مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۸۴
صفحات ۱۱۱-۱۲۰

اثر اینترفرون گاما (γ-IFN) بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای موش دریافت کننده سیکلوفسفامید

کاظم احمدی* Ph.D. ، قاسم سلگی* M.Sc. ، محمود مفید M.Sc.**
حسین ایمانی Ph.D.**

چکیده

هدف: بررسی اثر اینترفرون گاما بر ترشح نیتریک اکساید بعنوان یکی از عملکرد های ایمنی دخیل در فرایند پاتولوژی ریه موش و مقاومت در برابرعفونت های فرصت طلب.

روش بررسی : در این مطالعه تجربی موشها بصورت داخل صفاقی روزانه بمدت ۵ روز دوزهای متفاوتی از سیکلوفسفامید را دریافت نمودند. وزن موشها هر هفته یادداشت شد. پس از ۲۸ روز موشها را کشته و مقدار ۵ میلی لیتر PBS سرد را بداخل صفاق تزریق و پس از ماساژ، با کمک پیپت پاستور سلولهای صفاقی بدست آمد. برای تهیه ماکروفاژهای ریوی مقدار۲ میلی لیترPBS سرد را بداخل ریه تزریق و با آسپیره نمودن، مایع لاواژ تهیه شد. پس از سه بار شستشو، سوسپانسیون سلولی تهیه شد. در مورد لاواژ پس از سانتریفوژ نمودن، مایع رویی جهت اندازه گیری مقدار نیتریت ذخیره و سلولهای باقیمانده شمارش و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. مقدار ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی 10^4 سلول ریوی در میلی لیتر به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل و پس از ۲ ساعت انکوباسیون سلولهای غیرچسبنده (غیر ماکروفاژ) حذف شد. مجددا مقدار ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر LPS در حضور یا عدم حضور ۱۰۰ واحد γ-IFN در میلی لیتر به هر چاهک اضافه و بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ٪۵ CO_2 انکوبه شدند. پس از انکوباسیون مقدار نیتریت موجود در مایع رویی هر چاهک کشت سلولهای ماکروفاژی بعنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید بروش گریس اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که غلظت پایین سیکلوفسفامید (۱/۵ میلی گرم در روز) در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی می شود (۲±۴۸٪ و P<۰/۰۵) در حالی که ترشح آن توسط ماکروفاژهای ریوی در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. همچنین غلظت زیاد سیکلوفسفامید (۴/۵ میلی گرم در روز) در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی شد (۵±۷۰ ٪ در ماکروفاژهای صفاقی و۵۶٪ در ماکروفاژهای ریوی و۰/۰۵ >P). تحریک توام با LPS و γ-IFN باعث افزایش ۲۰۰٪ و۲۴۰٪ ترشح نیتریک اکساید به ترتیب توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی شد (P<۰/۰۲) .

نتیجه‌گیری: بنابراین به نظر می رسد که بخشی از عوارض ایمونوساپرسیوی که منجر به رشد عفونتهای فرصت طلب می شود احتمالا مربوط به کاهش نیتریک اکساید باشد. لذا با توجه به اینکه γ-IFN باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید در گروهی که دوز بالای سیکلوفسفامید دریافت کرده اند می‌شود. بهتر است در حالتی که میزبان تحت درمان سیکلوفسفامید است از عوامل تقویت کننده پاسخ ایمنی نیز استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سیکلوفسفامید، گاما اینترفرون، لیپوپلی ساکارید، نیتریک اکساید، ماکروفاژ ریوی، ماکروفاژ صفاقی

دریافت مقاله ۱۳۸۳/۱۱/۱۳، پذیرش مقاله۱۳۸۴/۳/۲۸

* نویسنده مسئول : دانشیار گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله «عج» تهران – ایران ، ** گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله «عج»
آدرس پست الکترونیکی: K.ahmadi@bmsu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سیکلوفسفامید که در سطح وسیعی بعنوان داروی ضد سرطان استفاده می‌شود. (۱) یکی از عوامل الکیله کننده است که نتایج تجربی و کلینیکی اثرات دوگانه آن را در پاسخ ایمنی نشان می‌دهد. (۲) سیکلوفسفامید باعث ایجاد اپوپتوزیس در سلولهای سرطانی و جنینی موش (۳-۶) ، ریه و تیموس رت (۸،۷) می‌شود. هرچند دارو دارای خاصیت ضد سرطان خوبی است و باعث کاهش حجم تومور می‌شود ولی دوز اضافه آن معمولا ضعفی را در مکانیزم‌های دفاعی میزبان ایجاد می‌کند. این ضعف معمولاً منجر به مهار پاسخ‌های ایمونولوژی و اغلب باعث رشد عفونت‌های فرصت‌طلب و بعضی مواقع باعث بروز رشد دوباره سرطان می‌شود. (۱۰،۹) در حالی که دوز بالای سیکلوفسفامید دارای عوارض فوق می‌باشد، دوز مناسب آن (دوز پایین) باعث افزایش پاسخ ایمنی در حیوان و هم در انسان می‌شود. (۱۱- ۱۵) درمان با سیکلوفسفامید در دوز پایین باعث برگشت قدرت تکثیر لنفوسیت‌های طحال حیوان دارای تومور شده در حالی که در طی دوران تومور قبل از درمان این قدرت تکثیر کاهش می‌یابد. (۱۷،۱۶) مطالعات نشان داده است که درمان با دوز پایین سیکلوفسفامید همچنین باعث کاهش ترشح سایتوکاین‌هایی مثل IL-۱۰ , TGF-β توسط سلولهای Th_2 و در نتیجه افزایش ترشح نیتریک‌اکساید توسط سلولهای طحالی می‌شود، در حالی که ترشح مواد فوق در دوران وجود تومور قبل از درمان کاهش مقدار را نشان می‌دهد. (۱۰)

ماکروفاژها با ترشح مواد پیش التهابی، مولکولهای تنظیم کننده ایمنی، پردازش آنتی ژن، تجمع فیبرین، فاگوسیتوز، ترشح مواد وابسته به اکسیژن نظیر سوپر اکساید (۱۸) و نیتروژن (نیتریک اکساید) (۲۰،۱۹) نقش مهمی را در دفاع میزبان بعهده دارد. به منظورسنتز و ترشح نیتریک اکساید، آرژنین بعنوان سوبسترا برای آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز مورد نیاز است. فعالیت این آنزیم در ماکروفاژها و سلولهای ایمنی وابسته به تحریک با ماده محرکی مثل LPS و IFN-γ (۲۱) می‌باشد. از طرفی علاوه‌بر نقشی که نیتریک اکساید در دفاع میزبان دارد، افزایش ترشح آن ممکن است منجر به گشادی عروق، ادم و سایتوتوکسیسیتی شده و احتمالا مسئول فرایند اعمال سایتوکاین‌ها در ریه می‌باشد. (۲۲) شواهد موجود نشان می‌دهند که آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز در سلولهای اپی تلیال و ماکروفاژهای افراد سالم بروز نیافته ولی در افراد آسمی احتمالاً تحت تاثیر سایتوکاین‌ها بروز می‌یابد. (۲۴،۲۳) . در این رابطه IL-4 اولین سایتوکاینی بود که نقش آن در مکانیسم تنظیم نیتریک اکساید شناخته شد. (۲۵)

Moncada نیز گزارش نمود (۲۶) که نیتریک اکساید در بیماری‌های التهابی نقش داشته و افزایش مقدار نیتریت در مایع سینوویال و سرم بیماران روماتوئیدی تایید شده است. (۲۲) لذا به نظر می‌رسد که عمل نیتریک‌اکساید در این فرایند وابسته به نقش آن در مکانیسم‌های سایتوتوکسیک ماکروفاژهای فعال شده و اثرات ضد تکثیر سلولی آن می‌باشد. هدف از این مطا لعه، بررسی اثر محرکهای LPS, γ-IFN بر ترشح نیتریک اکساید، بعنوان بخشی از مکانیزمهای دفاعی توسط ماکروفاژهای بدست آمده از حیوان دریافت کننده سیکلوفسفامید و مشاهده ضایعات احتمالی ریه ناشی از اثر سیکلوفسفامید بود.

روش بررسی

تزریق دارو به حیوان:

۲۴ سر موش سوری نر با ۸ هفته سن و وزن متوسط ۳۰ گرم از انستیتو تحقیقاتی سرم‌سازی رازی خریداری شد. قبل از هرگونه آزمایش به منظور تطبیق شرایط محیطی موشها بمدت یک هفته در آزمایشگاه پرورش حیوانات نگهداری شدند. موشها در ۴ گروه شش‌تایی تقسیم و هر گروه در یک قفس نگهداری شدند. سیکلوفسفامید به غلظتهای متفاوت تهیه شد. گروه اول به منظور کنترل (گروه شم) فقط روزانه حجم مساوی با گروههای تست آب مقطر دریافت نمودند. گروه دوم الی چهارم بمدت ۵ روز هر روز بترتیب مقدار ۱/۵ و

Archive of SID

www.SID.ir

۳و ۴/۵ میلی گرم سیکلوفسفامید در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر دریافت نمودند. تمام تزریقات بصورت داخل صفاقی انجام گرفت. موشها بمدت ۲۸ روز پس از اولین تزریق در شرایط قبلی نگهداری شدند. (۲۸)

تهیه ماکروفاژ و اضافه نمودن LPS و γ-IFN. وزن موشها هرهفته یادداشت و پس از مدت مذکور تمام گروهها با روش قطع نخاعی کشته شدند. مقدار ۵-۸ میلی لیتر PBS سرد بداخل صفاق هر موش تزریق شد. پس از ماساژ آهسته به منظور رهایش سلولها از جداره صفاق با پیپت پاستور مخصوص, سلولهای صفاقی بر داشته و به لوله های از قبل آماده انتقال یافتند. با تزریق مقدار ۲ میلی لیتر بداخل ریه، مایع لاواژ و سلولهای ماکروفاژی نیز تهیه شد. به منظور اجتناب از چسبندگی سلولها، تمام مراحل در شرایط روی یخ انجام شد. سلولها ۳ بار با PBS سرد شسته شده و نهایتاً پس از شمارش سلولها، سوسپانسیون سلولی در محیط ۱۶۴۰ RPMI (Sigma Co) بدون فنول رد تهیه گردید. (۲۹) در مورد نمونه ریوی مایع رویی بعنوان مایع لاواژ قلمداد و جهت اندازه گیری نیتریت ذخیره شد. تعداد $1X10^4$ سلول در حجم ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل {حاوی ۱۰٪- Fetal Calf Serum- FCS و آنتی بیوتیک به مقدار ۵۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۵۰ واحد پنی‌سیلین در میلی‌لیتر} به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. سلولها بمدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. به منظور رهایی از سلولهای غیر ماکروفاژی پس از ۲ ساعت مایع رویی هرچاهک پلیت بآهستگی بیرون ریخته شد و هر چاهک سه بار با PBS گرم بآرامی شسته شد. به هر چاهک حاوی ماکروفاژ (سلولهای چسبیده به کف پلیت) مقدار ۰/۲ میلی لیتر از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ بدون فنول رد (کامل) حاوی ۱۰ میکرو گرم LPS و ۱۰۰ واحد گاما اینتر فرون (γ-IFN) اضافه شد. به ردیف اول هر پلیت هیچگونه ماده جدیدی اضافه نشد (ردیف کنترل). پلیت‌ها بمدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط فوق انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک بطور جداگانه برداشت و پس از سانتریفوژ کردن جهت اندازه گیری نیتریک اکساید استفاده شد. (۲۱)

اندازه گیری نیتریک اکساید. نیتریک اکساید ماده‌ای است بسیار ناپایدار و سریعاً به نیتریت و نیترات تبدیل می‌شود. لذا مقدار نیتریت بعنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید به روش گریس اندازه گیری شد. (۲۹) بطور خلاصه مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک با ۵۰ میکرو لیتر از ماده گریس (1% Sulphanilamid, 0.1% N-1-aphtylethylenediamine hydrochloride, و 5%PO4H3.) مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در حرارت اتاق، جذب نوری (OD) رنگ تولیدی بوسیله ریدر (micro plate multiscan) در ۵۴۰ نانو متر مقابل بلانک قرائت و با استفاده از غلظتهای مختلف نیتریت سدیم بعنوان منحنی استاندارد مقدار نیتریت بر حسب نانومولار محاسبه شد.

تهیه نمونه‌های بافتی. بخشی از ریه جهت بررسی پاتولوژی به روش زیر آماده شد.

نمونه‌ها پس از جدا شدن در محلول فیک تیو فر مالین ۱۰٪ بمدت یک هفته قرار گرفتند. پس از مراحل آماده سازی بافت، توسط دستگاه Proccessing و قالب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری Leit2 ، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون برش زده شد. برای مطالعات بافت شناسی، مقاطع با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، تولو ئیدین بلو، و ان‌گیس رنگ‌آمیزی شدند.

آنالیز داده‌ها. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری Npar Test (Mann-Whitney) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج بدست آمده نشان داد که استفاده سیکلو فسفامید در دوز ۱/۵ میلی گرم در روز باعث شد که ماکروفاژهای صفاقی در پاسخ به محرکهای LPS و گاما اینترفرون به تنهایی کاهشی برابر ۴۸٪ و ۴۴٪ را از خود در ترشح نیتریک اکساید نشان دهند (جدول ۱و۲) ($p<0.02$). در حالی که تغییر در مقدار نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی بدست آمده از گروهی که دوز ۱/۵ میلی گرم سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند

www.SID.ir
Archive of SID

جدول ۱. اثر LPS و گاما اینترفرون بطور جداگانه بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بدست آمده از موشهای دریافت کننده غلظتهای مختلف سیکلوفسفامید.

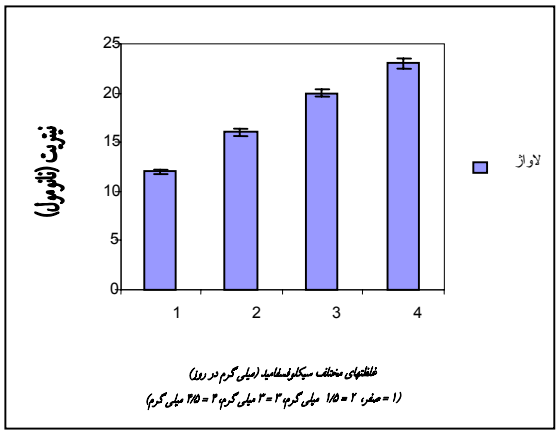
سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز)	نیتریت (نانو مول)- ماکروفاژهای ریوی		نیتریت (نانو مول)- ماکروفاژهای صفاقی	
	LPS	γ-IFN	LPS	γ-IFN
کنترل	۳۰	۳۰	۵۰	۵۰
۱/۵	۳۱	۳۲	۲۶	۲۸
۳	۳۸	۴۳	۶۴	۷۸
۴/۵	۵۵	۷۲	۸۵	۹۵

جدول ۲ . اثر استفاده توام گاما اینترفرون و LPS بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بدست آمده از موشهای دریافت کننده غلظتهای مختلف سیکلوفسفامید

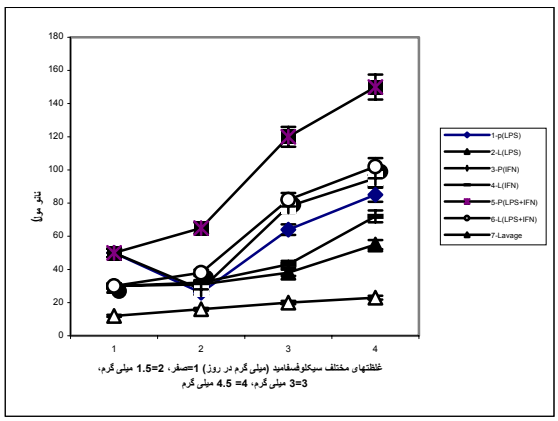
مقدار سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز)	نیتریت (نانومول)- ماکروفاژهای ریوی	نیتریت (نانومول)- ماکروفاژهای صفاقی
کنترل	۳۰	۵۰
۱/۵	۳۸	۶۵
۳	۸۲	۱۲۰
۴/۵	۱۰۲	۱۵۰

جدول۳. مقایسه درصد تغییرات (کا= کاهش/ افز=افزایش) ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بدست آمده ازموشهای دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به محرکهای LPS/LPSوγ-IFN درمقایسه با گروه شم (عدم دریافت سیکلوفسفامید)

مقدار سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز	درصد کاهش/افزایش نیتریت در ماکروفاژ صفاقی (LPS)	درصد کاهش/افزایش نیتریت در ماکروفاژ ریوی (LPS	درصد کاهش/افزایش نیتریت در ماکروفاژ صفاقی (IFN)	درصد کاهش/افزایش نیتریت در ماکروفاژ ریوی (IFN	درصد کاهش/افزایش نیتریت در ماکروفاژ صفاقی (LPS+IFN	درصد کاهش/افزایش نیتریت در ماکروفاژ ریوی (LPS+IFN)	درصد کاهش/افزایش نیتریت در مایع لاواژ
کنترل	–	–	–	–	–	–	–
۱/۵	۴۸کا	۳/۳افز	۴۴کا	۶/۶۶افز	۳۰افز	۲۶/۶۶افز	۳۳/۳۳افز
۳	۲۸افز	۲۶/۶۶افز	۵۶افز	۴۳/۳۳افز	۱۴۰افز	۱۷۳/۳افز	۶۶/۶۶افز
۴	۷۰افز	۸۳/۳۳افز	۹۰افز	۱۴۰افز	۲۰۰افز	۲۴۰افز	۷۵افز

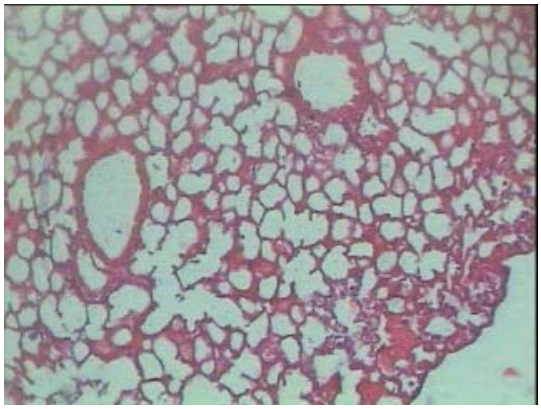


نمودار ۱. مقدار نیتریک‌اکساید در مایع لاواژ موشهای دریافت‌کننده غلظتهای مختلف سیکلوفسفامید

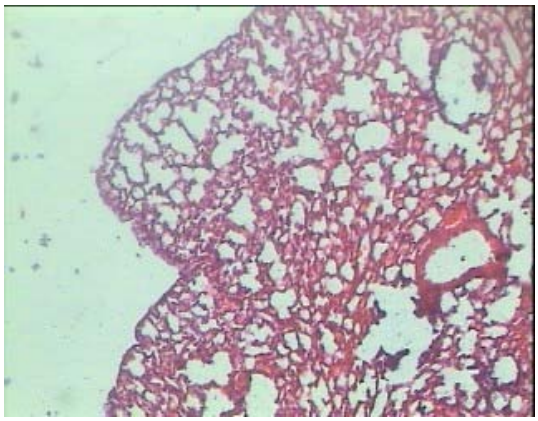


نمودار ۲. مقایسه نیتریک‌اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی- ریوی بدست آمده از موش دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به LPS (LPS/IFN) و مقدار آن در مایع لاواژ

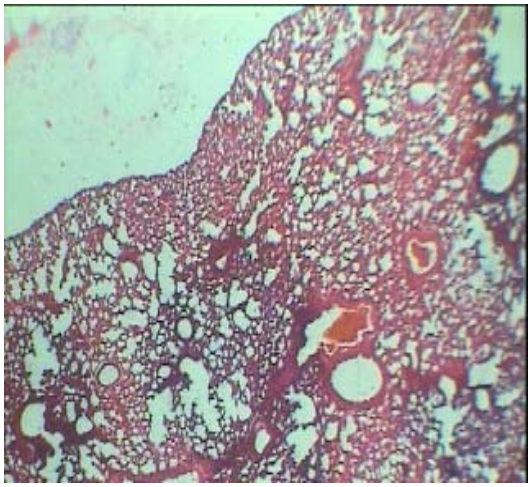
www.SID.ir



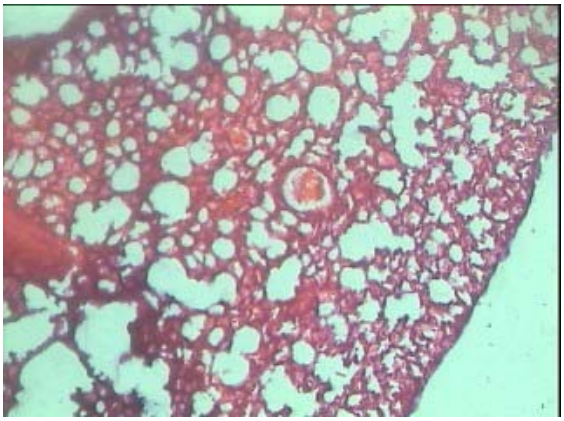
شکل ۱. پاتولوژی ریه موش گروه کنترل



شکل ۲. پاتولوژی ریه موش گروه دریافت.کننده سیکلو فسفامید ۱,۵ میلی گرم در روز



شکل ۳. پاتولوژی ریه موش گروه دریافت.کننده سیکلو فسفامید ۳ میلی گرم در روز



شکل ۴. پاتولوژی ریه موش گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید ۴,۵ میلی گرم در روز

در پاسخ به هرکدام از محرکهای LPS و گاما اینترفرون به تنهایی معنی دار نبود (جدول ۱). ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بدست آمده از گروه دریافت کننده ۱/۵ میلی‌گرم سیکلوفسفامید (روزانه) در پاسخ به ترکیب توام LPS و گاما اینترفرون به ترتیب افزایش ۳۰٪ و ۲۶/۶۶٪ (۵) را در ترشح نیتریک اکساید داشتند (جدول۲و ۳) ($P<0.02$). ماکروفاژهای بدست آمده از گروههای دریافت کننده دوز بالاتری از سیکلوفسفامید (۳ یا ۴/۵ میلی گرم روزانه) همه در پاسخ به LPS و گاما اینترفرون (تنها یا توام) افزایش معنی‌داری را در ترشح نیتریک اکساید داشتند (جدول ۳) ($P<0.05$). نتایج بدست آمده از مایع لاواژ نشان داد که تمام دوزهای مورد استفاده باعث افزایش مقدار نیتریک اکساید در مایع لاواژ بوده‌اند (شکل ۱) ($P<0.02$). نتایج پاتولوژی ریه نیز عارضه مشخصی از قبیل پیدایش فیبروز یا برونشیولیت را در هیچکدام از گروهها نشان نداد (شکلهای ۳-۶)

بحث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که ماکروفاژهای بدست آمده از موش دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به LPS در مقایسه با گروه شم (گروه دریافت کننده آب مقطر) مقدار کمتری نیتریک اکساید تر شح می‌کنند.

نتایج حاصل از این مطالعه با یافته‌های سایر محققین که اثرات متفاوتی از اثر سیکلوفسفامید را در رابطه با پاسخ ایمنی

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش نموده‌اند تفاوت دارد (۳۰-۳۴) . گزارشات قبلی محققین نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید در دوز پایین باعث برگشت قدرت تکثیر لنفوسیتها ی طحالی می‌شود. (۱۷،۱۶) از طرفی Matar نشان داده که نیتریک اکساید باعث کاهش تکثیر لنفوسیتها می‌شود. لذا به نظر می‌رسد که بخشی از اثر سیکلوفسفامید در برگشت قدرت تکثیر لنفوسیتها ناشی از قدرت نیتریک اکساید باشد. هر چند تفاوتهایی در تحقیق حاضر با یافته‌های دیگران وجود دارد (۳۵) چرا که آنها از سلولهای طحالی و ما در اینجا از سلولهای صفاقی و ریوی استفاده نمودیم. در سلولهای طحالی مخلوطی از سلولهای T و B و ماکروفاژها وجود دارد. طبیعتاً سایتوکاینهای مترشحه از سلولهای T از قبیل، اینتروکین-۱۰ ، TGF-β که ترشح آنها تحت تاثیر سیکلوفسفامید می‌باشد می‌تواند بطور غیر مستقیم در ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها اثر بگذارد. نتایج در این تحقیق نشان داد که در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید در دوز پایین (۱/۵ میلی گرم)، LPS باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید (۴۸٪) توسط ماکروفاژهای صفاقی شده ($P<0.02$)، در صورتیکه تاثیری بر ماکروفاژهای ریوی نداشته است. در دوزهای بالاتر ماکروفاژهای صفاقی و ریوی هر دو در پاسخ به LPS افزایش مقدار نیتریک اکساید را داشته اند (جدول ۱). این نتایج در پاسخ به گاما اینترفرون نیز صادق است با این تفاوت سیکلوفسفامید در دوز پایین باعث شده که این سلولها در پاسخ به LPS وγ-IFN از لحاظ ترشح نیتریک اکساید افت داشته باشند. در حالی که سیکلوفسفامید در دوز بالا نه تنها باعث کاهش ترشح آن نشده بلکه به نظر می‌رسد با اثر اولیه بر ماکروفاژها در *In vivo* باعث شده که این سلولها در *In vitro* در پاسخ به تحریک LPS وγ-IFN مقدار بیشتری نیتریک اکساید ترشح کنند. (۳۶) ولی نتایج حاصل از ترکیب توام LPS وγ-IFN متفاوت از دوحالت قبل بود (جدول۲). بدین صورت که ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بدست آمده ازموش دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به LPS وγ-IFN صرف نظر از دوز سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل مقدار بیشتری نیتریک اکساید ترشح نموده اند (جدول۲). نتایج حاصل از اندازه‌گیری نیتریک اکساید در مایع لاواژ نشان می‌دهد که مقدار NO در مایع لاواژ موشهای دریافت کننده سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بوده و این افزایش مقدار وابسته به دوز می باشد (شکل۱). بطوریکه حداقل افزایش در گروه ۱/۵ میلی گرم سیکلوفسفامید و برابر با ۳۳/۳۳٪ بوده (جدول۳). حداکثر افزایش در پاسخ به ۴/۵ میلی‌گرم و برابر با ۹۹/۹۹٪ بوده است. نتیجه آنکه به نظر می رسد، سیکلوفسفامید باعث تحریک اولیه ماکروفاژها در پاسخ به LPS وγ-IFN در ترشح نیتریک اکساید شده و γ-IFN یک اثر سینر ژیسم با LPS داشته است (شکل۱). علت دیگر تفاوت مقدار نیتریک اکساید در مایع لاواژ گروههای دریافت کننده دوزهای مختلف اثر سیکلو فسفامید با تر شح آن توسط ماکروفاژها می‌تواند بدلیل تاثیر سایر عوامل محیطی *In vivo* باشد نتایج پاتولوژی نشان داد که دوز استفاده شده تاثیر سویی بر بافت ریه نداشته است (شکلهای۶-۳). با توجه به عدم وجود ضایعه پاتولوژیک در ریه، به نظر می‌رسد که دوز انتخابی بدون عارضه جانبی بوده و سلولهای ریوی سالم می باشند. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج سایر همکاران از یک هماهنگی متناسبی بر خوردار می باشند. در این رابطه Matar (۳۵) نشان داده که میزبان دارای تومور مقدار زیادی TGF-β, IL-10, و نیتریک اکساید ترشح می‌کنند. او بیان می دارد که احتمالاً واسطهای ایجادی فوق می‌توانند مسئول بخشی از مهار پاسخ ایمنی در سرطان باشند. چرا که اینترلوکین-۱۰ و TGF-β هردو توسط سلولهای Th_2 ترشح شده و بر اعمال Th_1 اثر مهاری دارند. مطالعات قبلی ما در *In vitro* نشان داده که TGF-β باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی می‌شوند. (۳۷) Hotle و همکاران نیز نشان داده‌اند که نقش آنتی‌توموری سیکلوفسفامید احتمالا از طریق افزایش توان عمل سلولهای دندریتیک اعمال می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

Lutsiak (۳۸) و همکاران نیز اخیرا ثابت کرده‌اند که سیکلوفسفامید در دوز پایین با مهار عمل سلولهای TCD_4^+,CD_{25}^+ باعث افزایش پاسخ ایمنی می‌شوند. (۳۹) از طرفی، هر چند Pusztai و همکارانش تفاوت معنی‌داری در مقدار سایتوکاینهای سرمی بیماران با سرطان سینه و گروه کنترل پیدا نکردند (۴۰) ، ولی Artym و همکارانش نشان دادند که در موشهای تحت درمان با سیکلو فسفامید ، لاکتو فرین با افزایش تر شح IL-6 توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی باعث بر گشت نقص ایمنی ناشی از سیکلو فسفامید می‌شود. (۴۱) او همچنین نشان داده که تزریق داخل رگی LPS در موشهای دریافت کننده سیکلوفسفامید باعث افزایش سطح IL-6 سرمی می‌شود.

نتیجه‌گیری: بنابر این با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و اطلاعات بدست آمده از سایر همکاران می‌توان نتیجه گرفت که سیکلوفسفامید به تنهای در *In vivo* باعث افزایش فعالیت سولهای Th_2 شده و بدین وسیله مسئول بخشی از مهار ایمنی ا یجادی در میز بان می‌باشد. هر چند سیکلوفسفامید در*In vivo* با افزایش ترشح نیتریک اکساید همگام با افزایش ترشح TGF-β, IL-10 باعث کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود ولی در حالتی که توام با LPS وγ-IFN استفاده شود بدلیل افزایش مقدار نیتریک اکساید و عدم تغیر در TGF- β و اینترلوکین-۱۰ از قدرت ایمونوساپریسو آن کاسته شده و می‌تواند اثرات بهبودی بهتری در درمان سرطان داشته باشد.

تقدیـر و تشکر : با تشکراز مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی به جهت همکاری در سهیل امکانات و آقای دکتر یونس پناهی به جهت همکاری ارزشمند نامبرده در تهیه مواد دارویی مورد نیاز و با تشکراز خانم فاطمه عرب سلمانی تکنسین آزمایشگاه تحقیقات ایمونولوژی.

References

1. Tzai TS, Lin JS, and Chew NH. Modulation of anti tumor immunity of tumor-bearing mice with low dose cyclophosphamide. J Surg Res 1996; 65: 139-44.

2. Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, Inobe M, Iwabuchi K, miyazaki T, Onoe K, Iwata M, Uede T. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. International Immunology 2003; 15(6): 741-49.

3. Meyn RE, Stephens NR, Hunter L, Milas L. Induction of apoptosis in murin tumors by cyclophosphamide, Cancer Chemother. Pharmacol 1994; 33: 410-14.

4. Nomura M, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Tamura J, Koike M, Jie T, Itoh G. Cyclophosphamide - induced apoptosis induced phocomelia in the mouse. Arch. Toxicol 1996; 70: 672-77.

5. Chen B, Cyr DG, Hales BF. Role of apoptosis in mediating phospharamide mustard-induced rat embryo malformations *in vitro*. Teratology 1994; 50: 1-12.

6. Moallem SA, Hales BF. Induction of apoptosis and cathepsin D. in limbs exposed *in vitro* to an activated analog of cyclophosphamide. Teratology 1995; 52: 3-14.

7. Sulkowska M, Sulkowski S. Apoptosis-like changes in the lung induced by cyclophoshamide and papaain:1. An Ultrastructural study.J. Submicroscopic Cytology and pathology 1998; 30: 105-16.

8. Wang GJ, Cai L. Relatively Low-dose yclophosphamide is likely to induce apoptosis cell

Archive of SID

www.SID.ir

death in rat thymus through Fas/Fas ligand pathway.

9. Diasio RB, Lo Buglio AF, Imunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Rudd RW, editors. Goodman and Gilman S 2003. The pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill 1996; 1291-308.

10. Matar P, Rozados VR, Gonzalez AD, Dlugovitzky DG, Bonfil RD, Scharovsky OG. Mechanism of antimetastatic immunopotentiation by low dose cyclophosphamide . Europian Journal of cancer 2000; (Part A) 36(8): 1060-66.

11. Awwad M, North RJ. Cyclophosphamide (cy) - facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumor. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumor burden. Immunology 1988; 65: 87-92.

12. Mokyr MB, Hengst JCD, Dray S. Role of anti-tumor immunity in cyclophosphamide - induced rejection of subcutaneous nonpalpable MOPC-315 tumors. Cancer Res 1982; 42: 974-9.

13. Rook GAW, Hernandez-Pando R, Lightman ST. Hormones, Peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. Immunology today 1994; 15(7): 301-303.

14. Souza-Filho MVP, Alves Lima MV, Lima Pompeu MM, Ballejo G. Involvement of Nitric Oxide in the pathogeniesis of cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis. Hagerstown 1997; 150(1): 247-56.

15. Teicher BA, Anti-tumor alkylating agents. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer-Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997; 405-18.

16. Matar P, Celoria GC, Font MT, Scharovsky OG. Antimetastatic effect of single–low dose of cyclophosphamide on rat lymphoma .J Exp. Clin Cancer Res 1995; 14: 59-63.

17. Matar P, Rozados VR, Roggero EA, Bonfil RD, Scharovsky OG. Modulation of the antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide on rat lymphoma. Tumor Biol 1998; 19: 69-76.

18. Brain JD. Mechanisms, measurement and significant of lung macrophage function. Environment. Health Persp 1992; 97: 5-10.

19. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachilin EM. Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage, effect to molecule. Biochem Biophys Res Commun 1989; 157: 87-96.

20. Jorens PJ, Matthys KE, Bult H. Modulation of Nitric Oxide synthase activity in macrophages. Med. Inflamm 1995; 4: 75-89.

21. AhmadiRenani K, McCruden AB. Sex differences in macrophage nitric oxide production. Iranian Journal of Medical Sciences 1998; 23(1&2): 42-47.

22. Clancy RM, Abramson SB. Nitric Oxide A novel mediator of inflammation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 1995; 210: 93-101.

23. Hamid Q, Springall DR, Riverros- Mareno, Chanez P. Introduction of nitric Oxide synthase in asthma. Lancet 1993; 342: 1510-13.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J. Nitric Oxide synthase in human and rat lung. immunocytochemical and histochemical localization. J Respiratory Cell Mol Biol 1993; 9: 371-377.

25. Liew FY, Li Y, Severn A. A possible novel pathway of regulation by murin T helper type-2 (Th2) cells of Th1 cell activity via the modulation of the modulation of the induction of nitric Oxide synthase on macrophages. Eur. J. Immunol 1991; 21: 2489-94.

26. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmaco. Rev 1991; 43(2): 109-141.

27. Farrel AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. Annas of the rheumatic disease 1992; 51: 1219-22.

28. Venkatesan N, Punithavathi D, Chandrakasan G. Glycoprotein composition in cyclophosphamide-inuced lung fibrosis. Biochemica et Biophysica Acta 1998; 1407: 125-134.

29. Green LC, Wagner DA, Glowgowski J, Skipper PL, Wishnok JJ, Tannenbaum SS. Analysis of Nitrate, nitrite and {^{15}N}Nitrate in Biological Fluids. Analytical Biochemistry 1982; 126: 131-38.

30. Awwad M, North RJ. Cyclophosphamide (cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumor. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumor burden. Immunology 1988; 65: 87-92.

31. Haddad IY, Panoskaltsis-Mortari A, Ingbar DH, Yang S. High levels of peroxinitrite are generated in the lungs of irradiated mice given cyclophosphamide and allogenic T cells: A potential mechanism of injury after marrow transplantation. Respiratory Cell and Molecular Biology 1999; 20(6): 1125-36.

32. Ishiyama N, Utsuyama M, Kitagawa M, Hirokawa K. Mechanism of ageing and Development 1999; 111: 1-12.

33. Mastrangelo MJ, Berd D, Maguire H Jr. The immunoaugmenting effects of cancer chemotherapeutic agents. Semin Oncol 1986; 13: 186-94.

34. Racca AL, Scharovsky OG, Celoria GC, Font MT. Immunomodulation por ciclofosfamida de Ia respuesta antitumoral a un sacoma de rata. Immunologia 1991; 10: 91-96.

35. Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG. Down regulation of T cell derived IL-10 production by low-dose cyclophosphamide treatment in tumor-bearing rats restores in vitro normal lymphoproliferative response. International Immunopharmacology 2000; 1: 307-19.

36. Piacibello W, Li L, Willams D. Human gamma interferon enhances release from phytohemalutinin-stimulated lymphocyte-T4 & of activities that stimulate colony formation by granulocyte–macrophage, erythroid, and multipotential progenitor cells Blood 1986; 68(6): 1339-47

37. Ahmadi K, Solgui GH. The effect of sex steroid hormones (17-beta estradiol and five alpha dihydrotestosterone) on Nitric Oxide production by rat alveolar marophages treated with TGF-β.Yachteh

Archive of SID

www.SID.ir

2004; 22: 75- 80.

38. Holtl L, Ramoner R, Zelle-Rieser C, Gander H, Putz T, Papesh C, Nussbaumer W, Falkensammer C, Bartsch G, Thurnher M. Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. Cancer Immunol 2005; 54(7): 663-70.

39. Lutsiak C, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4+25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low dose cyclophosphamide. Blood 2005; 105(7): 2862-68.

40. Pusztai L, Mendoza TR, Reuben JM, Martinez MM, Willey JS, Lara J, etal. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel. Chemotherapy Cytokines 2004; 25(3): 94-102.

41. Artym J, Zimecki M, Kruzel ML. Effects of lactoferrin on IL-6 production by peritoneal and alveolar cells in cyclophosphamide-treated mice. J Chemother 2004; 16(2): 187-92.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir