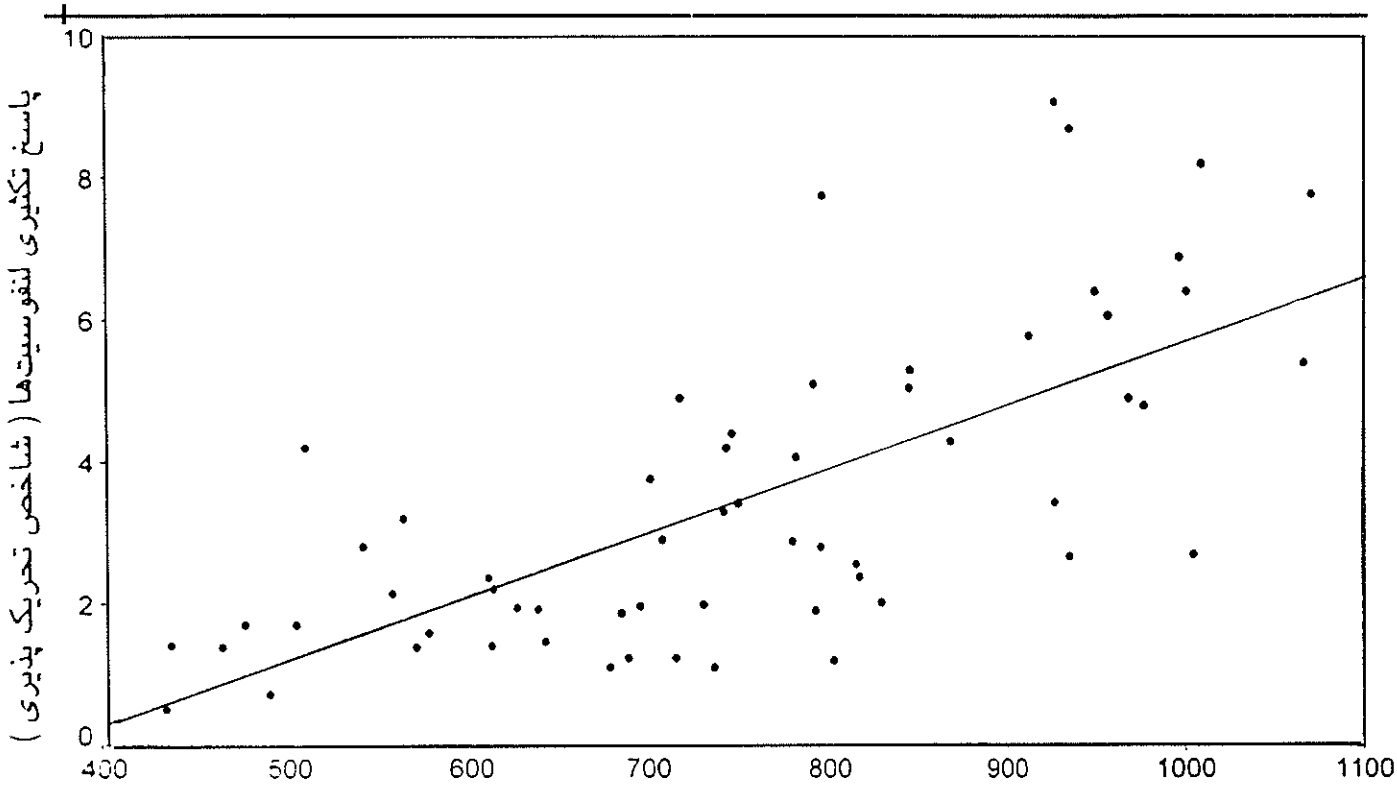
به منظور اطمینان از صحت پاسخ‌های حاصله با استفاده از نمونه‌های مختلف درصد انحراف از صحت (درصد خطا) نیز محاسبه گردید (میزان درصد خطا حداکثر تا ۱۰٪ قابل قبول در نظر گرفته می‌شد). در ابتدا جهت تعیین درصد خطاف محلول استاندارد با غلظت مشخص تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت، سپس میزان FRAP هم از روی منحنی استاندارد و هم توسط فرمول اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد درصد خطا توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Bias} = \frac{\text{عدد تئوری} - \text{عدد بدست آمده}}{\text{عدد تئوری}}$$

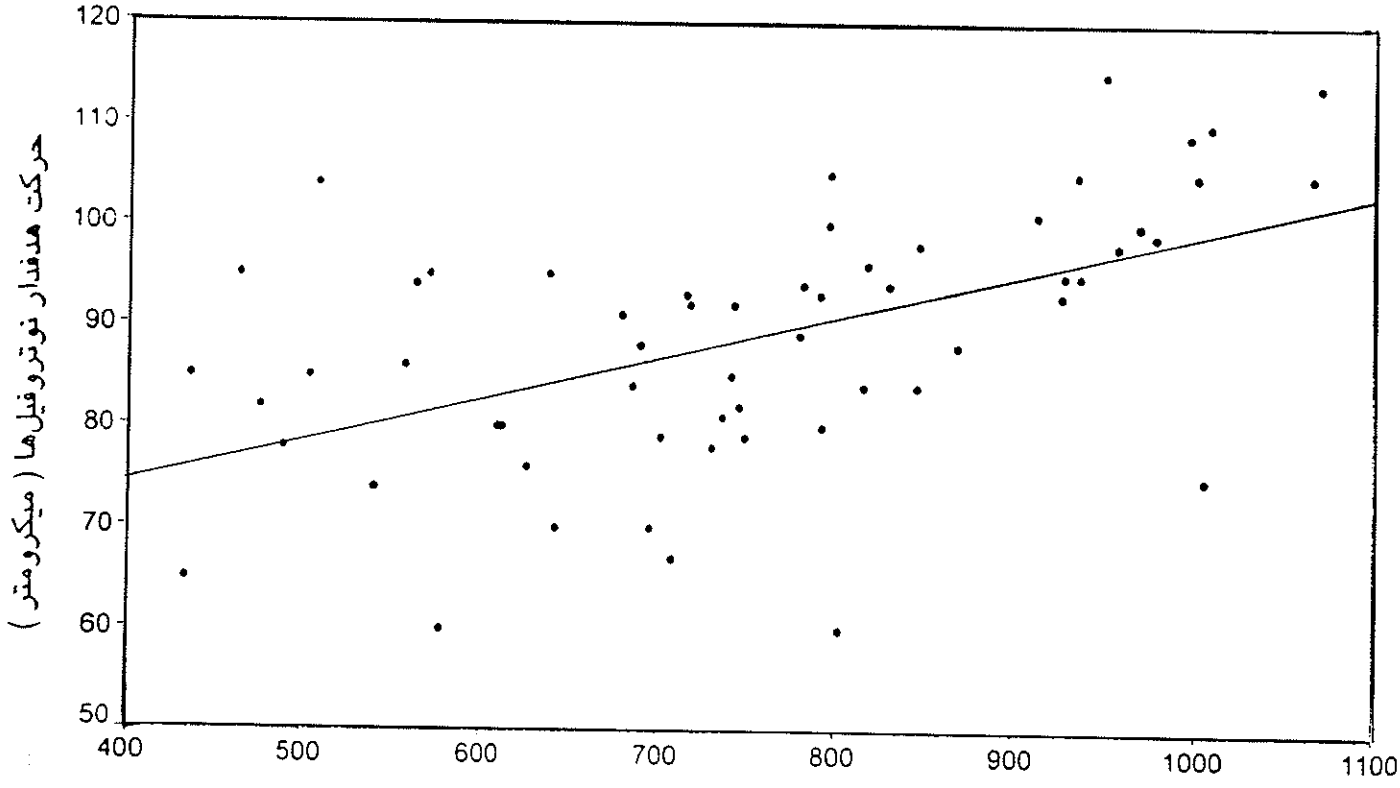
با استفاده از همین روش درصد خطا برای نمونهٔ پلاسمای Pooled کهنه، محلول آبی اسید اسکوربیک در غلظت‌های مختلف نیز انجام گردید. در تمامی موارد ذکر شده تا اطمینان حاصل نمی‌شد که میزان انحراف از خطا از ۱۰٪ کمتر است، آزمایش بر روی پلاسمای افراد نمونه مورد تحقیق انجام نمی‌گرفت.

یافته‌ها

پس از اندازه‌گیری و تعیین متغیرهای FRAP, LTT و کموتاکسی در افراد تحت مطالعه، جهت تعیین همبستگی بین متغیر قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و دو متغیر دیگر ضریب همبستگی اسپیرمن در هر مورد اندازه‌گیری گردید. تابلوی ۱ نشان دهندهٔ ضریب همبستگی، سطوح معنی‌دار و نیز کیفیت ارتباط بین این متغیرها می‌باشد. پس از انجام آزمون آماری همبستگی بین دو متغیر قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها مشخص گردید که این دو متغیر با یکدیگر ارتباط مستقیم معنی‌داری دارند. ضریب همبستگی بین این دو متغیر ۰/۷۱۴ با $P<$ ۰/۰۰۰۱ بود. در مورد ارتباط بین قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و میزان حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها مشخص شد که ارتباط مستقیمی با ضریب همبستگی ۰/۵۵۴۸ با $p<$۰/۰۰۰۱ بین این دو متغیر وجود دارد. نمودارهای ۱ و ۲ نشانگر پراکندگی دو متغیر وابسته فعالیت تکثیری لنفوسیت‌ها و حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها بر حسب متغیر مستقل قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما می‌باشند. در این نمودارها پراکندگی نقاط نشانگر وجود ارتباط بین این متغیرها می‌باشد. همچنین در هر دوی این نمودارها مناسب‌ترین خط رگرسیون نیز رسم شده است.



نمودار شماره ۱- پراکندگی میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت ها بر حسب قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما



نمودار شماره ۲- پراکندگی میزان حرکت هدفدار نوتروفیل ها بر حسب قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما

جدول شماره ۱- میزان همبستگی بین متغیر قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و هر یک از متغیرهای میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت ها و میزان حرکت هدفدار نوتروفیل ها

متغیر مستقل	قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما		
متغیر وابسته	ضریب همبستگی	P value	کیفیت ارتباط
میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها	۰/۷۱۴	۰/۰۰۰۱	ارتباط خوب
میزان حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها	۰/۵۵۴۸	۰/۰۰۰۱	ارتباط نسبی

بحث

لازم است خاطر نشان شود که با بررسی متون از سال ۱۹۸۵ میلادی تاکنون منبعی که در زمینهٔ تحقیق حاضر بررسی‌هایی انجام داده باشد، بدست نیامده است . با توجه به این امر نمی‌توان نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر را بطور کامل با نتایج حاصله از دیگر تحقیقات مقایسه نمود. بهرحال در این قسمت سعی شده است که نتایج حاصله از این تحقیق در کنار نتایج بدست آمده از تحقیقات نسبتاً مشابه مورد بررسی قرار گیرد.

در تحقیقات متعدد انجام شده توسط محققین مشخص شد که بتاکاروتن و دیگر کاروتینوئیدها موجب افزایش معنی‌دار فعالیت تکثیری لنفوسیت‌های T تحریک شده با میتوژن فیتوهماگلوتین می‌شود (۱۲،۲۴). در بررسی دیگری Chandra و همچنین Meydani و همکارانش نیز نتیجه مشابهی در مورد تأثیر ویتامین E بر پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T بدست آوردند (۱۳،۲۵). علاوه بر تحقیقات ذکر شده که به اثرات مستقیم یک ترکیب آنتی‌اکسیدان بر فعالیت تکثیری لنفوسیت‌ها پرداخته‌اند، تحقیقات متعددی نیز تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها را بر مکانیزم‌هایی که بطور غیر مستقیم بر تکثیر لنفوسیت‌ها تأثیر می‌گذارند (مانند مهار تولید پروستاگلاندین‌ها، افزایش تولید سیتوکین‌هایی چون IL-2، افزایش عرضهٔ مولکول‌های IL-2R و ...) بررسی نموده‌اند. این تحقیقات نیز نشانگر تأثیر مثبت و معنی‌دار ترکیبات آنتی‌اکسیدان بر این موارد بوده‌اند (۲۵،۲۶،۲۷،۲۸). در تحقیق حاضر نتیجه حاصله از آزمون همبستگی (Correlation) نشانگر یک ارتباط خوب معنی‌دار (با ضریب همبستگی ۰/۷۱۴) بین قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و فعالیت تکثیری لنفوسیت‌ها بود. با توجه به این امر که در سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما با روش FRAP آنتی‌اکسیدان‌های غذایی (مانند ویتامین E، بتاکاروتن و سایر کاروتینوئیدها) نقش عمده‌ای دارند، نتیجهٔ حاصله از بررسی اخیر مزید نتایج قبل نیز می‌باشد. بنابراین می‌توان مدعی شد که سطح قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما با توان و قدرت سیستم دفاعی در برابر عوامل بیماریزای مختلف نسبت مستقیم دارد.

در مورد تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر مراحل مختلف روند بیگانه‌خواری از جمله کموتاکسی سلول‌های بیگانه‌خوار، Harris و همکارانش دریافتند که کمبود ویتامین E موجب اختلال در حرکت هدفدار سلول‌های بیگانه‌خوار به سمت باکتری‌ها می‌شود (۱۷). تحقیقات دیگری نیز نشانگر آن بوده‌اند که ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان موجب مهار آسیب اکسیداسیون غشاء سلول‌های بیگانه‌خوار می‌شوند که این امر خود بر عملکرد بیگانه‌خواری سلول‌ها تأثیر مثبت دارد (۱۶،۲۹). همچنین Del Rio و همکارانش ثابت نمودند که آنتی‌اکسیدان‌های مختلف مانند ویتامین E و اسید اسکوربیک بر عملکرد کموتاکسی بیگانه‌خوارها تأثیر مستقیم داشته و موجب بهبود کموتاکسی این سلول‌ها می‌شوند (۱۸). نتیجه بدست آمده از تحقیق حاضر در مورد ارتباط قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها نشانگر یک ارتباط معنی‌دار (با ضریب همبستگی ۰/۵۵۴۸) بین این دو متغیر می‌باشد. این نتیجه نیز در راستای دیگر نتایج قرار داشته و دور از انتظار نمی‌باشد. این ارتباط معنی‌دار موید تأثیر مستقیم آنتی‌اکسیدان‌ها بر فعالیت سیستم دفاعی بدن بخصوص سلول‌های فاگوسیتوز کننده (که در دفاع میکروبی و انگل‌های داخل سلولی از اهمیت خاصی برخوردارند) می‌باشد.

با توجه به تأثیراتی که آنتی‌اکسیدان‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی دارند، هدف نهایی این مطالعه تعیین میزان مناسب قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما جهت فعالیت بهینه سیستم ایمنی بوده است. در ابتدای انجام این مطالعه، با بررسی تحقیقات قبل، مشخص شد که نتایج این مطالعات عمدتاً نشانگر تأثیر مثبت

ترکیبات آنتی‌اکسیدان مختلف بر عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی هستند. همچنین ثابت شده بود که بسیاری از بیماری‌هایی که در اثر افزایش سن شانس وقوع آنها افزایش می‌یابد، با آسیب اکسیداتیو بافت‌ها ارتباط داشته و ترکیبات آنتی‌اکسیدان بر پیشگیری این دسته از بیماری‌ها تأثیر مثبت دارند. با در نظر گرفتن این مطالب این فرضیه مطرح شد که سطح ترکیبات آنتی‌اکسیدان در مایعات بیولوژیک بدن می‌تواند معیاری ارزشمند جهت اطمینان از مهار آسیب اکسیداتیو سلول‌های بدن (از جمله سلول‌های سیستم ایمنی) و عملکرد بهینه این سلول‌ها باشد. با در نظر گرفتن نتایج حاصله از مطالعه اخیر (ارتباط مثبت معنی‌دار بین قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و فعالیت تکثیری لنفوسیت‌ها و نیز حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها) و اینکه افراد تحت آزمایش افراد طبیعی جامعه، بدون بیماری مشخص بوده و سیگار و مشروبات الکلی مصرف نمی‌کردند و همچنین رژیم غذایی آنها متعادل بوده است، می‌توان با محاسبات آماری میزان مناسب قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما را که جهت فعالیت بهینه سیستم ایمنی (حداقل با در نظر گرفتن فعالیت تکثیری لنفوسیت‌ها و حرکت هدفدار نوتروفیل‌ها) تعیین نمود. این میزان برای کل افراد (اعم از زن و مرد) ۷۵۱ با انحراف معیار ۱۶۹/۶۳ میکرومول در لیتر محاسبه شده است (این میزان برای زنان ۷۶۲/۰۲ با انحراف معیار ۱۵۶/۳۱ و برای مردان ۷۴۱/۳۶ با انحراف معیار ۱۸۲/۴۲ میکرومول در لیتر می‌باشد). البته لازم به ذکر است که جهت تعیین دقیقتر این میزان مناسب بایستی به ارتباط بین قدرت آنتی‌اکسیدانی تام‌پلاسما و دیگر وجوه عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی (مانند فعالیت سیستم ایمنی هومورال، تولید سیتوکین‌ها، عرضه مولکول‌های غشائی، فعالیت سلول‌های NK و ...) نیز پرداخت و آنها را مد نظر قرار داد.

آنچه که با یک نگاه اجمالی به نقش ترکیبات اکسیدان و آنتی‌اکسیدان بر فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی به نظر می‌رسد آن است که ترکیبات اکسیدان و نیز آنتی‌اکسیدان‌ها، هر دو، برای سیستم ایمنی حکم شمشیر دو لبه را دارند. از یک طرف مشاهده می‌شود که عملکرد سیستم ایمنی ارتباط تنگاتنگی با تولید و آزادسازی رادیکال‌های آزاد دارد و این ترکیبات فعال بایستی سریعاً حذف شوند تا از اثرات مضر آنها بر DNA، پروتئین‌های مهم داخل سلولی و لیپیدهای غشائی محافظت به عمل آید، از طرف دیگر ثابت شده است که ترکیبات فعال اکسیژن در وقایعی چون انتقال پیام از طریق غشاء و نیز عرضه ژن‌های مهم در تکثیر و فعالیت سلول‌های ایمنی (مانند سیتوکین‌ها، پذیرنده سیتوکین‌ها و مولکول‌های اتصال بین‌سلولی) و نهایتاً ایجاد پاسخ ایمنی نقش کلیدی دارند. نتایج تحقیقات متعددی نشانگر فعالیت مهاری ترکیبات آنتی‌اکسیدان بر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد هستند، علاوه بر این نشان داده شده است که بعضی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان که تولید ترکیبات اکسیدان مهم در روند فعال شدن سلول را مهار نموده و یا آن را از محیط عمل خارج می‌سازند، موجب مهار تکثیر و فعالیت سلول‌های عامل سیستم ایمنی می‌شوند.

با جمع‌بندی نتایج متعددی که در دست است، به نظر می‌رسد آنچه که اهمیت دارد، حفظ تعادل اکسیدان نسبت به آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این امر معیاری مهم در عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی محسوب می‌شود. این تعادل بایستی به گونه‌ای باشد که از یک طرف از افزایش میزان ترکیبات اکسیدان، که به آسیب مولکول‌های حیاتی منجر می‌شود، ممانعت شود و از طرف دیگر بایستی از حذف کامل ترکیبات فعالی که دارای نقش فیزیولوژیک هستند، جلوگیری به عمل آورد. مکانیزم‌های دخیل در حفظ این تعادل با ظرافت و دقت خاصی عمل می‌کنند، بنابراین بر هم خوردن این تعادل (به نفع هر یک) به اختلال هموستاز بدن و بروز عوارضی نامطلوب منجر می‌شود. برای تعیین میزان مناسب نسبت اکسیدان به آنتی‌اکسیدان جهت فعالیت بهینه سلول‌های سیستم ایمنی نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از ریاست محترم سازمان انتقال خون ایران و نیز معاونت محترم پژوهشی آن سازمان برای ایجاد تسهیلات در امر اجرای این تحقیقات قدردانی می‌شود. همچنین از سرکار خانم طرآبادی و سرکار خانم زمان‌وزیری که در انجام آزمایشات ما را یاری دادند، کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Cutler R.G, Packer L, Mori A: "Oxidative stress, antioxidant, aging and disease". In Oxidative stress and aging: Molecular and cell biology update. 1995; p. 1-15.

2. Halliwell B, Gutteridge J: "Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species". In Free radicals in biology and medicin: Oxford. 1999; p. 1-35.

3. Ahmad S: "Mechnisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification". In Oxidative stress and antioxidant defenses in biology: Chapman & Hall. 1995; p. 1-46.

4. Beckman K, Ames B: "The free radical theory of aging matures". Physiol. Rev 1998; 78: 547-81.

5. Halliwell B, Gutteridge J: "Antioxidant defences ". In Free radicals in biology and medicin: Oxford. 1999; p. 105-245.

6. Halliwell B, Gutteridge J: "Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death ". In Free radicals in biology and medicin: Oxford. 1999; p. 246-350.

7. Inserra P, Ardestani S, Watson R: "Antioxidant and immune function". In Antioxidant and disease prevention (Garewal H): CRC Press LLC. 1997; p. 19-29.

8. Kitas G, Salmon M, Young S. P, Bacon P. A: "Effects of Hydrogen peroxide on lymphocyte receptor functions : their significance in immunoregulation". Molec. Aspects. Med 1991; 12: 87-92.

9. Freed B, Rapaport R, Lempert N: "Inhibition of early events in the human T-lymphocyte response to mitogens and alloantigens by hydrogen peroxide". Arch. Surg 1987; 122: 99-104.

10. Sweetman S, Strain J, Macklevy V: "Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and Repair in human lymphoblastoid cells". Nutr. Cancer 1997; 27: 122-30.

11. Flescher E, Ledbetter J, Schieven G. et al: "Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction". J. Immunol 1994; 153: 4880-9.

12. Chew M, Wong W, Wong T.S: "Effects of dietary β-carotene, canthaxantin and astaxanthin on lymphocyte function in mice". Faseb J 1995; 9: 2559.

13. Chandra R.K: "Effect of vitamin and trace element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects". Lancet 1992; 340: 1124-7.

14. Kazi N, Radvany R, Oldman T et al: "Immunomodulatory effect of β- carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer". Nut. Cancer 1997; 28: 140-5.

15. Kee-Ching G.J, Chang-Shi Y, Wai-Yi S et al:" Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults". Am. J. Clin. Nutr 1996; 64: 960-5.

16. Oberritter H, Glatthaar B, Moser V et al: "Effect of Functional stimulation on ascorbate content in phagocytes under physiological and pathological conditions". Int. Archs. Allergy Appl. Immun 1986; 81: 46.

17. Harris R, Boxer L, Baehner R: "Consequences of vitamin E deficiency on the phagocytic and oxidative function of the rat polymorphonuclear leukocyte". Blood 1980; 55: 338-43.

18. Del Rio M, Ruedas G, Medina S. et al: "Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro". Life Sciences 1998; 63: 871-81.

١٩ – شایگان، مژگان و همکاران، تست تکثیر لنفوسیتی به روش الیزا، سازمان انتقال خون ایران، ١٣٧٩.

20. Harbeck R.J, Giclas P.C: "Chemotaxis ". In Diagnostic immunology laboratory manual: Raven Press. 1991. p. 261-271.

21. Benzie I, Strain J: "Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for stimultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration". Meth. Enzym 1999; 299: 15-27.

22. Cao G, Prior R.L: "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum". Clin. Chem 1998; 44: 1309-15.

23. Bruce A.W: "Basic quality assurance and quality control in the clinical laboratory": little Brown and company Boston-Torento 1984.

24. Benedich A, Shapiro S: "Effect of β-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat". J. Nutr 1986; 116: 2254-62.

25. Meydani N. S, Barklund MP, Liu S et al: "Vitamin E supplementation enhances cell mediated immunity in healthy elderly subjects". Am. J. Clin. Nutr 1990; 52: 557-63.

26. Hughes D, Wright A, Finglas P et al:"the effect of β- carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male nonsmokers". J. Lab. Clin. Med 1997; 129: 309-17

27. Parabhala R, Garewal H, Hicks M et al: "The effects of 13-cis-retinoic acid and β-carotene on cellular immunity in human". Cancer 1991; 67: 1556-60.

28. Meydani N.S, Meydani M, Verdon CP et al:" Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E_2 synthesis and enhances the immune response of aged mice". Mech. Ageing Dev 1986; 34: 191-201.

29. Moser U, Weber F: "Uptake of ascorbic acid by human granulocytes ". Int. J. Vit. Nutr. Res 1984; 54: 47.