

اثر تحریک اولیه ماکروفاژها با گاما اینترفرون در پاسخ به لیپوپلی ساکارید و ترشح نیتریک اکساید

دکتر کاظم احمدی^۱

چکیده

مقدمه: گزارش‌ها نشان می‌دهند که چنانچه ماکروفاژها را قبل از تحریک با لیپوپلی ساکارید و گاما اینترفرون در معرض اینترلوکین - ۴ قرار دهند ماکروفاژها قادر به کشتن انگل لیشمانیای بلیعیده شده و ترشح نیتریک اکساید نمی‌باشند. در این مطالعه، اثر افزودن گاما اینترفرون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها بررسی شده است.

مواد و روش: ماکروفاژهای صفاتی موش Balbc، به تعداد و 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر مکعب در پلیت‌های ۲۴ خانه در ۲ میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 کشت داده و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در ۵٪ CO_2 درجه سانتیگراد سلول‌های غیر چسبنده شسته شدند. به سلول‌های چسبیده (ماکروفاژها) ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه و در گروه اول سلول‌ها بدون ماده محرک (کنترل) و یا همراه، با غلظت‌های مختلف LPS مقایسه گردیدند. در گروه دوم LPS یک ساعت بعد از γ -IFN اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد مقدار نیتریت (در NO_2) به عنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید (NO) به روش گریس اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که LPS در حالت وابسته به دوز، باعث افزایش LPS و ترشح نیتریک اکساید می‌گردد. حداقل و حداکثر افزایش به ترتیب در پاسخ به ۰/۰۱ و ۱۰ در میکروگرم در میلی لیتر حاصل شد. چنانچه ماکروفاژها یک ساعت قبل از تحریک با LPS در معرض γ -IFN قرار گیرند، γ -IFN اثر افزایشی در ترشح NO ندارد ولی که سانس LPS معرض و γ -IFN قرار گیرند، γ -IFN اثر افزایشی در ترشح NO مانع از پاسخ ماکروفاژها به و ترشح نیتریک اکساید نمی‌گردند. بحث: نتیجه آنکه بر خلاف IL-4 پاسخ ماکروفاژها به γ -IFN گردیده، γ -IFN تأثیری در پاسخ ماکروفاژها به LPS اکساید ندارد.

کل واژگان: نیتریک اکساید - ماکروفاژ - گاما اینترفرون - لیپوپلی ساکارید.

مجله پزشکی ارومیه، سال دوازدهم، شماره یک، ص ۶۴-۵۶، بهار ۱۳۸۰

مقدمه

نیتریک اکساید به عنوان بخشی از مکانیزم دفاعی میزبان توسط ماکروفاژهای تحریک شده، سنتز می‌گردد (۱). سنتز آن نیازمند سنتز پروتئین بوده (۲) و وجود اسید آمینه ال آرژینین ضروری است (۲ و ۳). این مسیر، مستقل از کلسیم است (۴) و اسید آمینه ال آرژینین در حضور NADPH (۵) به نیتریک اکساید تبدیل می‌گردد (۶). نیتریک اکساید در پاتولوژی بعضی از بیماری‌ها دخیل (۷) و در دفاع علیه پاتوژنهای عفونی و تومورها نیز نقش مهمی دارد لذا ضروری است که مقدار خاصی از آن ترشح شود. بنابر این مکانیزم داخلی باید آنرا تنظیم نماید. اولین ماده‌ای طبیعی که در تنظیم سنتز آن ساخته شد اینترلوکین - ۴ بود (۸). بعدها این موضوع توسط Leal (۹) مورد تایید قرار گرفت. او ثابت کرد که چنانچه ماکروفاژها را قبل از تحریک با لیپو پلی ساکارید (LPS) و گاما اینترفرون (γ -IFN) در معرض اینترلوکین - ۴ (IL-4) قرار دهند، قادر به کشتن لیشمانیای بلعیده شده نمی‌باشند. دو ساتوکاین دیگر یعنی اینترلوکین - ۱۰ (IL-10) (۱۰) و فاکتور رشد ($TGF-\beta$) (۱۱) نیز سنتز NO را مهار می‌کنند. بر خلاف دو سایتوکاین فوق، فاکتور ممانعت از مهاجرت ماکروفاژها (MIF)، سلول را در جهت تولید NO فعال می‌کنند (۱۲). انکوبه نمودن همزمان ماکروفاژها با IL-10 و rMIF باعث مهار فعالیت ضد لیشمانیایی rMIF و تولید NO توسط ماکروفاژهای موش می‌شود (۱۳). شواهد دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد پروتئین کیناز - C (PKC) در پاسخ ماکروفاژها در تحریک با LPS و γ -IFN در تولید NO دخالت دارد (۱۴ و ۱۵). پروتئین تیروزین کیناز در پاسخ ماکروفاژها در

تحریک با LPS و فعالیت ضد باکتریایی ضد توموری و تولید NO دخالت دارد (۱۶). به طوریکه مهار کننده‌های پروتئین تیروزین کیناز مثل A, Genistein, Herbimycin Tyrophostin باعث مهار فعالیت سنتز آنزیم می‌گردد (۱۶ و ۱۷ و ۱۸). مکانیزم سنتز NO حتی با سلول‌های Th_1 , Th_2 نیز مرتبط می‌باشد به طوریکه عقیده بر این است که این دو زیر گروه سلول T نیز با تنظیم تولید از طریق پروتئین کیناز بر یک دیگر تاثیر می‌گذارند (۱۷ و ۱۹). در ارتباط با این موضوع عقیده بر این است که NO با مهار سنتز γ -IFN توسط سلول Th_1 سنتز خودش را تنظیم می‌کند (۹). هدف از این تحقیق این است که آیا تحریک اولیه ماکروفاژها با گاما اینترفرون مانع پاسخ دهی سلول‌های فوق به لیپو پلی ساکارید و توقف ترشح نیتریک اکساید می‌گردد مانند آنچه که در مورد اینترلوکین - ۴ دیده شد.

مواد و روش

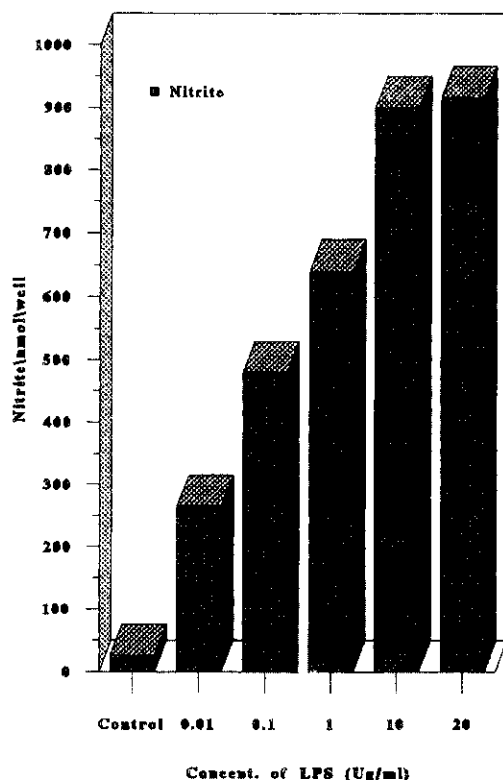
پس از کشتن موش‌های نر BALBC با ۸ هفته سن و سلول‌های صفاقی آنها به روش معمول تهیه گردید (۲۰). سلولها را شمرده و در هر حفره پلیت ۲۴ خانه تعداد 1×10^6 سلول در ۲ میلی لیتر RPMI 1640 بدون فنول رد اضافه شدند. پلیت‌ها بمدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. بعد از مدت مذکور سلول‌های غیر چسبیده را به کمک PBS گرم برداشته و سلول‌های چسبیده که عمدتاً ماکروفاژها بودند مجدداً به صورت زیر کشت داده شدند. گروه اول ماکروفاژها با غلظت‌های متفاوتی از LPS بین ۰/۱ تا ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تحریک شده و با گروه کنترل مقایسه

۲۰ میکروگرم در میلی لیتر اثر افزایشی در ترشح آن نداشته است. در گروه دوم اثر اضافه نمودن γ -IFN یک ساعت قبل از تحریک با LPS مورد آزمایش قرار گرفت (شکل ۲). همان طور که در شکل ۲ دیده می شود در مقایسه با گروه ۱ در تمام حالات γ -IFN اثر افزایشی در ترشح نیتریک اکساید نداشته است. مثلاً در حضور مقدار ۰/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر LPS و ۱۰۰ واحد بین المللی γ -IFN مقدار نیتریک اکساید مترشحه به ۲۶۰ نانومولار در حفره رسیده است. در حضور مقدار ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر LPS و ۱۰۰ واحد بین المللی γ -IFN مقدار نیتریک اکساید مترشحه به ۸۸۰ نانومولار در حفره رسیده است.

گردیدند. در گروه دوم در زمان صفر مقدار ۱۰۰ واحد بین المللی γ -IFN و پس از یک ساعت مقادیر متفاوتی LPS اضافه گردید. سلولها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. پس از مدت فوق مایع رویی را برداشته و سپس سانتریفوژ گردیدند تا سلولهای احتمالی موجود در آن حذف شدند. نیتریت (NO_2) به عنوان اندیکاتوری از NO و به روش گریس اندازه گیری شد (۲۱).

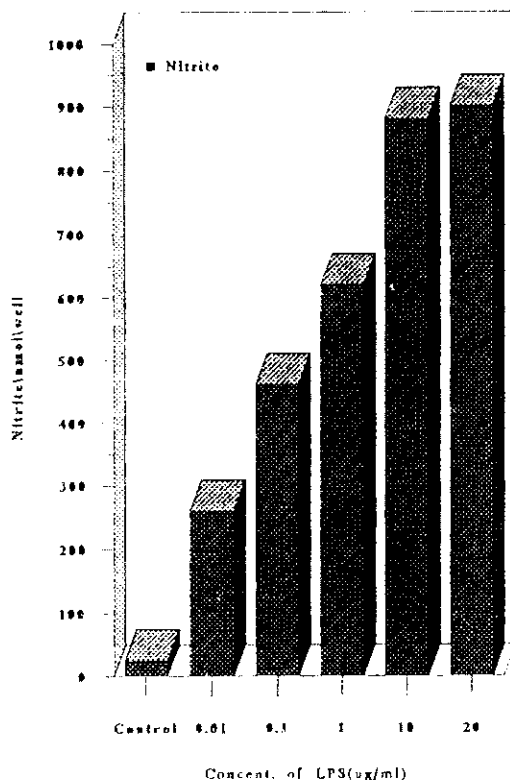
نتایج

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است هر چند LPS به طور اختصاصی در حالت وابسته به دوز باعث افزایش مقدار نیتریت گردید با این وجود در غلظت کمتر از ۰/۰۱ و بیشتر از



شکل ۱. مقدار ترشح NO توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظتهای مختلف LPS

اثر تحریک اولیه ماکروفاژها با گاما اینترفرون در پاسخ به لیپو پلی ساکارید و ترشح نیتریک اکساید



شکل ۲. مقدار ترشح NO توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظتهای مختلف LPS وقتی سلولها یک ساعت

قبل از آن در معرض ۱۰۰ واحد بین المللی IFN- γ قرار گرفته بودند

بحث

شکل ۲ این اثر افزایشی با حالتی که ماکروفاژها یک ساعت قبل از تحریک با LPS در معرض IFN- γ قرار گرفتند مقایسه گردید. این مطالعه به دنبال تجربیات آقای لیو (Liew) و همکارانش (۸) انجام گرفت که گزارش نمودند چنانچه ماکروفاژها قبل از تحریک با LPS و IFN- γ در معرض اینترلوکین - ۴ قرار گیرند قدرت پاسخ دهی خود به LPS و IFN- γ را از دست داده و مقدار کمتری NO تولید و ترشح می کنند. این مطالعه از آن جهت که آنجا اثر اینترلوکین - ۴ و اینجا اثر IFN- γ سنجیده شده است با مطالعه آقای لیو متفاوت است. ولی به جهت اینکه IL-4

بررسی های قبلی نشان می دهند که ماکروفاژها در حضور LPS یا IFN- γ و یا ترکیبی از هر دو، منبع اصلی تولید نیتریک اکساید می باشند (۲۲ و ۲۳). در این مطالعه از ماکروفاژهای صفاقی موش Balbc به عنوان مدل تولید کننده نیتریک اکساید استفاده شد. در این تجربه ماکروفاژهای ساکنی که هیچگونه تحریکی بر آنها صورت نگرفته مقدار اندکی NO ترشح نمودند که مقدار NO₂ به عنوان اندیکاتوری از آن اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۱ دیده می شود وقتی که ماکروفاژها در معرض LPS قرار گرفتند مقدار بیشتری NO ترشح نمودند. در

درمانی (شیمی درمانی یا ایمونوتراپی) در جهت تقویت سلول‌های Th_2 میزان باشد این عمل احتمالاً می‌تواند باعث مهار پاسخ ماکروفاژها و افزایش زمینه ابتلا به عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های داخل سلولی گردد. ولی چنانچه این درمان در جهت تقویت سلول‌های Th_1 باشد اگر چه ممکن است باعث افزایش مقاومت به عفونت نگردد ولی باعث افزایش استعداد ابتلا به عفونت نیز نمی‌گردد.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از معاونت پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) به جهت تصویب و حمایت مالی از طرح پژوهشی که منجر به مقاله حاضر گردید تشکر می‌شود. از همکار گرامی آقای دکتر احمد زواران حسینی عضو محترم هیات علمی گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس نیز به جهت هدیه بعضی از مواد آزمایشگاهی لازم تشکر می‌گردد.

سایتوکاین مترشحه توسط سلول‌های Th_2 و $IFN-\gamma$ سایتوکاین مترشحه توسط سلول‌های Th_1 می‌باشد قابل مقایسه است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که مقدار نیتريت از ۲۶۶ به ۲۶۰ نانومولار در یک مورد و از ۹۰۰ به ۸۸۰ نانومولار در مورد دیگر در حفره کاهش یافته که تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد. بدین معنی که چنانچه ماکروفاژهای صفاقی قبل از تحریک با LPS در معرض $IFN-\gamma$ قرار گیرند این $IFN-\gamma$ باعث مهار پاسخ ماکروفاژها به LPS و تولید ترشح No نمی‌شود ولی در عین حال اثر اضافی بر ترشح آن ندارد. بنابراین بر خلاف آنچه که در مورد IL-4 دیده شده، قرار گرفتن ابتدایی ماکروفاژها در معرض IL-4، مانع پاسخ دهی آن به LPS می‌گردد (۱) در اینجا تحریک اولیه با $IFN-\gamma$ باعث مهار تولید نیتريت اکساید در پاسخ ماکروفاژها به LPS نمی‌گردد. لذا به جهت اینکه IL-4 سایتوکاین مترشحه توسط سلول Th_2 و $IFN-\gamma$ سایتوکاین مترشحه توسط سلول Th_1 می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که چنانچه سیستم

N-Hydroxy-L- Arginine is an intermediate in the biosynthesis of Nitric Oxide from L-Arginine. J Biol Chem 1991, 266(10): 6259-63.

4- Tayeh MA, Marletta, MA Macrophage oxidation of L-arginine to Nitric oxide, nitrite and nitrate J Biol Chem ,1989, 264 (33): 19654-58.

5- McCall TB, Feelisch M, Palmer RMJ, and etal: Identification of N-iminoethyl-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. Br J Pharmacol,1991,102: 234-38.

References:

- 1- Stuehr DJ, Marletta MA: Mammalian nitrate biosynthesis - Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherchia coli lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci 1985, 82: 7738-42.
- 2- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide, Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. Pharmacol Rev, 1991, 43(2): 109-141.
- 3- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, etal:

- 6- Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, and etal: L-Citrolline production from L-Arginine by macrophage Nitric Oxide synthase. *J Biol Chem*, 1990, 265(23): 13442-45.
- 7- Liew FY: The role of nitric oxide in parasitic disease. *Ann Trop Med Parasitol*, parogy, 1993, 87(6): 637-42.
- 8- Liew FY, Li Y, Severn A, and etal: A possible novel pathway of regulation by murine Thelper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase. *Eur J Immunol*, 1991, 21: 2489-94.
- 9- Leal LMCC, Moss DW, Kuhn R, and etal: Interleukine-4 transgenic mice of resistance background are susceptible to *Leishmania major* infection. *Eur J of Immunol*, 1993, 23: 566-69.
- 10- Cunha FQ, Moncada S, Liew FY: Interlukine-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 182: 1155-59.
- 11- Ding AH, Nathan CF, Graycar J, and etal: Macrophage deactivation factor and transforming growth factor-brta 2 and beta 3 inhibit induction of macrophages nitric oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol*, 1990, 145: 940-44.
- 12- Cunha FQ, Weiser WY, David JR, and etal: Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages. *J Immunol*, 1993, 150: 1908-12.
- 13- Wu J, Cunha FQ, Liew FY, and etal: IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. *J Immunolo*, 1993, 151(8): 4325-32.
- 14- Severn A, wakelam MJQ, Liew FY: The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 188 (3): 997-1002.
- 15- Liew FY: regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune disease. *Immunol Lett*, 1994, 4395-95.
- 16- Dong Z, Qi X, Xie K, and etal: Protein Tyrosine Kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *J immunolo*, 1993, 151(5): 2717-24.
- 17- English BK, Orlicek SL, Mei Z, and etal: Bacterial LPS and IFN-gamma trigger the tyrosine phosphorilation of vav in macrophage: evidence for involmment at the hck tyrosine kinase. *J*

- leukoc Biol, 1997, 62(6): 859-64.
- 18-Shapira L, Sylvia VL, Halabi A, and etal. Bacterial Lipopolysaccharide induces early and late activation. Biochim Biophys Acta, 1997, 240 (3): 629-34.
- 19-Taylor- Robinson AW, Llew FY, Severn A, and etal: Regulation of immune response by nitric oxide differentially produced by T helper 1 and T helper 2 cells. Eur. J Immunol, 1994, 24: 980-84.
- 20-Ahmadi K, McCrudden AB: Sex differences in Nitric oxide Production by peritoneal macrophages. Iranian J med scien , 1998, 23 (1,2): 42-47.
- 21-Green LC, Wagner DA, Glogowski L, and etal: Analysis of nitrate, nitrite and [15N] Nitrate in Biological fluids. Anal Biochem, 1982, 126: 131-138.
- 22-Stuehr DJ, Marletta MA: Induction of nitrite/Nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection lymphokines or Interferone-gamma. J Immunolo , 1987 , 139: 518-25.
- 23-Stuehr DJ, Merlitta, MA: Synthesis of nitrite/Nitrate synthesis in murine macrophage cell lines. Cancer Ref, 1987 , 47: 5590-94.

THE EFFECT OF PRE-EXPOSURE OF MICE PERITONEAL MACROPHAGES TO INTERFERON GAMMA IN TERM OF NITRIC OXIDE PRODUCTION

K.Ahmadi. Ph.D ¹

Abstract

Introduction: *It has previously been reported that macrophages pre-exposed to interleukine-4 (a Th2 cytokine) no longer will respond to Lipopolysaccharide (LPS) in term of anti-Leishmanicidal activity and nitric oxide (NO) release. The aim of this study was to find out if pre-exposure of peritoneal macrophages to g-IFN (a Th1 cytokine) could abolished the effect of LPS on macrophage in term of No release.*

Method & Material: *Peritoneal cells were extracted in usual manner and plated out at 1×10^6 cells/well in 24 well plates with 2 ml RPMI-1640. After 2h incubation, non adherent cells were removed and macrophages were incubated for further 24h in the persence or absence of LPS or pre-exposed to g-IFN before adding LPS.*

Results: *The results showed that LPS enhanced NO release by peritoneal*

1. Assistant professor of Immunology, Baghyatallah University of Medical Scinces

macrophages in a dose dependent fashion.

Discussion: Pre-exposure of macrophages with g-IFN induced no further increase in NO production comparing with LPS- activated macrophages.

Key words: *Lipopolysaccharide- g-IFN - Nitric Oxide., Macrophage.*

Address: *Department of Immunology, Baghyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

Source: *UMJ 2001; 12(1) 56-64. ISSN: 1027-3727*