

بررسی تأثیر ضد التهابی رزبنگال در ماکروفاژهای فعال شده با لیپوپلیساکارید در غیاب نور

دکتر سید هادی موسوی^۱- شهرزاد زمانی تقیزاده رابع^۲- زهرا سیادت^۳- دکتر محمود محمدی^۴

چکیده

زمینه و هدف: رزبنگال یک رنگ گزانتبینی آنیونی محلول در آب است که سابقه طولانی استفاده بی خطر از آن، نشان‌دهنده اثرات جانبی سیار کم آن می‌باشد. با این حال تاکنون تأثیر ضد التهابی آن بررسی نشده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر رزبنگال بر پاسخ التهابی با واسطه تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القای (iNOS) در مدل ماکروفاژهای فعال شده با لیپوپلیساکارید (LPS) در تاریکی انجام شد.

روشن تحقیق: در این مطالعه تجربی، ماکروفاژهای رده J774A.1 از استیتو پاستور خردباری و با غلظت‌های متفاوت رزبنگال با یا بدون LPS در تاریکی تیمار شدند. تأثیر غلظت‌های مختلف رزبنگال بر درصد زنده‌بودن ماکروفاژها با استفاده از آزمون ام.تی.تی (MTT) بررسی شد. به منظور تعیین میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول) از روش رنگ‌ستجی گریس و برای ارزیابی میزان بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القای، از روش لکه‌گذاری و سترن استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: طبق نتایج حاصل از آزمون MTT، درصد زنده‌بودن ماکروفاژهای تیمارشده با غلظت‌های مختلف رزبنگال ($1, 10, 50, 100, 200$ و 300 میکرومول) به ترتیب 99 ± 0.66 ، 97 ± 1.20 ، 88 ± 0.57 ، 81 ± 0.88 ، 80 ± 0.57 و 81 ± 0.88 درصد بود. میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول) توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال ($1, 10, 50, 100, 200$ و 300 میکرومول) به ترتیب $17/1 \pm 0.17$ ، $14/3 \pm 0.17$ ، $13/0 \pm 0.09$ ، $8/9 \pm 0.32$ ، $6/16 \pm 0.09$ و صفر، و در گروه شاهد $21/4 \pm 0.21$ میکرومول بود. غلظت‌های مختلف رزبنگال سبب کاهش بیان آنزیم iNOS شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رزبنگال به طور وابسته به دوز، تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم iNOS را در ماکروفاژهای التهابی کاهش می‌دهد؛ بدون این که بر درصد زنده بودن سولول‌ها (در غلظت‌های کمتر از 200 میکرومول) تأثیر قابل توجهی داشته باشد؛ همچنین فرایند تأثیر ضد التهابی رزبنگال از طریق مهار بیان آنزیم iNOS نشان داده شد. این مطالعه رزبنگال را به عنوان یک ماده ضد التهابی بی خطر و جدید جهت بررسی در شرایط درون تنی معرفی می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: رزبنگال؛ ماکروفاژهای رده J774A.1؛ التهاب؛ اکسید نیتریک؛ آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القای

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیر جند. ۱۳۸۸: ۱۰-۱۷.

دريافت: ۱۱/۱۱/۱۳۸۶ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۶/۴ پذيرش: ۱۳۸۷/۸/۲۸

^۱ استادیار گروه آموزشی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۲ کارشناس ارشد ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۳ کارشناس ارشد تغذیه گروه آموزشی بیوشمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۴ نویسنده مسؤول؛ استاد ایمونولوژی و آرژی، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آدرس: مشهد- بلوار فردوسی- میدان بوعلی- پژوهشکده بوعلی

تلفن: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۵۹۶-۰۵۱۱-۷۱۱۲۶۱۱. پست الکترونیکی: mahmoudim@mums.ac.ir

مقدمه

مختلف به عنوان منبعی برای کشف داروهای جدید، لزوم شناسایی خواص ترکیبات مختلف را آشکار می‌کند. با توجه به نقش مهم آنزیم iNOS در ایجاد بیماری‌های مختلف التهابی، سرکوب بیش از حد بیان آن امری ضروری به نظر می‌رسد، ولی مهار آن توسط داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی عوارض جانبی مختلفی دارد؛ بنابراین تلاش برای یافتن ترکیبات ضد التهابی مؤثر با حداقل عوارض جانبی ادامه دارد.

رزبنگال (RB)^{***} با ترکیب شیمیایی ۴ و ۵ و ۶ و ۷-تتراکلرو-۳ و ۴ و ۵ و ۷-تتراایدوفنائورسین دیسدیم^{†††}، یک رنگ گزانتینی آنیونی محلول در آب است که با تشعشع نور سبز و از طریق فرایند فتوکاتالیتیک^{‡‡‡} (تسهیل در تغییر مولکول‌ها در مجاورت نور)، اکسیژن مولکولی را به اکسیژن منفرد تبدیل می‌کند (۱۳، ۱۲)؛ سابقه طولانی استفاده بی‌خطر از آن به عنوان یک سیستم تشخیصی عملکرد کبد (۱۵، ۱۴) و نیز تشخیص بینایی توپیکال^{§§§} (۱۷، ۱۶) نشان می‌دهد که رزبنگال اثرات جانبی بسیار کمی دارد (۱۸).

در یک مطالعه، تأثیر رزبنگال بر القای آپوپتوز و تغییرات میتوکندری در رده سلول‌های سرطان رحم (Hela) نشان داده شد (۱۹)؛ همچنین رزبنگال تکثیر رده سلول‌های ملانوما را با واسطه القای آپوپتوز در شرایط برون‌تنی^{****} مهار می‌کند (۲۰). در یک بررسی تأثیر تزریق زیرجلدی رزبنگال در بهبود بیماران مبتلا به ملانوما نشان داده شده است. در این بررسی، استفاده از رزبنگال سبب بهبود ضایعات ملانوما در بیماران مبتلا به ملانوما شد (۲۱). از آنجا که تزریق رزبنگال در محل یک ضایعه ملانومایی، سبب بهبود ضایعات مجاور نیز می‌شود، این طور فرض می‌شود که رزبنگال تأثیر تنظیم‌کننده بر سیستم ایمنی نیز داشته باشد؛ بنابراین در این مطالعه تأثیر رزبنگال بر روی ماکروفازهای التهابی در شرایط برون‌تنی

اکسید نیتریک^{*} (NO) یک عامل فعال طبیعی مهم است و توسط آنزیم نیتریک اکسایدستاز[†] (EC NO 1.14.13.39) از سلول‌های مختلف از جمله ماکروفازها در بدن تولید شده و وقایع فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک مختلفی را میانجی می‌کند (۱).

سنتر اکسید نیتریک به وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) صورت می‌گیرد. ایزوفرم القایی آن (iNOS)، در حالت طبیعی در ماکروفازها بیان نمی‌شود و تولید آن نیازمند تحریک یک عامل القاکننده است. لیپوپلی‌ساقاراید باکتریایی[‡] (LPS) از مهمترین القاکننده‌گان iNOS می‌باشد (۱-۴).

اکسید نیتریک یک مولکول مؤثر در فعالیت کشنده‌گی[§] ماکروفازها محسوب می‌شود و در دفاع میزبان و حذف عوامل بیماری‌زا، ویروس‌ها و سلول‌های توموری نقش دارد (۷-۵).

ماکروفازها با تولید زیاد اکسید نیتریک و مشتقاتش، یعنی دی‌اکسید نیتروژن^{**} و پراکسی‌نیتریت^{††} توسط آنزیم iNOS نقش بسیار مهمی در ایجاد التهاب ایفا می‌کنند (۹، ۸).

تولید زیاد اکسید نیتریک در فرایند سرطان‌زا^{‡‡} نیز نقش داشته (۱۰) و به بیماری‌زا^{§§} بیماری‌های التهابی، از جمله شوک عفونی و سکته قلبی کمک می‌کند (۱۱)؛ در واقع، از طرفی تولید اکسید نیتریک توسط آنزیم iNOS در ماکروفازها، سبب مهار رشد سلول‌های توموری و حذف پاتوژن‌های مختلف می‌شود و از طرف دیگر تولید بیش از حد و نایه‌جای آن توسط ماکروفازها و سایر سلول‌ها، پیامدها و عوارض نامطلوبی از جمله التهاب شدید و شوک عفونی به دنبال دارد.

گرایش روزافزون علم داروسازی به ترکیبات خالص

^{*} Nitric Oxide

[†] Nitric Oxide Synthase

[‡] Bacterial Lipopolysaccharide

[§] Cytotoxicity

^{**} Nitrogen dioxide

^{††} Peroxynitrite

^{‡‡} Carcinogenesis

^{§§} Pathogenesis

^{***} Rose Bengal

^{†††} 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium ($C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$)

^{‡‡‡} Photocatalytic

^{§§§} Topical Ophthalmic Diagnosis

^{****} In-vitro

در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و از آنها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف رزبنگال، تیمار شد. بعد از ۲۴ ساعت، ۲۵ میکرولیتر از محلول ام.تی.تی (۵ میلیگرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در تاریکی تیمار شد؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوكساید به هر چاهک اضافه گردید. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه خواننده الیزا*** در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد و درصد زنده‌بودن سلول‌های گروه‌های مورد، با استفاده از فرمول $100 \times (OD_{شاهد} - OD_{مورد}) / OD_{مورد}$ محاسبه گردید.

به منظور بررسی تأثیر رزبنگال بر تولید اکسید نیتروزیک و بیان آنزیم نیتروزیک اکساید سنتاز القایی، ماکروفازها در تاریکی به صورت گروه‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

گروه شاهد:

- ماکروفازهای تیمار نشده که تنها در مجاورت محیط کشت قرار داده شدند.

گروه‌های مورد:

- ماکروفازهایی که با محیط حاوی لیپوپلیساکارید یا Escherichia coli serotype B4: 0111 LPS (شرکت سیگما)، با غلظت $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ تیمار شدند.

- ماکروفازهایی که ابتدا به مدت یک ساعت با غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) و سپس با LPS با غلظت $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ تیمار شدند. از روش رنگ‌سنگی گریس^{†††} برای سنجش میزان تولید اکسید نیتروزیک استفاده شد (۲۳). در این روش، میزان تجمع NO_2 به عنوان شاخص میزان تولید NO در مایع رویی سلول‌های کشت داده شده توسط بافر گریس و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت‌سدیم تعیین شد.

ماکروفازهای J774A.1 کشت داده شده در گروه‌های مورد و شاهد به تعداد $10^5 \times 10^5$ عدد در هر چاهک پلیت ۲۴

بررسی شد. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر ضد التهابی رزبنگال در تاریکی و نه به عنوان یک ماده حساس‌ساز به نور^{*} انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه بنیادی، رده سلولی مونوسیت/ماکروفاز موشی ۱.1 (NCBI C483) از بانک سلولی مؤسسه پاستور ایران تهیه شد. از سلول‌ها در فلاسک حاوی محیط کشت[†] DMEM[‡] غنی‌شده با سرم جنینی گاوی[‡] (FCS) $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ، 100U/mL استرپتومایسین و 2mM ال-گلوتامین و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور حاوی CO_2 نگهداری شد. برای انجام آزمایش‌های مختلف، زمانی که حداقل ۷۰٪ ماکروفاز در فلاسک کشت به حالت Confluent رسیدند، از ته پلیت جدا و برای انجام آزمایش‌های مختلف استفاده شدند. تمامی غلظت‌ها در گروه‌های پنج‌تایی بررسی شدند و هر آزمون حداقل سه بار تکرار شد.

به منظور بررسی تأثیر رزبنگال بر درصد زنده‌بودن سلولی، از روش ام.تی.تی.[§] استفاده شد (۲۲). اساس این آزمون، شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریالی^{**} سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان^{††} ارغوانی‌رنگ می‌باشد که توسط دی‌متیل سولفوكساید^{‡‡} (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجادشده بیشتر است. این روش بر آزمون ام.تی.تی.^{§§} که با مواد رادیواکتیو کار می‌کند، مزیت دارد؛ بدین منظور 12×10^4 عدد سلول به صورت گروه‌های مختلف

* Photosensitizer

[†] Dulbecco's Modified Eagle's Medium

[‡] Fetal Calf Serum

[§] MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] Assay

^{**} Mitochondrial Succinate Dehydrogenase

^{††} Formazan Crystals

^{‡‡} Dimethyl Sulfoxide

^{§§} Lymphocyte Transformation Test

*** Elisa reader

††† Colorimetric Griess Assay

دودسیل سولفات (SDS) §§، ۲-مرکاپتو اتانول (2-ME) *** و بلوبرموفنل ††† بر روی ژل ۸٪ پلی آکریل آمیل ††† همراه سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شد.

لکه‌گذاری وسترن با انتقال پروتئین‌ها از ژل بر روی غشای پلی‌وینیلیدن فلوراید §§§ به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۰۰ میلی‌آمپر در دمای اتاق صورت گرفت. به منظور ردیابی پروتئین iNOS، غشا به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با محلول حاوی ۵٪ شیر خشک **** و بافر فسفات‌سالین بلوکه شد؛ سپس غشا با غلظت ۱/۲۰۰ از آنتی‌بادی علیه iNOS موشی به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تیمار شد. بعد از این زمان، غشا ۵ بار شستشو داده شده و به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه †††† با غلظت ۱/۱۰۰۰ در دمای اتاق تیمار شد؛ سپس بلاط‌ها شستشو داده شدند و با استفاده از معرف‌های ردیابی شیمی‌لومینیسن特 ††††† بر طبق دستور شرکت سازنده مجاور شده و باند ۱۳۰ کیلو دالتونی iNOS با استفاده از دستگاه ردیاب سیگنال‌های ظاهر ECL شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از آزمون کولموگروف-امیرنوف §§§§ مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع نرمال هستند؛ بنابراین برای بررسی داده‌ها از آزمون آماری پارامتری تی به منظور مقایسه داده‌ها بین گروه‌های مورد (ماکروفازهای تیمار شده با LPS و غلظت‌های مختلف رزبنگال) به صورت جداگانه با گروه شاهد (ماکروفازهای تیمار شده با LPS به تنها) استفاده گردید. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

خانه‌ای ریخته شدند.

پس از ۱۸ ساعت، مایع رویی ماکروفازها با محلول حاوی ان (فتیل) اتیلن آمید دی‌هیدروکلراید *، سولفانیل آمید † و اسید فسفوریک ‡ ۵٪ و آب م قطر در دمای اتاق تیمار شده، سپس ۵۴۵ جذب نمونه‌ها توسط دستگاه خواننده الیزا در طول موج نانومتر قرائت شد. غلظت نیتریت تولید شده توسط ماکروفازهای گروه شاهد و مورد بر اساس منحنی استاندارد نیتریت‌سدیم (بر حسب میکرومول) با استفاده از نرم‌افزار اکسل تعیین شد.

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف رزبنگال بر بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی از روش لکه‌گذاری وسترن § استفاده شد. ماکروفازهای ۱.J774A.1 کشت داده شده در گروههای مورد و شاهد به تعداد $1/5 \times 10^6$ عدد در هر چاهک ۶ خانه‌ای ریخته شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات سالین ** (PBS) سرد شستشو و در محلول لیزینگ زیر تجزیه شدند.

Tris-HCl (20mM, pH 7.5), NaF (10mM), NaCl (150mM), Nonidet P40 (1%), phenylmethylsulphonyl fluoride (1mM), Na3VO4 (1mM), protease inhibitor cocktail.

پس از یک ساعت، محلول لیزشده سلولی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و از محلول رویی به عنوان عصاره سیتوزوی استفاده شد. غلظت پروتئین عصاره سیتوزوی با استفاده از روش برادفورد †† و منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین شد. ۵۰ میکروگرم پروتئین لیزات (موجود در عصاره سیتوزوی گروههای مورد و شاهد) همراه باfer لاملی ‡‡ (حاوی سدیم

§§ Sodium Dodecyl Sulfate

*** 2-mercaptopethanol

††† Bromophenol Blue

†††† Polyacrylamide Gel

§§§ Polyvinylidene Fluoride

**** Skim Milk

††††† Anti-mouse IgG-HRP Conjugate

***** The Amersham Biosciences ECL (Enhanced Chemiluminescence) Western Blotting Detection System
§§§§ Kolmogorov-Smirnov Test

* N-(naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride

† Sulfanilamide

‡ Phosphoric Acid

§ Western Blotting Protocol

** Phosphate Buffered Saline

†† Bradford Protein Assay

‡‡ Laemmli Buffer

یافته‌ها

دادند که رزبنگال به طور وابسته به دوز، سبب کاهش بیان آنزیم iNOS شده است (شکل ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین میزان تولید NO توسط ماکروفاژهای J774A.1 تحریک شده با LPS بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال

نتیجه آزمون آماری*	غلظت نیتریت تولید شده (میکرومول)	رزبنگال (میکرومول)
-	۲۱/۴±۰/۲۱	.
P=۰/۰۹۴	۱۷/۱±۰/۱۷	۱
P<۰/۰۵	۱۴/۳±۰/۱۷	۱۰
P<۰/۰۵	۱۳/۱۶±۰/۰۹	۵۰
P<۰/۰۵	۸/۹±۰/۳۲	۱۰۰
P<۰/۰۵	۶/۱۶±۰/۰۹	۲۰۰
P<۰/۰۵	.	۳۰۰

* مقادیر P ذکر شده مربوط به مقایسه هر گروه با گروه شاهد می‌باشد.

جدول ۲- میانگین درصد زنده بودن ماکروفاژهای J774A.1 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال

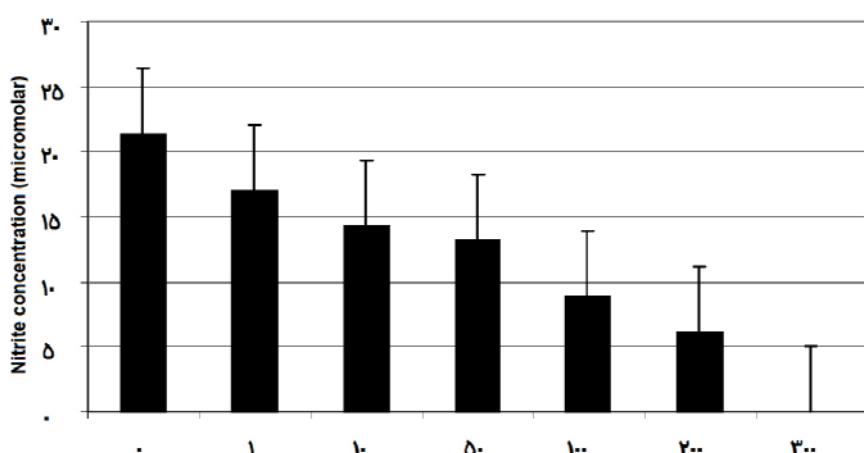
درصد زنده بودن سلول‌ها	رزبنگال (میکرومول)
۹۹±۰/۶۶	۱
۹۷±۱/۲۰	۱۰
۹۰±۰/۸۸	۵۰
۸۸±۰/۵۷	۱۰۰
۸۱±۰/۸۸	۲۰۰
۸۰±۰/۵۷	۳۰۰

تأثیر مهاری رزبنگال بر تولید اکسید نیتریک در نمودار ۱ و جدول ۱ نشان داده شده است. رزبنگال به طور وابسته به دوز، تولید اکسید نیتریک را به میزان قابل توجهی توسط ماکروفاژهای فعال شده با LPS مهار می‌کند.

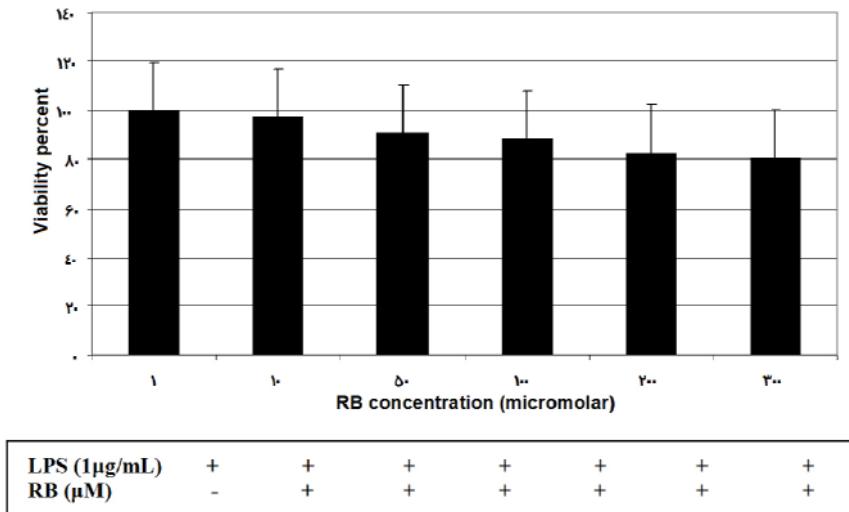
میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول انحراف معیار خط) توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب ۱۷/۱±۰/۱۷، ۱۳/۱۶±۰/۰۹، ۸/۹±۰/۳۲، ۶/۱۶±۰/۰۹ و صفر میکرومول و در گروه شاهد ۲۱/۴±۰/۲۱ میکرومول توسط ماکروفاژهای فعال شده با LPS بود.

نتایج حاصله نشان می‌دهند که رزبنگال می‌تواند تولید اکسید نیتریک را مهار نماید؛ همچنین، طبق نتایج حاصل از تست ام.تی.تی، درصد زنده بودن توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب ۸۱±۰/۸۸، ۹۰±۰/۸۸، ۹۷±۱/۲۰، ۹۹±۰/۶۶، ۸۰±۰/۵۷ درصد بود.

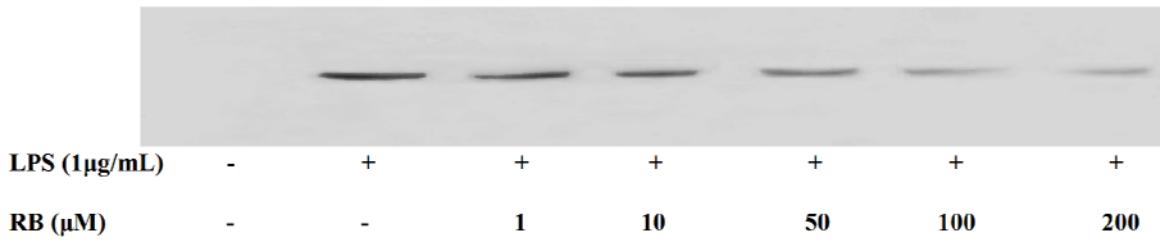
این نتایج نشان دادند که غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میکرومول رزبنگال تأثیر سایتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌های تیمار شده نداشتند (نمودار ۲ و جدول ۲). ظهور باندهای iNOS حاصل از لکه‌گذاری وسترن نشان



نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان تولید NO توسط ماکروفاژهای J774A.1 تحریک شده با LPS بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد زنده بودن ماکروفازهای J774A.1 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال



شکل ۱- تنظیم بیان iNOS توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال در ماکروفازهای J774A.1 تحریک شده با LPS

به منظور ایجاد یک مدل التهابی، ماکروفازها در شرایط برونتی با لیپوپلی‌ساکارید ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) تیمار شدند که محرك قوی تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی می‌باشد؛ سپس غلظت‌های مختلف رزبنگال به ماکروفازهای التهابی اضافه شد و تولید اکسید نیتریک (توسط روش گریس) و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی (توسط روش لکه‌گذاری وسترن) ارزیابی گردید. غلظت‌های مورد استفاده رزبنگال (جز غلظت ۱ میلی‌مولار) در سطح معنی‌داری تولید اکسید نیتریک را توسط ماکروفازهای فعل شده با LPS مهار کردند و این مهار وابسته به دوز بود؛ همچنین، میزان بیان پروتئین آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی که به منظور تایید تأثیر مهاری رزبنگال بر تولید NO و نیز بررسی چگونگی این تأثیر ارزیابی شد، این مهار وابسته به دوز را تایید کرد؛ بنابراین غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میلی‌مولار رزبنگال می‌تواند اثر خوب بدون سمیت قابل

بحث
مقادیر اندک اکسید نیتریک تنظیم‌کننده مهم هموستاز فیزیکی می‌باشد؛ در حالی که مقادیر زیاد آن با بیماری‌ها و شرایط التهابی مختلف ارتباط نزدیکی دارد. بعد از مواجهه با القاکننده‌های مختلف از جمله لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های ماکروفازها القا شده و توانایی کشنندگی سلولی، آسیب بافتی، عفونت التهابی و شوک را بر می‌انگیزد (۲۵، ۲۶)؛ بنابراین سنجش میزان تولید اکسید نیتریک می‌تواند روشی جهت ارزیابی اثرات ضد التهابی ترکیبات دارویی مختلف باشد.

در این مطالعه تأثیر رزبنگال بر تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم iNOS در ماکروفازهای رده ۱ J774A.1 بررسی شد. طبق نتایج حاصل از تست ام.تی.تی، تیمار با غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میکرومول رزبنگال تأثیر سایتوکسیک قابل توجهی بر ماکروفازها نداشت.

ستاز را در ماکروفازهای التهابی کاهش می‌دهد؛ بدون این توجهی بر ماکروفازها داشته باشد. این معیارها نشان می‌دهند که رزبنگال می‌تواند به عنوان یک ماده ضد التهابی جدید و کمتر از ۲۰۰ میکرومول) داشته باشد. همچنین چگونگی تأثیر ضد التهابی رزبنگال از طریق مهار بیان آنزیم نیتریک اکساید

ستاز القای (iNOS) نشان داده شد. این نتایج نشان می‌دهد

که رزبنگال می‌تواند یک عامل ضد التهابی جدید برای بررسی در شرایط درون تنی باشد.

بی خطر در بررسی در شرایط درون تنی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که رزبنگال به طور وابسته به دوز، تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم نیتریک اکساید

منابع:

- 1- Nathan CF, Gabay J. Antimicrobicidal mechanisms of macrophages. Mononuclear phagocytes. 1992; 12: 256-267.
- 2- Marletta M. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem. 1993; 268 (17): 12231-12234.
- 3- Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. Cancer Metastasis Rev. 1998; 17 (1): 39-53.
- 4- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. Phytother Res. 2003; 17 (5): 485-489.
- 5- Oshima H, Bartsch H. Chronic infectious and inflammation process as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res. 1994; 305 (2): 253-264.
- 6- Kilbourn RG, Belloni P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. J Natl Cancer Inst. 1990; 82 (9): 772-776.
- 7- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991; 43 (2): 109-142.
- 8- Macmicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, et al. Altered responses to bacterial-infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric-oxide synthase. Cell. 1995; 81 (4): 641-650.
- 9- Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. J Cell Biol. 1999; 144 (3): 427-434.
- 10- Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as potential therapeutic target. Annu Rev Pharmacol. 1999; 39: 191-220.
- 11- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nature Immunol. 2001; 2 (10): 907-916.
- 12- Ito T, Kobayashi K. A survey of in vivo photodynamic activity of xanthenes, thiazines, and acridines in yeast cells. Photochem Photobiol. 1997; 26 (6): 581-587.
- 13- Theodossiou T, Hothersall JS, Woods EA, Okkenhaug K, Jacobson J, MacRobert AJ. Firefly luciferin-activated rose bengal: in vitro photodynamic therapy by intracellular chemiluminescence in transgenic NIH 3T3 cells. Cancer Res. 2003; 63 (8): 1818-1821.
- 14- Delprat GD, Epstein NN, Kerr WJ. A new liver function test: The elimination of rose Bengal when injected into the circulation of human subjects. Arch Intern Med. 1924; 34 (4): 533-541.
- 15- Nordyke RA. Surgical vs. nonsurgical jaundice: Differentiation by a combination of rose Bengal I131 and standard liver-function tests. JAMA. 1965; 194 (9): 949-953.
- 16- Marsh RJ, Fraunfelder FT, McGill JI, Phil D. Herpetic corneal epithelial disease. Arch Ophthalmol. 1976; 94 (11): 1899-1902.

- 17- Argüeso P, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Sumiyoshi M, Gipson IK. Mucin characteristics of Human Corneal-Limbal Epithelial Cells that Exclude the Rose Bengal Anionic Dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47 (1): 113-119.
- 18- Wachter E, Dees C, Harkins J, Scott T, Petersen M, Rush RE, et al. Topical rose Bengal: pre-clinical evaluation of pharmacokinetics and safety. *Lasers Surg Med.* 2003; 32 (2): 101-110.
- 19- Panzarini E, Tenuzzo B, Palazzo F, Chionna A, Dini L. Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *J Photoch Photobio B.* 2006; 83 (1): 39-47.
- 20- Mousavi SH, Zhang XD, Sharifi M, Hersey P. Study of rose Bengal-induced cell death in melanoma cells in the absence of light. *IJBMS.* 2006; 9 (3): 216-222.
- 21- Wiener M, Damian DL, Thompson JF. Systemic phototoxicity following intralesional rose Bengal for subcutaneous melanoma metastases. *Dermatology.* 2008; 216 (4): 361-362.
- 22- Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983; 65 (1-2): 55-63.
- 23- Schmidt HHHW, Kelm M. In: Feelish M, Stamler J. (eds.) *Methods in Nitric Oxide Research.* New York: John Wiley & Sons Press; 1996. pp: 491-497.
- 24- Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol.* 1995; 35: 655-677.
- 25- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 2000; 6 (5): 347-371.

Study the anti-inflammatory effect of Rose Bengal in LPS-activated macrophages in dark

S.A. Mousavi¹, Sh. Zamani TR², Z. Siadat³, M. Mahmoudi⁴

Background and Aim: Rose Bengal is a water-soluble, anionic xanthin dye. It has been used as a safe compound for many years. But, anti-inflammatory effect of Rose Bengal has not been studied. The aim of this study was to determine the effect of Rose Bengal on nitric oxide production and its inflammatory induced response and inducible nitric oxide synthase expression in LPS-activated J774A.1 macrophages as an inflammatory model in dark.

Materials and Methods: In an experimental study, J774A.1 macrophages cell line was purchased from Pasteur's institute and the cells were treated with different concentrations of Rose Bengal with or without lipopolysaccharide (LPS) in dark. The effect of different concentrations of Rose Bengal on cell viability was studied using MTT assay. Griess reagent was used to determine production of nitric oxide (micromolar) in test and control groups. Western blotting was applied to evaluate the expression of inducible nitric oxide. Data were analyzed at the significant level of $P<0.05$ using t student-test.

Results: MTT assay showed that cell viability of treated macrophages (1, 10, 50, 100, 200 and 300 micromolar) were 99 ± 0.66 , 97 ± 1.2 , 90 ± 0.88 , 88 ± 0.57 , 81 ± 0.88 , 80 ± 0.57 percent, respectively. The amount of nitrite oxide concentration (micromolar) \pm SEM by different concentrations of Rose Bengal (1, 10, 50, 100, 200 and 300 micromolar) were 17.1 ± 0.17 , 14.3 ± 0.17 , 13.1 ± 0.09 , 8.9 ± 0.32 , 6.1 ± 0.09 and 0 micromolar respectively and 21.4 ± 0.21 in control group. Expression of iNOS was decreased in a dose dependent manner by Rose Bengal.

Conclusion: The obtained results showed that Rose Bengal (below 200 micromolar) decreased nitric oxide production and iNOS expression in inflammatory macrophages without significant decreasing in their viability. Besides, its anti-inflammatory effect is mediated by inhibition of iNOS expression. Thus, Rose Bengal could be a new and safe anti-inflammatory agent for in vivo studies.

Key Words: Rose Bengal; J774A.1 macrophages; Inflammation; Nitric oxide; Inducible nitric oxide synthase

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2009; 16 (2): 10-17.

Received: 24.1.2008 Last Revised: 25.8.2008 Accepted: 19.11.2008

¹ Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² M.Sc in Immunology, Bu-Ali Research Institute, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ M.Sc in Nutrition, Department of Biochemistry and Nutrition, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Corresponding Author; Professor of Immunology and Allergy, Bu-Ali Research Institute, Immunology Research Center, Mashhad, Iran. mahmoudim@mums.ac.ir