Archive of SID

(مقالهٔ پژوهشی)

تأثیر ذرات حاصل از اگزوز موتور دیزل بر فعالیت ماکروفاژهای صفاقی در موش-های سالم و مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی

عصمت جعفرزاده [۱]، مهدی مهدوی [۲]، برات قبادیان [۳]، رویا یارایی [۴*]

چکیده

زمینه و هدف: آلاینده‌ها بر سیستم ایمنی اثرات مختلفی دارند که تاکنون بعضی از این آثار مشخص شده است. از مهم‌ترین آلاینده‌های هوا ذرات حاصل از اگزوز موتور دیزل (DEP) می‌باشد. در این تحقیق، تأثیر این ذرات بر فعالیت ماکروفاژهای صفاقی موش‌های سالم و مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی بررسی گردید.

روش بررسی: موش‌های ماده نژاد C57BL/6 با سن ۸–۱۰ هفته به ۴ گروه تقسیم شدند. انسفالومیلیت خودایمن تجربی با تجویز زیر جلدی پپتید MOG_{35-55} همراه با ادجوانت کامل فروند و پرتوسیس توکسین در دو گروه ایجاد شد. تزریق صفاقی ۵ میکروگرم سوسپانسیون Diesel Engine Particles (DEP) در PBS به موش-های تیمار Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) و تیمار سالم به‌مدت ۲۱ روز انجام شد. به گروه‌های کنترل PBS تزریق شد. سپس وزن موش‌ها، سطح نیتریک اکسید و فعالیت ماکروفاژهای صفاقی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، در گروه تیمار سالم سطح نیتریک اکسید به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافته است ($P<۰/۰۰۰$). اما در گروه تیمار EAE سطح نیتریک اکسید و فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل EAE داشت (به‌ترتیب $P<۰/۰۲$ و $P<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: بر اساس این نتایج، تزریق DEP در موش سالم موجب افزایش تولید نیتریک اکسید در ماکروفاژها می‌شود، ولی در موش بیمار (EAE) مرگ‌ومیر این سلول‌ها را افزایش می‌دهد. لذا اثر آلاینده‌ها در موش مبتلا به EAE و موش سالم می‌تواند تفاوت قابل توجهی داشته باشد و تحقیقات بیشتری برای روشن شدن مکانیسم دقیق آن مورد نیاز است.

کلید واژگان: انسفالومیلیت خودایمن تجربی، ذرات حاصل از موتور دیزل، نیتریک اکسید، فعالیت حیاتی.

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی.
۲- استادیار گروه ایمنی‌شناسی.
۳-دانشیار گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم.
۴-دانشیار گروه ایمنی‌شناسی.

۱و۴-گروه ایمنی‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲-گروه ایمنی‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳-گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
رویا یارایی؛ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۲۱۸۸۹۶۴۷۹۲
Email: ryaraee@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۲/۱۸ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۳/۱۹ اعلام قبولی: ۱۳۹۵/۴/۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس یا ام اس (Multiple Sclerosis) یک بیماری مزمن و خودایمن التهابی است که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می‌کند. این بیماری باعث التهاب در مغز و نخاع، دمیلینه شدن پیش‌روندهٔ بافت سیستم عصبی مرکزی، آسیب آکسون‌های نورونی و از دست رفتن عملکرد نورون‌های سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۱). در MS سلول‌های ایمنی فعال‌شده از جمله لنفوسیت B، لنفوسیت T و ماکروفاژها به بافت عصبی مرکزی مهاجرت می‌کنند و باعث تولید سایتوکاین‌های التهابی و کموکاین‌ها و نیز تغییراتی در عملکرد آستروسیت‌ها و میکروگلیاهای این ناحیه می‌شوند. این امر موجب تخریب میلین و ایجاد پلاک‌های اسکلروزی در مغز و نخاع می‌شود. شدت ضایعات به میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی بستگی دارد (۲). MS یکی از رایج‌ترین بیماری‌های عصبی است و اغلب در محدودهٔ سنی ۲۰–۴۰ سال بروز پیدا می‌کند و تظاهرات بالینی متفاوتی دارد (۳، ۴). عواملی که دقیقاً منجر به MS می‌شوند به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند، اما بر طبق برخی از شواهد عواملی همچون زمینهٔ ژنتیکی، عفونت ویروسی، جنسیت، شیب جغرافیایی و برخی عوامل محیطی دیگر مانند آلودگی هوا را از عوامل احتمالی این بیماری و یا عود آن می‌دانند (۵–۸).

شیوع ام اس، بسته به کشور یا جمعیت‌های خاص از ۲ تا ۱۵۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر متغیر است. در گذشته، ایران جزء مناطق با شیوع کم دسته‌بندی می‌شده است (۴ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر)، اما مطالعات جدید از افزایش شیوع ام اس در دههٔ اخیر خبر می‌دهند که نشان می‌دهد شیوع ام اس در ایران در حال افزایش از سطح متوسط به سطح با خطر بالا می‌باشد. ایران در ابتلا به ام اس جزء ده کشور اول دنیا است (۹). در دسامبر سال ۲۰۱۱ میزان مبتلایان ثبت‌شده به ام اس در ایران ۳۴۶۰۵ نفر گزارش شده است (۴۵ نفر از هر صد هزار نفر). بیشترین آمار مبتلایان به ام اس در ایران در شهرهای اصفهان (۸۰ نفر از هر صد هزار نفر) و تهران (۶۰ نفر از هر صد هزار نفر) است که یکی از دلایل اصلی آن را آلودگی هوا می‌دانند (۱۰).

آلودگی هوا عامل عمدهٔ مؤثر در سلامت عمومی و میزان فعالیت انسان‌ها در نواحی شهری است (۱۱). هر سال میلیون‌ها تن مواد آلاینده گوناگون وارد جو زمین می‌شود. در بین بخش‌های مختلف آلوده‌کنندهٔ هوا در ایران، بخش‌های حمل و نقل و صنعت به‌ترتیب مهم‌ترین بخش‌های آلوده‌کنندهٔ هوا هستند (۱۲) . قرار گرفتن در معرض آلودگی هوای محیط باعث ایجاد یک نگرانی جدی در ارتباط با سلامت عمومی و افزایش بیماری‌ها و مرگ‌ومیر در جهان شده است. در دهه‌های اخیر، عوارض جانبی آلودگی هوا روی سیستم قلبی – عروقی و ریوی به‌خوبی مشخص شده است، اما مطالعات اندکی روی اثر آن بر سیستم عصبی مرکزی انجام گردیده است. اخیراً مشخص شده است آلودگی هوا با بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مانند سکتهٔ مغزی، آلزایمر، پارکینسون و اختلالات نورونی در ارتباط است. شواهد جدید پیشنهاد می‌کند آلودگی هوا با القای التهاب نورونی و تخریب نورونی، استرس اکسیداتیو، فعالیت میکروگلیا، تغییر در سد خونی– مغزی و عملکرد ناقص عروق مغزی در پاتولوژی (Central Nervous System (CNS شرکت می‌کند و نیز موجب تولید سایتوکاین‌های التهابی در مغز می‌شود. همچنین اظهار شده است ترکیبات مختلفی از آلاینده‌های هوا می‌توانند به آسانی به CNS منتقل شده و باعث فعال شدن پاسخ‌های سیستم ایمنی شوند (۱۳–۱۵). همچنین آلودگی هوا یکی از فاکتورهای محیطی دخیل در التهاب سیستمیک و ایجاد یا تشدید بعضی بیماری‌های خودایمنی می‌باشند (۱۶). البته بسیاری از این تأثیرات در دوزهای بالا به‌صورت چشمگیر دیده می‌شود. همچنین قرار گرفتن در معرض غلظت بالای

www.SID.ir

Archive of SID

ذرات معلق باعث افزایش قابل توجه فعالیت فاکتورهای رونویسی NF-κB و AP-1 در مغز شده که این فرایندهای التهابی در پاتولوژی پروسهٔ تخریب نورونی شرکت می‌کنند (۱۷).

از سوخت دیزلی آلاینده‌های مختلفی تولید می‌شود که بخش گازی آن شامل گازهایی مانند NO_2، SO_2، CO و بخش ذره‌ای آن یا Particulates Matter (PM) بیشتر حاوی هیدروکربن‌ها (HC) و پلی آروماتیک هیدروکربن‌ها (PAH) و فلزات و عناصری مانند سرب و جیوه می‌باشد (ذرات حاصل از سوخت دیزل حاوی بیش از ۴۰ نوع آلاینده توکسیک هوا می‌باشد) (۱۸-۲۰). ذرات و گازهای حاصل از سوخت دیزل اثرات گوناگونی بر سیستم ایمنی می‌گذارند. برخی از ترکیبات DEP باعث القای تولید IL-4 و IL-10 و برانگیخته شدن پاسخ‌های TH2 (T Helper2) می‌شوند که می‌تواند موجب افزایش حساسیت آلرژیک شود؛ در حالی‌که برخی ترکیبات دیگر پاسخ‌های TH1 را افزایش می‌دهند و یا حتی هر دو نوع پاسخ‌های TH1 و TH2 را می‌توانند تحریک کنند. در هر صورت، مشاهده شده که DEP در افزایش حساسیت آلرژیک دخیل است (۲۱).

با توجه به اینکه نشان داده شده هوای با کیفیت پایین و دارای غلظت بالای ذرات معلق سبب عود ام اس شده و بر برخی از پارامترهای ایمونولوژیک مؤثر است (۲۲). لازم است اثر آلاینده‌های حاصل از موتور دیزل از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار بگیرد. در این مطالعه تلاش شده است اثر بخش ذره‌ای حاصل از سوخت دیزلی بررسی گردد. براین اساس، اثر ذرات حاصل از موتور دیزل بر سطح نیتریک اکسید و فعالیت ماکروفاژی در موش‌های سالم و مبتلا به EAE مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

جامعهٔ مورد مطالعه، ۳۲ سر موش نژاد C57BL/6 ماده با محدودهٔ سنی ۸ تا ۱۰ هفته است که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. موش‌ها پس از وزن شدن به‌صورت تصادفی در ۴ گروه کنترل سالم، تیمار سالم، کنترل EAE و تیمار EAE قرار گرفتند.

القا EAE

مقدار ۲۵۰ میکروگرم پپتید MOG_{35-55} (از شرکت انزولایف) در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) با ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (از شرکت سیگما) مخلوط و به‌صورت زیر جلدی در ناحیهٔ پهلوی هر موش در روز صفر و ۷ تزریق گردید (۱۰۰ میکرولیتر به پهلوی راست و ۱۰۰ میکرولیتر به پهلوی چپ). سپس مقدار ۵۰۰ نانوگرم سم سیاه سرفه (Pertussis toxin) (از شرکت سیگما) در حجم ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات در روز ۱ و ۸ بعد از ایمیونیزاسیون به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۲۳).

روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفت و شدت بیماری از صفر (عدم ابتلا به بیماری)، یک (اختلال در حرکت دم)، دو (فلج شدن دم)، سه (اختلال در راه رفتن)، چهار (فلجی یک پا)، پنج (فلجی هر دو پا)، شش (فلجی کامل دست و پا) و هفت (مرگ) درجه‌بندی گردید (۲۴). در موش‌های کنترل EAE با مشاهدهٔ علایم فلجی (با میانگین رتبه ۳/۷۵ در روز ۲۱) و آزمایشات پاتولوژی مغز صحت EAE تأیید گردید.

تغییرات وزن

به دلیل اینکه کاهش وزن یکی از ویژگی‌های موش‌های EAE است (۲۵)، تغییرات وزن موش‌ها به‌صورت یک روز در میان ثبت گردید.

تهیهٔ ذرات حاصل از موتور دیزل (DEP)

ذرات حاصل از سوخت موتور دیزل، از یک موتور چهار زمانه دیزل تک سیلندر هوا خنک پر کاربرد در ایران برای انجام آزمون‌ها جمع‌آوری شد. سوخت مورد

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده در این تحقیق، دیزل یورو ۲ بود. آزمایش‌ها در آزمایشگاه انرژی‌های تجدیدپذیر دانشگاه تربیت مدرس و در شرایط استاندارد انجام گرفت. سپس ذرات در PBS حل شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه توسط دستگاه اولتراسونیک در یخ سونیکیت شد و در نهایت به‌مدت ۱۵ دقیقه ورتکس گردید. هر هفته محلول تازه تهیه و در یخچال نگهداری شد. قبل از هر تزریق ابتدا محلول به‌خوبی ورتکس گردید. شروع تزریق DEP از روز اول القای EAE بوده و روزانه به‌مدت ۲۱ روز (روز اوج بیماری طبق پایلوت اولیه) ادامه داشت.

در گروه مطالعه موش‌های تیمار سالم و تیمار EAE روزانه ۵ میکروگرم DEP، و گروه کنترل فقط PBS دریافت کردند. انتخاب دوز تزریقی DEP در این مطالعه بر اساس مطالعات مشابه حیوانی بود (۲۶).

جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی

موش‌ها ۲۱ روز پس از ایمیونیزاسیون با استفاده از دی اتیل اتر بیهوش شدند. تحت شرایط استریل، پوست سینه بدون آسیب به پردهٔ صفاق جدا شد و با استفاده از سرم فیزیولوژی سرد، سلول‌های صفاقی جمع‌آوری گردید.

کشت سلول

سوسپانسیون سلولی ابتدا ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول رویی (سرم فیزیولوژی) دور ریخته شد. سپس با RPMI 1640 شستشو و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. در انتها با ریختن مایع رویی، دو میلی‌لیتر RPMI حاوی FBS ده درصد به سلول‌ها اضافه شد. با استفاده از لام نئوبار سلول‌ها شمارش شده و تعداد چهارصد هزار سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد CO2 و ۹۵ درصد رطوبت منتقل شد. پس از گذشت ۲ ساعت با شستشوی چاهک‌ها با نرمال سالین ۳۷ درجه، به ۳ چاهک اول ۵ میکرولیتر لیپو پلی ساکارید (LPS) به‌عنوان محرک اضافه شد، ولی سه چاهک دیگر LPS دریافت نکردند و مجدداً پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شد.

سنجش فعالیت ماکروفاژهای صفاقی

بعد از گذشت ۲۰ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت دوباره داخل انکوباتور قرار گرفت. بعد از سپری شدن زمان لازم محلول رویی هر چاهک با سمپلر کشیده شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول اسیدی (اسید کلریدریک ۴ درصد نرمال در ایزوپروپانول) اضافه شد. با حل شدن کریستال‌های بنفش رنگ جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری میزان نیتریک اکسید

در این آزمایش، غلظت نیتریت با روش گریس سنجیده شد. پس از گذشت ۱۶ ساعت ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک به پلیت‌های ۹۶ اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول سولفانیل آمید ۱ درصد در اسید فسفریک ۵ درصد و ۵۰ میکرولیتر محلول N-۱- نفتیل اتیل دی آمین دی هیدروکلراید (NEDA) ۱ درصد در اسید فسفریک ۵ درصد به هر چاهک اضافه شد. همچنین غلظت‌های منحنی استاندارد شامل ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکرومولار در میلی‌لیتر بود. تغییر رنگ حاصل‌شده با دستگاه جذب سنج خواننده الایزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

آنالیز آماری

جهت مقایسهٔ میانگین‌ها، از آزمون مان ویتنی – یو استفاده شد. از آزمون اندازه‌گیری‌های مکرر و آزمون فریدمن جهت بررسی تغیرات وزن در هر گروه در روزهای مختلف استفاده گردید. $P<0/05$ از لحاظ آماری معنادار تلقی گردید.

یافته‌ها

با بررسی تغییرات وزن در موش‌ها طی ۲۱ روز مشخص گردید اختلاف وزن روز ۱ و ۲۱ بین موش‌های

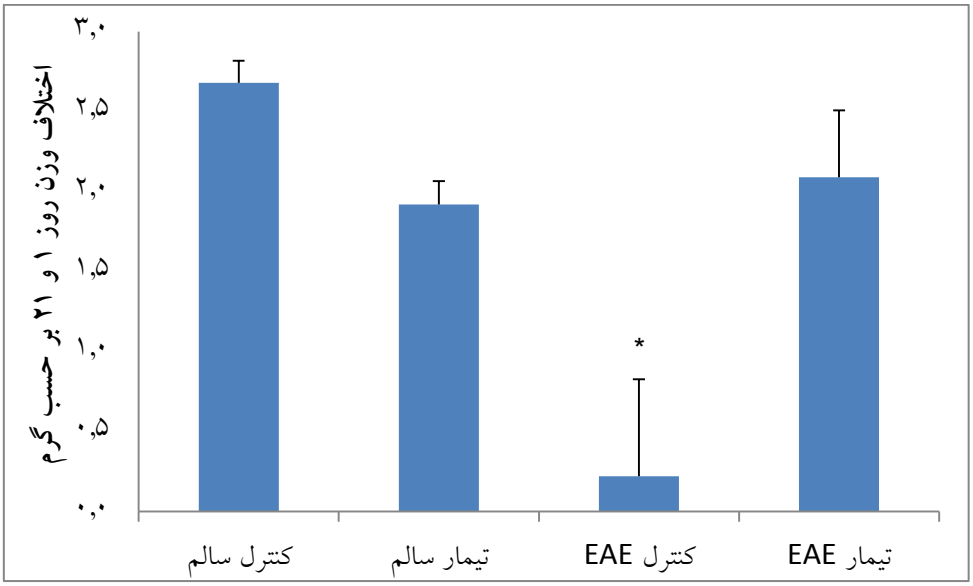
www.SID.ir

Archive of SID

گروه کنترل سالم و تیمار سالم معنادار نیست. اما اختلاف وزن روز ۱ و ۲۱ موش‌های گروه کنترل EAE به‌طور معناداری کمتر از موش‌های گروه تیمار EAE است (P<۰/۰۴) (نمودار ۱).

با مقایسهٔ فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی نشان داده شد که میانگین فعالیت حیاتی ماکروفاژهای گروه کنترل سالم (بدون DEP) و تیمار سالم (با DEP) در حضور LPS (P<۰/۷) یا عدم حضور LPS (P<۰/۹) تغییر معناداری نداشته است (نمودار ۲ الف). اما میانگین فعالیت حیاتی ماکروفاژهای گروه تیمار EAE (با DEP) نسبت به گروه کنترل EAE (بدون DEP) در حضور LPS (P<۰/۰۰۰) و عدم حضور LPS (P<۰/۰۰۰) به‌طور معناداری کاهش پیدا کرده است (نمودار ۲ ب).

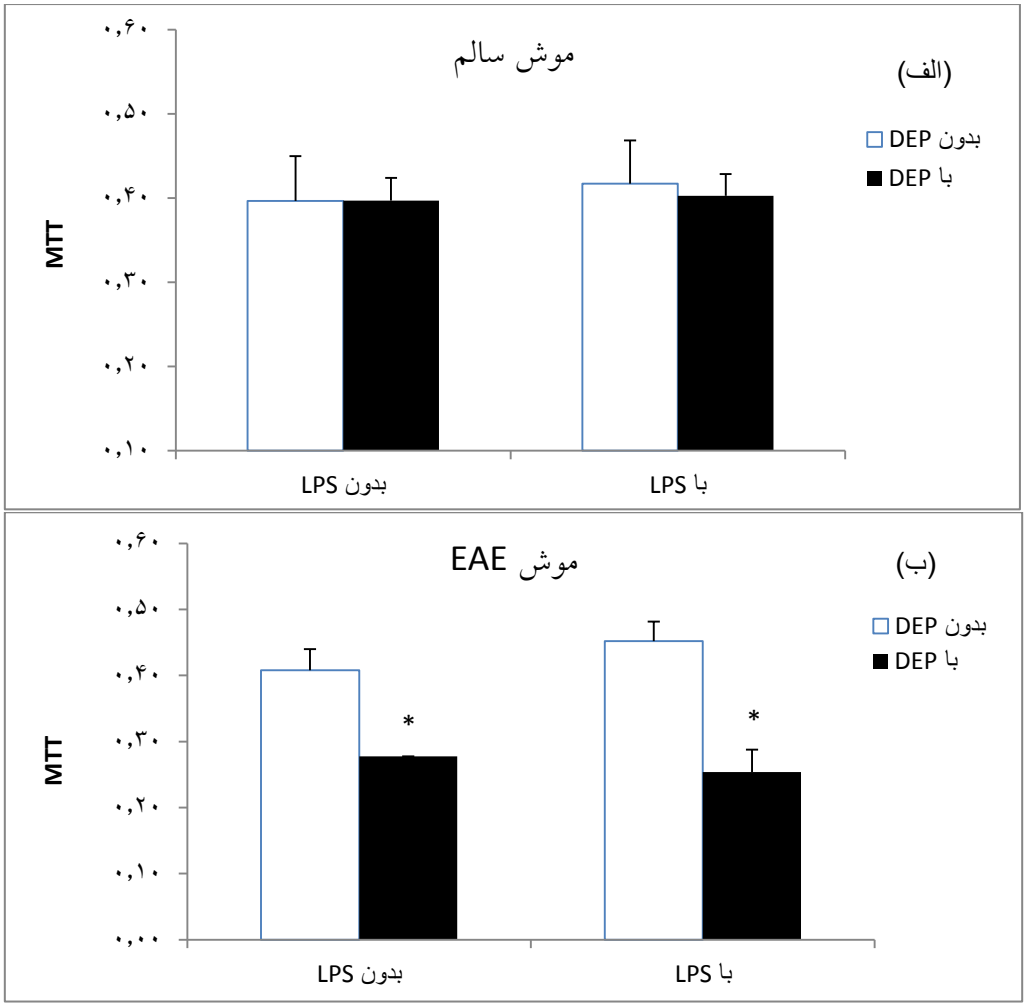
میزان تولید نیتریت در مایع رویی کشت ماکروفاژهای صفاقی موش‌های کنترل سالم، تیمار سالم، کنترل EAE و تیمار EAE به روش گریس سنجیده شد (نمودار ۳). نتایج نشان داد که میانگین تولید نیتریت در گروه تیمار سالم (با DEP) در حضور LPS (P<۰/۰۰۰) و عدم حضور LPS (P<۰/۰۰۰) به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل سالم (بدون DEP) می‌باشد (نمودار ۳ الف). در صورتی‌که میانگین تولید نیتریت در گروه تیمار EAE (با DEP) در حضور و عدم حضور LPS به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل EAE (بدون DEP) می‌باشد (P<۰/۰۲) (نمودار ۳ ب).



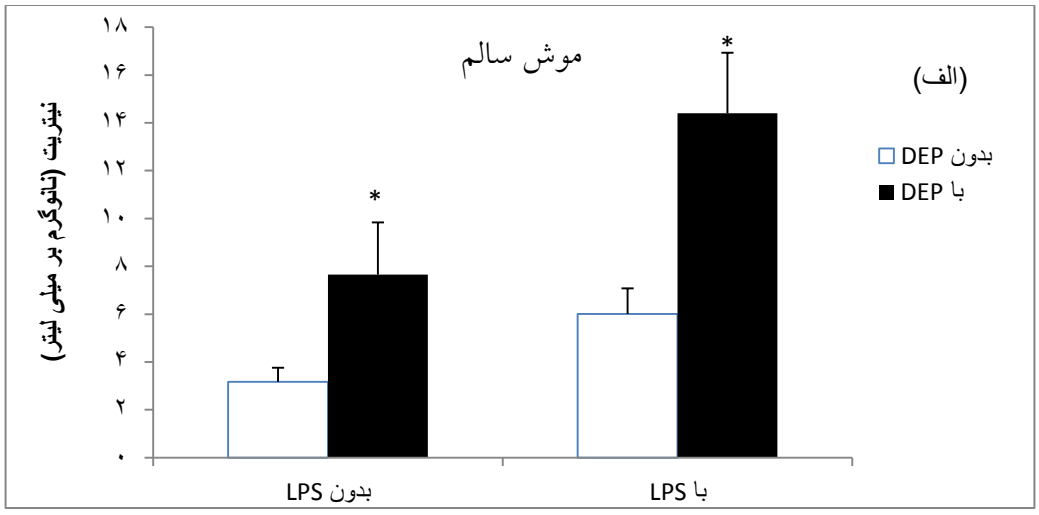
نمودار ۱: بررسی تفاوت وزن موش‌ها بین گروه کنترل EAE و تیمار EAE با یکدیگر. موش‌ها در چهارگروه کنترل سالم، تیمار سالم، کنترل EAE و تیمار EAE تقسیم شدند. اختلاف وزن روز ۱ و روز ۲۱ برحسب گرم عنوان شده است. نتایج برحسب میانگین و SEM نشان داده شده است. ستاره نشانهٔ اختلاف معنادار وزن گروه کنترل EAE با گروه تیمار EAE می‌باشد (n=۸) (p=۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

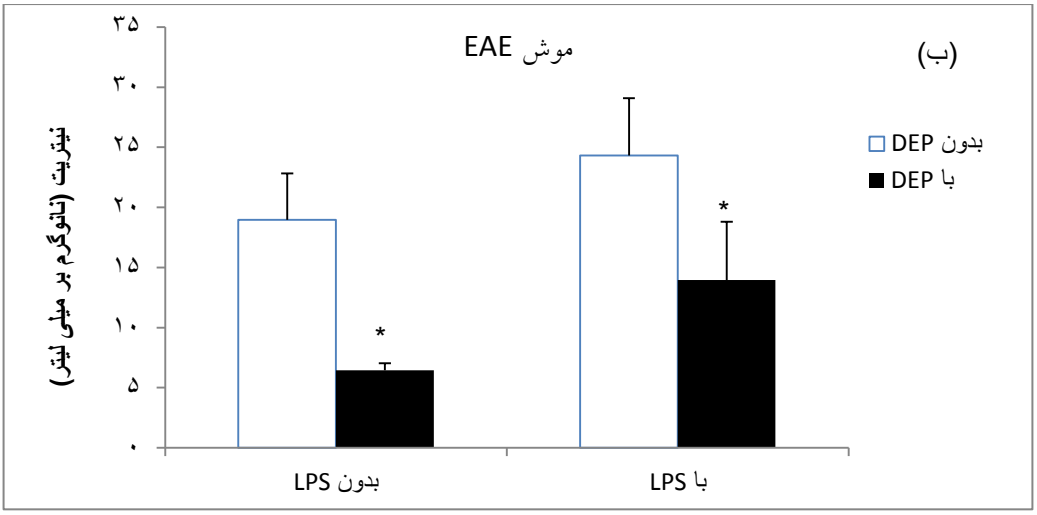


نمودار ۲: بررسی فعالیت حیاتی در کشت ماکروفاژهای صفاقی در حضور و عدم حضور LPS بین گروه‌ها. الف) فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی در گروه‌های کنترل سالم (بدون DEP) و تیمار سالم (با DEP). ب) فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی در گروه‌های کنترل EAE (بدون DEP) و تیمار EAE (با DEP) نتایج برحسب میانگین و SEM نشان داده شده است. ستاره نشانهٔ اختلاف معنی‌دار فعالیت حیاتی ماکروفاژها در گروه تیمار EAE با گروه کنترل EAE می‌باشد (n=۵) (p=۰/۰۵).



www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲: بررسی میانگین تولید نیتریت در کشت ماکروفاژهای صفاقی در حضور و عدم حضور LPS بین گروه‌های کنترل سالم (بدون DEP) با تیمار سالم (با DEP) با یکدیگر و کنترل EAE (بدون DEP) و تیمار EAE (با DEP) با یکدیگر. الف) سطح نیتریت ماکروفاژهای صفاقی در گروه‌های کنترل سالم و تیمار سالم. ب) سطح نیتریت ماکروفاژهای صفاقی در گروه‌های کنترل EAE و تیمار EAE. نتایج برحسب میانگین و SEM نشان داده شده است. ستاره نشانهٔ اختلاف معنادار نیتریت در گروه‌ها می‌باشد (n=۵) (p=۰/۰۵).

بحث

آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) یک مدل حیوانی جایگزین مناسب برای MS است که از نظر آسیب‌های بافت‌شناسی و علایم بالینی تقریباً ویژگی‌های پاتولوژیک MS را دارد، چرا که در این مدل نیز علایم نوسانی بالینی و سیر بیماری عصبی به‌صورت مزمن همراه با فازهای حمله (Relapse) و سرکوب حمله (Remission) به‌همراه التهاب، ارتشاح لکوسیت‌ها، دمیلینه شدن، از دست دادن آکسون و گلیوزیز و ایجاد پلاک‌های سخت اسکلروزی در سیستم عصبی مرکزی تشکیل می‌شود (۲۷). بحث‌های زیادی در مورد تأثیر آلاینده‌ها بر بیماری MS مطرح است؛ با این‌حال اطلاعات و مدارکی در رابطه با اثر DEP بر بیماری MS و EAE وجود ندارد. با توجه به اهمیت DEP در بین آلاینده‌ها، در این مطالعه تلاش شد تا اثر DEP بر فعالیت ماکروفاژهای صفاقی موش‌های سالم و مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی بررسی گردد.

پس از اینکه موش‌های سالم و مبتلا به EAE به‌مدت سه هفته DEP (به میزان ۵ میکروگرم به ازای هر موش در روز) دریافت کردند، ماکروفاژهای صفاقی آن‌ها جدا شده و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی نشان می‌دهد فعالیت حیاتی ماکروفاژها در موش‌های سالم تحت اثر DEP تغییری نکرده، ولی در موش‌های EAE که DEP دریافت کرده بودند کاهش معنی‌داری داشته است. به‌عبارتی DEP باعث کاهش فعالیت یا القاء مرگ و میر در ماکروفاژهای موش‌های مبتلا به EAE شده است، ولی در موش‌های سالم موجب آن نشد. هیورا (Hiura) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که DEP باعث القای آپوپتوز در ماکروفاژها از طریق اثرات توکسیک بر میتوکندری و رادیکال‌های واکنش‌گر اکسیژن می‌شود (۲۸) همچنین یون (Yun) در تحقیقاتی در سال ۲۰۰۹ پی برد DEP باعث القای آپوپتوز در ماکروفاژهای رده سلولی J774A.1 از طریق فعال کردن P53 می‌شود (۲۹). از طرفی، سریانی (Seriani) و همکارانش در سال ۲۰۱۵ پی بردند DEP باعث کاهش MTT در رده سلولی اپی‌تلیالی ریه (BEAS-2B) می‌شود (۳۰).

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طور که مطالعات سانگ (Song) و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند DEP فعالیت حیاتی رده سلولی اپی‌تلیالی HMEEC را کاهش می‌دهد (۳۱).

دو نکته در مقایسهٔ این مطالعات با مطالعهٔ ما جلب نظر می‌کند. اول اینکه این مطالعات عمدتاً DEP را در محیط کشت بر ماکروفاژ یا سلول هدف اثر داده‌اند در حالی‌که در مطالعهٔ ما، بعد از اینکه حیوان به‌مدت سه هفته DEP دریافت کرد، ماکروفاژها از صفاق جدا شده و بررسی شدند و لذا نشان‌دهندهٔ تأثیر DEP بر ماکروفاژها در داخل بدن می‌باشد.

دوم اینکه غلظت‌های به‌کار گرفته‌شده در مطالعات فوق معمولاً بالا بودند، در حالی‌که ما در مطالعهٔ خود از غلظت نسبتاً پایین استفاده کردیم. یافته‌های دیگری نیز نشان می‌دهند که قرار گرفتن در معرض غلظت بالای DEP موجب سرکوب تولید IL-4 می‌شود؛ در حالی‌که قرار گرفتن در معرض غلظت پایین آن باعث افزایش تولید سایتوکاین‌های TH2 مانند IL-4 و IL-10 در ریه موش می‌شود (۳۲، ۳۳).

بنابراین می‌توان این فرضیه را مطرح نمود که DEP در شرایطی که تأثیر جدی بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای موش سالم ندارد، ولی در ماکروفاژهای موش مبتلا به EAE می‌تواند باعث کاهش فعالیت حیاتی آن‌ها (احتمالاً با القای آپوپتوز) شود و همچنین این احتمال می‌تواند مطرح باشد که ماکروفاژها در موش‌های مبتلا به EAE، حساس‌تر به اثرات توکسیک DEP می‌باشند. این سؤال هم ایجاد می‌شود که آیا ممکن است DEP با القای آپوپتوز در سلول‌های التهابی ارتشاح‌یافته به بافت مغزی یا ماکروفاژهای مستقر در مغز (میکروگلیا) باعث تأثیر بر شدت بیماری شود؟ که نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

بخش دیگر مطالعهٔ حاضر نشان داد که تزریق DEP (با دوز مورد استفاده)، موجب افزایش تولید نیتریک اکسید در ماکروفاژهای موش‌های سالم می‌شود؛ در حالی‌که در ماکروفاژهای موش‌های EAE، موجب کاهش تولید نیتریک اکسید می‌گردد. افزایش نیتریک اکسید در ماکروفاژهای موش سالم می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت التهابی این ماکروفاژها باشد. محققین دیگری نیز افزایش تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژ تحت اثر DEP را گزارش نموده‌اند، به‌عنوان مثال لیم (Lim) و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کرده‌اند که DEP موجب افزایش تولید نیتریک اکسید از ماکروفاژها می‌شود (۳۴)، در صورتی‌که کاهش تولید نیتریک اکسید در ماکروفاژهای صفاقی موش‌های EAE می‌تواند ناشی از مرگ و میر ماکروفاژها باشد (که قبلاً به آن اشاره شد) و یا ناشی از کاهش فعالیت التهابی ماکروفاژها باشد. تحقیقات ساکسنا (Saxena) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که قرارگیری رده سلولی ماکروفاژی (RAW264.7) تحریک شده در معرض DEP موجب مهار تولید نیتریک اکسید از آن می‌گردد (۳۵). همان‌طور که قبلاً اشاره شد مقدار و نحوهٔ مواجهه با DEP از یک‌طرف و همچنین شرایط و نوع سلول از طرف دیگر، عوامل مهمی در این نوع مطالعات هستند. با این‌حال نتایج ما نشان می‌دهد که حتی دوز نسبتاً کم در ماکروفاژ موش سالم، اثر افزایش فعالیت التهابی دارد. در مطالعهٔ فوق نیز از غلظت بالایی از DEP استفاده شده است.

نتیجه‌گیری

در مجموع، آنچه بیش از همه در این مطالعه می‌تواند مورد توجه قرار گیرد اثر متفاوت DEP بر موش سالم و بیمار است. در موش‌های سالم، DEP حتی در غلظت پایین می‌تواند فعالیت التهابی را افزایش دهد، این نکته قابل توجه است، چرا که این پدیده می‌تواند پیش‌زمینه بیماری‌های دیگر باشد. از طرفی، در موش‌های EAE به‌نظر می‌رسد DEP قادر است مشکلات دیگری مانند آپوپتوز و مرگ و میر ماکروفاژها را القا کند و با این مکانیسم نقش مداخله‌گری ایفا نماید. با توجه به این‌که یافته‌های مطالعه کنونی نشان از تفاوت در پاسخ‌های

www.SID.ir

Archive of SID

ایمنی موش بیمار و سالم در مواجهه با DEP دارد و حاکی از اثرات متفاوت DEP در شرایط مختلف و یا تفاوت سلول‌های ایمنی به‌ویژه ماکروفاژها در شرایط ابتلا به EAE در پاسخ به آلاینده‌ها است، جهت آشکار شدن مکانیسم دقیق DEP لازم است مطالعات و تحقیقات جامع‌تری روی غلظت‌های متفاوت، ترکیبات متفاوت اعم از ذرات و گازها، شرایط مختلف در معرض DEP قرار گرفتن و مدت زمان مواجهه و از طرف دیگر در مورد تغییرات در بافت‌هایی مانند مغز و نیز پاسخ‌های سایر سلول‌های ایمنی مهم در EAE انجام گیرد.

منابع

1-Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 2005; 53: 285-302.

2-Makar TK, Trisler D, Bever CT. Stem cell based delivery of IFN-beta reduces relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2008; 196(1-2): 67-81.

3-Anderson DW, Ellenberg JH, Leventhal CM, Reingold SC, Rodriguez M, Silberberg DH. Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. *Ann Neurol* 1992; 31(3): 333-336.

4-Oksenberg JR, Barcellos LF. The complex genetic aetiology of multiple sclerosis. *J Neurovirol* 2002; 6 Suppl 2: S10-2.

5-Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci* 2009; 277 Suppl 1: S3-8.

6-Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343(13): 938-952.

7-Accelerated Cure Project, Inc. Analysis of research into the role of toxic agents in the etiology of multiple sclerosis . Draft: August 9, 2007.

8-Behrouz M, Hosseini Z, Sedaghat F, Soufi M, Rashidkhani B .The relationship between Food Groups and Multiple Sclerosis disease: a case control study in tehranian adult. *Scientific Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*. 2013; 11(3): 39-53.

9-Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, Lotfi J, Pakdaman H. Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8,000 patients and changes over time. *Eur Neurol.* 2010; 64(6):331-6.

10-Izadi S, Nikseresht AR, Sharifian M, Sahraian MA, Hamidian Jahromi A, Aghighi M, et al. Significant Increase in the Prevalence of Multiple Sclerosis in Iran in 2011. *Iran J Med Sci*. 2014; 39(2):152-3.

11-Ghorbani M, Firooz Zarea A. Valuation of different characteristics of air pollution in Mashhad. *J Tahghighat-e-Eghtesadi*. 2010; 44(4): 215-41.

12-Ziaei S , Moridi M, Kazemnejad A . Relationship between concentration of inhaled pollutants, Sulfur Dioxide and Nitrogen Dioxide and spontaneous abortion. *J Iran Univ Med Sci.* 2011; 19(98) : 1-10

13-Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss SH, Genc K. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *J Toxicol*. 2012; 782462.

14-Oppenheim H, Lucero J, Guyot A, Herbert L, McDonald J, Mabondzo A, et al. Exposure to vehicle emissions results in altered blood brain barrier permeability and expression of matrix metalloproteinases and tight junction proteins in mice. *Oppenheim et al. Particle and Fibre Toxicology* 2013, 10:62.

15-Hartz AM, Bauer B, Block ML, Hong JS, Miller DS. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P- glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *Faseb J*. 2008; 22(8):2723-33.

16-Farhat SC, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM, Braga AL. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev*. 2011; 11(1):14-21.

17-Campbell A, Araujo JA, Li H, Sioutas C, Kleinman M. Particulate matter induced enhancement of inflammatory markers in the brains of Apo lipoprotein E knockout mice. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009; 9(8):5099-5104.

18-Andrew D. Kraft and G. Jean Harry. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2011; 8(7): 2980–3018.

19-Levesque S, Surace MJ, McDonald J, Block ML. Air pollution & the brain: Sub chronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation.* 2011; 8:105.

20-Krivoshto IN, Richards JR, Albertson TE, Derlet RW. The toxicity of diesel exhaust: implications for primary care. *J Am Board Fam Med*. 2008; 21(1):55-62.

www.SID.ir

Archive of SID

21-Ma JY, Ma JK. The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2002; 20(2):117-147.

22-Oikonen M, Laaksonen M, Laippala P, Oksaranta O, Lilius EM, Lindgren S, et al. Ambient air quality and occurrence of multiple sclerosis relapse. *Neuroepidemiology.* 2003; 22(1):95-99.

23-Sheng W, Yang F, Zhou Y, Yang H, Low PY, Kemeny DM, et al. STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation. *Cell research.* 2014;24(12):1387-402.

24-Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55)peptide in C57BL6/J strain of mice. *Journal of autoimmunity*. 2003;20(1):51-61.

25-Trubiani O, Giacoppo S, Ballerini P, Diomede F, Piattelli A, Bramanti P, et al. Alternative source of stem cells derived from human periodontal ligament: a new treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem cell research & therapy*. 2016;7:1.

26-Folkmann JK, Risom L, Hansen CS, Loft S, Moller P. Oxidatively damaged DNA and inflammation in the liver of dyslipidemic ApoE-/- mice exposed to diesel exhaust particles. *Toxicology*. 2007;237(1-3):134-44.

27-Furlan R , Cuomo C , Martino G. Animal model of multiple sclerosis. *Mol Biol*. 2009; 549:157-173.

28-Hiura TS, Li N, Kaplan R, Horwitz M, Seagrave JC, Nel AE. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J Immunol*. 2000; 165(5):2703-11.

29-Yun YP, Lee JY, Ahn EK, Lee KH, Yoon HK, Lim Y. Diesel exhaust particles induce apoptosis via p53 and Mdm2 in J774A.1 macrophage cell line. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(1):21-8.

30-Seriani R, Junqueira MS, Carvalho-Sousa CE, Arruda AC, Martinez D, Alencar AM, et al. Enriched inorganic compounds in diesel exhaust particles induce mitogen-activated protein kinase activation, cytoskeleton instability, and cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2015; 67(4):323-9.

31-Song JJ, Lee JD, Lee BD, Chae SW, Park MK. Effect of diesel exhaust particles on human middle ear epithelial cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012; 76(3):334-8.

32-Saito Y, Azuma A, Kudo S, Takizawa H, Sugawara I. Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low- and high-dose diesel exhaust exposure. *Exp Lung Res*. 2002; 28(6):493-506.

33-Larcombe AN, Phan JA, Kicic A, Perks KL, Mead-Hunter R, Mullins BJ. Route of exposure alters inflammation and lung function responses to diesel exhaust. *Inhal Toxicol*. 2014; 26(7):409-18.

34-Lim HB, Ichinose T, Miyabara Y, Takano H, Kumagai Y, Shimojyo N, et al. Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25(6):635-44.

35-Saxena QB, Saxena RK, Siegel PD, Lewis DM. Identification of organic fractions of diesel exhaust particulate (DEP) which inhibitnitric oxide (NO) production from a murine macrophage cell line. *Toxicol Lett*. 2003; 143(3):317-22.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effect of Diesel Engine Particles on Peritoneal Macrophages Activity in Normal and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice

Esmat Jafarzadeh[1], Mehdi Mahdavi[2], Barat Ghobadian[3], Roya Yaraee[4*]

1-MSC of Immunology.
2-Assistant Professor, of Immunology.
3-Associate Professor, of Mechanics of Biosystem.
4-Associate Professor, of Immunology.

1,4-Department of Immunology, Medical Faculty of Shahed University, Tehran, Iran.
2-Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3-Department of Mechanics of Biosystem, Agricultural Fculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Roya Yaraee; Department of Immunology, Medical Faculty of Shahed University, Tehran, Iran.
Tel:+982188964792
Email: ryaraee@yahoo.com

Abstract

Backgrounds and Objective: Air pollution affects the immune system in ways yet partially understood. One of the important pollutants is diesel engine particles (DEP). In this study, the effects of these particles on the peritoneal macrophages activity in normal and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice was investigated.

Subjects and Methods: Female C57BL/6 mice, aged 8–10 weeks, divided into 4 groups. EAE was induced via injection of MOG35-55 suspended in complete Freund's adjuvant (CFA) and pertussis toxin. The treatment groups received intra peritoneal 5µg/mice of DEP suspended in PBS for 21 days. PBS was injected to control groups. Body weight, nitric oxide and the activity peritoneal macrophages were evaluated.

Results: There was significant increase in level of nitric oxide in DEP-injected normal mice ($P<0.000$) compared to control. However, there was significant decrease in the levels of nitric oxide and activity of peritoneal macrophages in DEP-injected EAE mice (respectively $P<0.01$ and $P<0.02$).

Conclusion: These data indicate that although DEP may causes an increase in nitric oxide production of peritoneal macrophages in normal mice but increases macrophage death in EAE mice. So, the effect of pollutants in normal and EAE mice differs considerably and it should be considered for further investigation to clarify the exact mechanisms.

Keywords: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Diesel Exhaust, Nitric Oxide, Vital Activity.

►*Please cite this paper as:*
Jafarzadeh E, Mahdavi M, Ghobadian B, Yaraee R. DarrehGhaedi. The Effect of Diesel Engine Particles on Peritoneal Macrophages Activity in Normal and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice. Jundishapur Sci Med J 2016;15(4):485-495.

Received: May 8, 2015 **Revised: June 8, 2015** **Accepted: June 29, 2016**

www.SID.ir