

## اثر اینترفرون گاما ( $\gamma$ -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 عملکردهای ایمنی دخیل در فرایند پاتولوژی ریه موش و مقاومت در برابر عفونت 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 مقدار ۲ میلی لیتر PBS سرد را بداخل ریه تزریق و با اسپیره 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 نیتريت ذخیره و سلولهای باقیمانده شمارش و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. مقدار ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰<sup>۴</sup> سلول ریوی در میلی لیتر به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل و پس از ۲ ساعت انکوباسیون سلولهای غیر چسبنده (غیر ماکروفاژ) حذف شد. مجدداً مقدار ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر LPS در حضور یا عدم حضور ۱۰۰ واحد  $\gamma$ -IFN در میلی لیتر به هر چاهک اضافه و بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. پس از انکوباسیون مقدار نیتريت موجود در مایع رویی هر چاهک کشت سلولهای ماکروفاژی بعنوان اندیکاتوری از نیتريك 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 نیتريك اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی می شود (۴۸٪±۲ 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 نیتريك اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی شد (۷۰٪±۵ در ماکروفاژهای صفاقی و ۵۶٪ در ماکروفاژهای ریوی و P<۰/۰۵). تحریک توام با LPS و  $\gamma$ -IFN باعث افزایش ۲۰٪ و ۲۴٪ ترشح نیتريك اکساید به ترتیب توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی شد (P<۰/۰۲).

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

**واژه های کلیدی:** سیکلوفسفامید، گاما اینترفرون، لیپوپلی ساکارید، نیتريك اکساید، ماکروفاژ ریوی، ماکروفاژ صفاقی

## مقدمه

سیکلو فسفامید که در سطح وسیعی بعنوان داروی ضد سرطان استفاده می شود. (۱) یکی از عوامل الکیله کننده است که نتایج تجربی و کلینیکی اثرات دوگانه آن را در پاسخ ایمنی نشان می دهد. (۲) سیکلو فسفامید باعث ایجاد اپوپتوزیس در سلولهای سرطانی و جنینی موش (۳-۶)، ریه و تیموس رت (۸،۷) می شود. هرچند دارو دارای خاصیت ضد سرطان خوبی است و باعث کاهش حجم تومور می شود ولی دوز اضافه آن معمولاً ضعیفی را در مکانیزم های دفاعی میزبان ایجاد می کند. این ضعف معمولاً منجر به مهار پاسخ های ایمنولوژی و اغلب باعث رشد عفونت های فرصت طلب و بعضی مواقع باعث بروز رشد دوباره سرطان می شود. (۹،۱۰) در حالی که دوز بالای سیکلو فسفامید دارای عوارض فوق می باشد، دوز مناسب آن (دوز پایین) باعث افزایش پاسخ ایمنی در حیوان و هم در انسان می شود. (۱۱-۱۵) درمان با سیکلو فسفامید در دوز پایین باعث برگشت قدرت تکثیر لنفوسیت های طحال حیوان دارای تومور شده در حالی که در طی دوران تومور قبل از درمان این قدرت تکثیر کاهش می یابد. (۱۶،۱۷) مطالعات نشان داده است که درمان با دوز پایین سیکلو فسفامید همچنین باعث کاهش ترشح سایتوکاین هایی مثل  $\text{IL-10}$ ,  $\text{TGF-}\beta$  توسط سلولهای  $\text{Th}_2$  و در نتیجه افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط سلولهای طحالی می شود، در حالی که ترشح مواد فوق در دوران وجود تومور قبل از درمان کاهش مقدار را نشان می دهد. (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) (۱۹،۲۰) نقش مهمی را در دفاع میزبان بعهده دارد. به منظور سنتز و ترشح نیتریک اکساید، آرژنین بعنوان سوسترا برای آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز مورد نیاز است. فعالیت این آنزیم در ماکروفاژها و سلولهای ایمنی وابسته به تحریک با ماده محرکی مثل  $\text{LPS}$  و  $\text{IFN-}\gamma$  (۲۱)

می باشد. از طرفی علاوه بر نقشی که نیتریک اکساید در دفاع میزبان دارد، افزایش ترشح آن ممکن است منجر به گشادی عروق، ادم و سایتوتوکسیسیته شده و احتمالاً مسئول فرایند اعمال سایتوکاین ها در ریه می باشد. (۲۲) شواهد موجود نشان می دهند که آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز در سلولهای اپی تلیال و ماکروفاژهای افراد سالم بروز نیافته ولی در افراد آسمی احتمالاً تحت تاثیر سایتوکاین ها بروز می یابد. (۲۳،۲۴) . در این رابطه  $\text{IL-4}$  اولین سایتوکاینی بود که نقش آن در مکانیسم تنظیم نیتریک اکساید شناخته شد. (۲۵)

$\text{Moncada}$  نیز گزارش نمود (۲۶) که نیتریک اکساید در بیماری های التهابی نقش داشته و افزایش مقدار نیتريت در مایع سینوویال و سرم بیماران روماتوئیدی تایید شده است. (۲۲) لذا به نظر می رسد که عمل نیتریک اکساید در این فرایند وابسته به نقش آن در مکانیسم های سایتوتوکسیک ماکروفاژهای فعال شده و اثرات ضد تکثیر سلولی آن می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر محرکهای  $\text{LPS}$ ,  $\gamma$  بر  $\text{IFN}$  ترشح نیتریک اکساید، بعنوان بخشی از مکانیزمهای دفاعی توسط ماکروفاژهای بدست آمده از حیوان دریافت کننده سیکلو فسفامید و مشاهده ضایعات احتمالی ریه ناشی از اثر سیکلو فسفامید بود.

## روش بررسی

### تزریق دارو به حیوان:

۲۴ سر موش سوری نر با ۸ هفته سن و وزن متوسط ۳۰ گرم از انستیتو تحقیقاتی سرم سازی 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 شش تایی تقسیم و هر گروه در یک قفس نگهداری شدند. سیکلو فسفامید 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

اندازه گیری نیتریک اکساید. نیتریک اکساید ماده‌ای است بسیار ناپایدار و سریعاً به نیتريت و نیترات تبدیل می‌شود. لذا مقدار نیتريت 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 -N-1 (0.1% Sulphanilamid, 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 نانومتر مقابل بلانک قرائت و با استفاده از غلظتهای مختلف نیتريت سدیم بعنوان منحنی استاندارد مقدار نیتريت 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 فرمالین ۱۰٪ بمدت یک هفته قرار گرفتند. پس از مراحل آماده سازی بافت، توسط دستگاه Processing و قالب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری Leit2، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون برش زده شد. برای مطالعات بافت شناسی، مقاطع با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، تولوئیدین بلو، و انگیس رنگ آمیزی 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 ایترفرون به تنهایی کاهشی برابر ۴۸٪ و ۴۴٪ را از خود در ترشح نیتریک اکساید نشان دهند (جدول ۱ و ۲) ( $p < 0.02$ ). در حالی که تغییر در مقدار نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی بدست آمده از گروهی که دوز ۱/۵ میلی گرم سیکلو فسفامید دریافت کرده بودند

۳ و ۴/۵ میلی گرم سیکلو فسفامید در حجم ۰/۱ میلی لیتر 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  $\gamma$ -IFN.** وزن موشها هر هفته 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 رهائش 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 نیتريت ذخیره شد. تعداد  $1 \times 10^4$  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 پنی سیلین در میلی لیتر} 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 هر چاهک پلیت باهستگی 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 ایتر فرون ( $\gamma$ -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)

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

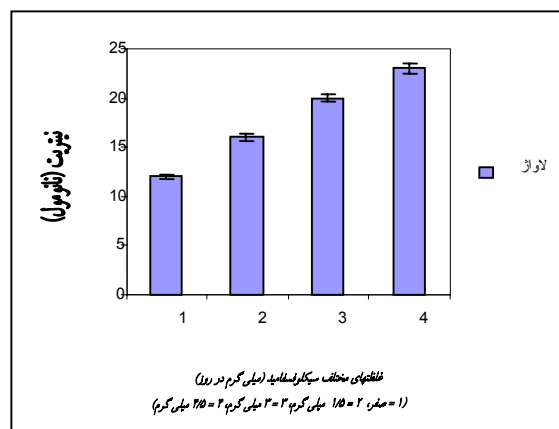
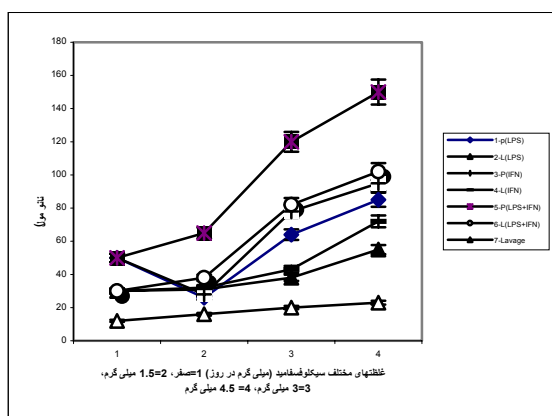
سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز)		نیتريت (نانو مول) - ماکروفاژهای ریوی		نیتريت (نانو مول) - ماکروفاژهای صفائی	
		γ-IFN	LPS	γ-IFN	LPS
کنترل		۳۰	۳۰	۵۰	۵۰
۱/۵		۳۱	۲۶	۲۸	۲۸
۳		۳۸	۶۴	۷۸	۷۸
۴/۵		۵۵	۸۵	۹۵	۹۵

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

مقدار سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز)		نیتريت (نانو مول) - ماکروفاژهای ریوی		نیتريت (نانو مول) - ماکروفاژهای صفائی	
		۳۰	۳۸	۵۰	۶۵
کنترل		۳۰	۳۸	۵۰	۶۵
۱/۵		۳۸	۸۲	۱۲۰	۱۲۰
۳		۸۲	۱۰۲	۱۵۰	۱۵۰
۴/۵		۱۰۲			

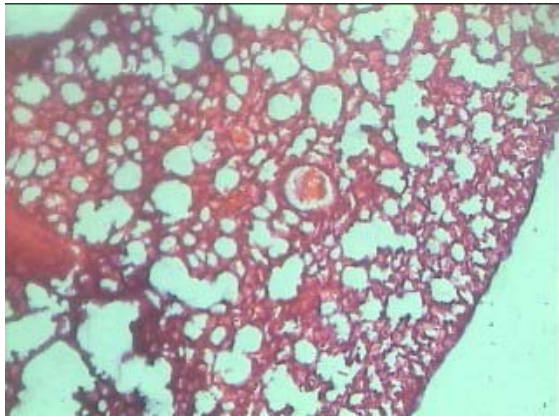
جدول ۳. مقایسه درصد تغییرات (کاهش / افزایش / افزایش) ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفائی و ریوی بدست آمده از موشهای دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به محرکهای LPS/LPS و γ-IFN در مقایسه با گروه شم (عدم دریافت سیکلوفسفامید)

مقدار سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز)	درصد کاهش/افزایش	درصد کاهش/افزایش	درصد کاهش/افزایش	درصد کاهش/افزایش	درصد کاهش/افزایش	درصد کاهش/افزایش	درصد کاهش/افزایش
	ماکروفاژ صفائی (LPS)	ماکروفاژ ریوی (LPS)	ماکروفاژ صفائی (LPS+IFN)	ماکروفاژ ریوی (LPS+IFN)	ماکروفاژ صفائی (IFN)	ماکروفاژ ریوی (IFN)	نیتريت در مایع لاواژ
کنترل	-	-	-	-	-	-	-
۱/۵	کاهش ۴۸٪	کاهش ۱۳٪	افزایش ۳۰٪	افزایش ۶۶٪	کاهش ۴۴٪	افزایش ۶۶٪	افزایش ۳۳٪
۳	افزایش ۲۸٪	افزایش ۲۶٪	افزایش ۴۰٪	افزایش ۷۳٪	افزایش ۵۶٪	افزایش ۴۳٪	افزایش ۶۶٪
۴	افزایش ۷۰٪	افزایش ۸۳٪	افزایش ۲۰۰٪	افزایش ۲۴۰٪	افزایش ۹۰٪	افزایش ۱۴۰٪	افزایش ۷۵٪

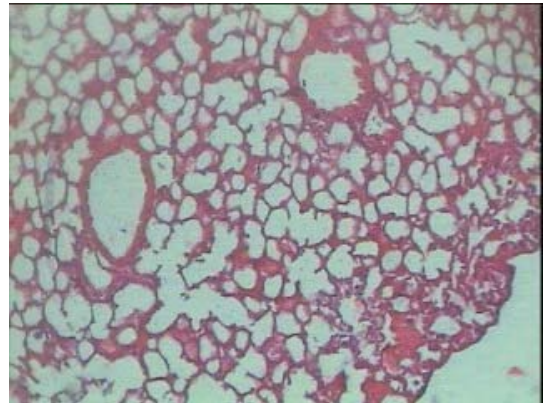


نمودار ۲. مقایسه نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفائی - ریوی بدست آمده از موش دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به غلظتهای مختلف سیکلوفسفامید (میلی گرم در روز) و مقدار آن در مایع لاواژ

نمودار ۱. مقدار نیتریک اکساید در مایع لاواژ موشهای دریافت کننده غلظتهای مختلف سیکلوفسفامید



شکل ۴. پاتولوژی ریه موش گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید ۴،۵ میلی گرم در روز



شکل ۱. پاتولوژی ریه موش گروه کنترل

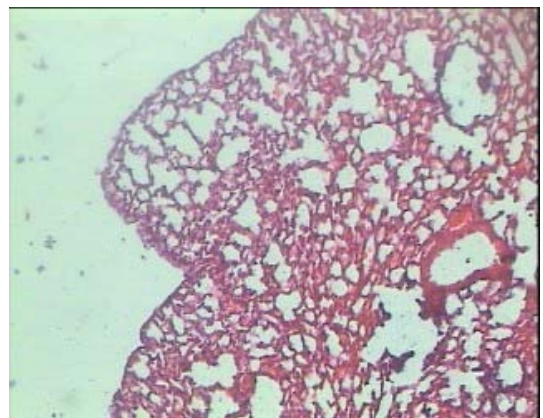
در پاسخ به هرکدام از محرکهای LPS و گاما اینترفرون به تنهایی معنی دار نبود (جدول ۱). ماکروفاژهای صفائی و ریوی بدست آمده از گروه دریافت کننده ۱/۵ میلی گرم سیکلوفسفامید (روزانه) در پاسخ به ترکیب توام LPS و گاما اینترفرون به ترتیب افزایش ۳۰٪ و ۲۶/۶۶٪ (۵) را در ترشح نیتریک اکساید داشتند (جدول ۲ و ۳) ( $P < 0.02$ ). 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 معنی داری 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 فیروز یا برونشولیت را در هیچکدام از گروهها نشان نداد (شکلهای ۳-۶)

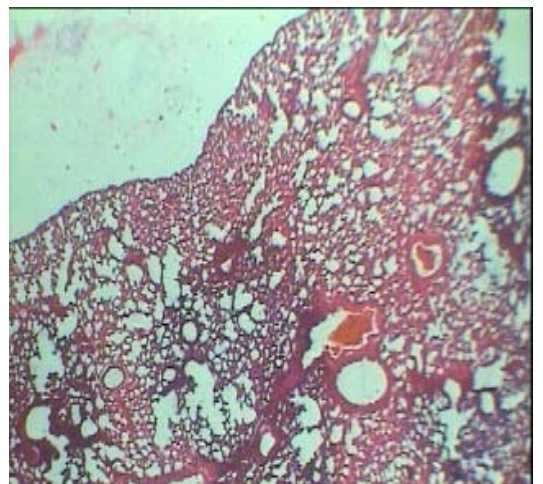
#### بحث

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 ترشح می‌کنند.

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



شکل ۲. پاتولوژی ریه موش گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید ۱،۵ میلی گرم در روز



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



IFN صرف نظر از دوز سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل مقدار بیشتری نیتریک اکساید ترشح نموده اند (جدول ۲). 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 (شکل ۱). بطوریکه حداقل افزایش در گروه ۱/۵ میلی گرم سیکلوفسفامید و برابر با ۳۳/۳۳٪ بوده (جدول ۳). حداکثر افزایش در پاسخ به ۴/۵ میلی‌گرم و برابر با ۹۹/۹۹٪ بوده است. نتیجه آنکه به نظر می‌رسد، سیکلوفسفامید باعث تحریک اولیه ماکروفاژها در پاسخ به LPS و  $\gamma$ -IFN در ترشح نیتریک اکساید شده و  $\gamma$ -IFN یک اثر سینرژیک با LPS داشته است (شکل ۱). علت دیگر تفاوت مقدار نیتریک اکساید در مایع لاواژ گروههای دریافت کننده دوزهای مختلف اثر سیکلوفسفامید با ترشح 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 (شکل‌های ۶-۳). با توجه به عدم وجود ضایعه پاتولوژیک در ریه، به نظر می‌رسد که دوز انتخابی بدون عارضه جانبی بوده و سلولهای ریوی سالم می‌باشند. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج سایر همکاران از یک هماهنگی متناسبی بر خوردار می‌باشند. در این رابطه Matar (۳۵) نشان داده که میزبان دارای تومور مقدار زیادی  $\text{TGF-}\beta$ ، IL-10 و نیتریک اکساید ترشح می‌کنند. او بیان می‌دارد که احتمالاً واسطه‌های ایجادی فوق می‌توانند مسئول بخشی از مهار پاسخ ایمنی در سرطان باشند. چرا که اینترلوکین-۱۰ و  $\text{TGF-}\beta$  هر دو توسط سلولهای  $\text{Th}_2$  ترشح شده و بر اعمال  $\text{Th}_1$  اثر مهاری دارند. مطالعات قبلی ما در *In vitro* نشان داده که  $\text{TGF-}\beta$  باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی می‌شوند. (۳۷) Hotle و همکاران نیز نشان داده‌اند که نقش آنتی‌توموری سیکلوفسفامید احتمالاً از طریق افزایش توان عمل سلولهای دندریتیک اعمال می‌شود.

گزارش نموده‌اند تفاوت دارد (۳۰-۳۴). گزارشات قبلی محققین نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید در دوز پایین باعث برگشت قدرت تکثیر لنفوسیتها ی طحالی می‌شود. (۱۶، ۱۷) 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 تفاوتی در تحقیق حاضر با یافته‌های دیگران وجود دارد (۳۵) چرا که آنها از سلولهای طحالی و ما در اینجا از سلولهای صفافی 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،  $\text{TGF-}\beta$  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 سیکلوفسفامید در دوز پایین (۱/۵ میلی گرم)، LPS باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید (۴۸٪) توسط ماکروفاژهای صفافی شده ( $P < 0.02$ )، در صورتیکه تاثیری بر ماکروفاژهای ریوی نداشته است. در دوزهای بالاتر ماکروفاژهای صفافی 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 و  $\gamma$ -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 و  $\gamma$ -IFN مقدار بیشتری نیتریک اکساید ترشح کنند. (۳۶) ولی نتایج حاصل از ترکیب توام LPS و  $\gamma$ -IFN متفاوت از دو حالت قبل بود (جدول ۲). بدین صورت که ماکروفاژهای صفافی و ریوی بدست آمده از موش دریافت کننده سیکلوفسفامید در پاسخ به LPS و  $\gamma$ -

## 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 phosphamide 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 cyclophosphamide and papain: I. An Ultrastructural study. *J. Submicroscopic Cytology and pathology* 1998; 30: 105-16.
8. Wang GJ, Cai L. Relatively Low-dose cyclophosphamide is likely to induce apoptosis cell

Lutsiak (۳۸) و همکاران نیز اخیراً ثابت کرده‌اند که سیکلوفسفامید در دوز پایین با مهار عمل سلولهای  $TCD4^+, CD25^+$  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 سیکلوفسفامید، لاکتو فرین با افزایش ترشح IL-6 توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی باعث برگشت نقص ایمنی ناشی از سیکلوفسفامید 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 تنهایی در *In vivo* باعث افزایش فعالیت سولهای  $Th_2$  شده و بدین وسیله مسئول بخشی از مهار ایمنی ایجاد می‌باشد. هر چند سیکلوفسفامید در *In vivo* با افزایش ترشح نیتریک اکساید همگام با افزایش ترشح  $TGF-\beta$ , IL-10 باعث کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود ولی در حالتی که توام با LPS و  $\gamma$ -IFN استفاده شود دلیل افزایش مقدار نیتریک اکساید و عدم تغییر در  $TGF-\beta$  و اینترلوکین-۱۰ از قدرت ایمونوساپرسیو آن کاسته شده و می‌تواند اثرات بهبودی بهتری در درمان سرطان داشته باشد.

**تقدیر و تشکر:** با تشکر از 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 تشکر از خانم فاطمه عرب سلمانی تکنسین آزمایشگاه تحقیقات ایمونولوژی.

death in rat thymus through Fas/Fas ligand pathway.

**9.** Diasio RB, Lo Buglio AF, Immunomodulators: 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 immunopotential by low dose cyclophosphamide. *European 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.** Mokyry 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 pathogenesis 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, McCrudden 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.



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. *Pharmacol. 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. *Annals of the rheumatic disease* 1992; 51: 1219-22.
28. Venkatesan N, Punithavathi D, Chandrakasan G. Glycoprotein composition in cyclophosphamide-induced 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  $\{^{15}\text{N}\}$ 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, Panoskaltis-Mortari A, Ingbar DH, Yang S. High levels of peroxynitrite 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 la 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 macrophages treated with TGF- $\beta$ . *Yachtch*

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.** Puzstai 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.

