**مقاله اصیل پژوهشی**

# بررسی تأثیر ضدّ التهابی رزبنگال در ماکروفاژهای فعال‌شده با لیپوپلی‌ساکارید در غیاب نور

**دکتر سید هادی موسوی[1]- شهرزاد زمانی تقی‌زاده رابع[2]- زهرا سیادت[3]- دکتر محمود محمودی[4]**

## چکیده

**زمینه و هدف:** رزبنگال یک رنگ گزانتینی آنیونی محلول در آب است که سابقه طولانی استفاده بی‌خطر از آن، نشان‌دهنده اثرات جانبی بسیار کم آن می‌باشد. با این حال تاکنون تأثیر ضدّ التهابی آن بررسی نشده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر رزبنگال بر پاسخ التهابی با واسطه تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی (iNOS) در مدل ماکروفاژهای فعال‌شده با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) در تاریکی انجام شد.

**روش تحقیق:** در این مطالعه تجربی، ماکروفاژهای رده J774A.1 از انستیتو پاستور خریداری 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 رنگ‌سنجی گریس و برای ارزیابی میزان بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی، از روش لکه‌گذاری وسترن 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 (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب ۹۹±۰/۶۶، ۹۷±۱/۲۰، ۹۰±۰/۸۸، ۸۸±۰/۵۷ و ۸۱±۰/۸۸ و ۸۰±۰/۵۷ درصد بود. میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول) توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب ۱۷/۱±۰/۱۷، ۱۴/۳±۰/۱۷، ۱۳/۱۶±۰/۰۹، ۸/۹±۰/۳۲، ۶/۱۶±۰/۰۹ و صفر، و در گروه شاهد ۲۱/۴±۰/۲۱ 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 سلول‌ها (در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میکرومول) تأثیر قابل توجهی داشته باشد؛ همچنین فرایند تأثیر ضدّ التهابی رزبنگال از طریق مهار بیان آنزیم iNOS نشان داده شد. این مطالعه رزبنگال را به عنوان یک ماده ضدّ التهابی بی‌خطر و جدید جهت بررسی در شرایط درون‌تنی معرفی می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** رزبنگال؛ ماکروفاژهای رده J774A.1؛ التهاب؛ اکسید نیتریک؛ آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی

**مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۸۸؛ ۱۶ (۲): ۱۰-۱۷.**

**دریافت: ۱۳۸۶/۱۱/۴ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۶/۴ پذیرش: ۱۳۸۷/۸/۲۸**

[1] استادیار گروه آموزشی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[2] کارشناس ارشد ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[3] کارشناس ارشد تغذیه گروه آموزشی بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[4] نویسنده مسؤول؛ استاد ایمونولوژی و آلرژی، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

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

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

## مقدمه

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

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

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

ماکروفاژها با تولید زیاد اکسید نیتریک و مشتقاتش، یعنی دی‌اکسید نیتروژن [**] و پراکسی‌نیتریت [††] توسط آنزیم iNOS، نقش بسیار مهمّی در ایجاد التهاب ایفا می‌کنند (۹،۸).

تولید زیاد اکسید نیتریک در فرایند سرطان‌زایی [‡‡] نیز نقش داشته (۱۰) و به بیماری‌زایی [§§] بیماری‌های التهابی، از جمله شوک عفونی و سکته قلبی کمک می‌کند (۱۱)؛ در واقع، از طرفی تولید اکسید نیتریک توسط آنزیم iNOS در ماکروفاژها، سبب مهار رشد سلول‌های توموری و حذف پاتوژن‌های مختلف می‌شود و از طرف دیگر تولید بیش از حدّ و نابه‌جای آن توسط ماکروفاژها و سایر سلول‌ها، پیامدها و عوارض نامطلوبی از جمله التهاب شدید و شوک عفونی به دنبال دارد.

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

رزبنگال (RB) [***] با ترکیب شیمیایی ۴ و ۵ و ۶ و ۷- تتراکلرو- ۲' و ۴' و ۵' و ۷'- تترایدوفلئورسین 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 ماکروفاژهای التهابی در شرایط برون‌تنی

[*] *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*

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

## روش تحقیق

در این مطالعه بنیادی، رده سلولی مونوسیت/ماکروفاژ موشی J774A.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)‡ ۱۰٪، ۱۰۰U/mL پنی‌سیلین، ۱۰۰µg استرپتومایسین و ۲mM ال-گلوتامین و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور حاوی $CO_2$ نگهداری شد. برای انجام آزمایش‌های مختلف، زمانی که حداقل ۷۰٪ ماکروفاژ 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 میتوکندریایی** سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان†† ارغوانی‌رنگ می‌باشد که توسط دی‌متیل سولفوکساید‡‡(DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجادشده بیشتر است. این روش بر آزمون ال.تی.تی§§ که با مواد رادیواکتیو کار می‌کند، مزیت دارد؛ بدین منظور $۱۲\times۱۰^{۴}$ عدد سلول به صورت گروه‌های مختلف 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 سولفوکساید 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 ۱۰۰×(OD شاهد/OD مورد) محاسبه گردید.

به منظور بررسی تأثیر رزبنگال بر تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی، ماکروفاژها در تاریکی به صورت گروه‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

گروه شاهد:

– ماکروفاژهای تیمار نشده که تنها در مجاورت محیط کشت قرار داده شدند.

گروه‌های مورد:

– ماکروفاژهایی که با محیط حاوی لیپوپلی‌ساکارید یا LPS (Escherichia coli serotype B4: 0111 محصول شرکت سیگما)، با غلظت ۱µg/ml تیمار شدند.

– ماکروفاژهایی که ابتدا به مدت یک ساعت با غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) و سپس با LPS با غلظت ۱µg/mL تیمار شدند.

از روش رنگ‌سنجی گریس††† برای سنجش میزان تولید اکسید نیتریک استفاده شد (۲۳). در این روش، میزان تجمع $NO_2$ به عنوان شاخص میزان تولید NO در مایع رویی سلول‌های کشت داده‌شده توسط بافر گریس و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت‌سدیم تعیین شد.

ماکروفاژهای J774A.1 کشت داده‌شده در گروه‌های مورد و شاهد به تعداد $۸\times۱۰^{۵}$ عدد در هر چاهک پلیت ۲۴

* *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*

خانه‌ای ریخته شدند.

پس از ۱۸ ساعت، مایع رویی ماکروفاژها با محلول حاوی ان (نفتیل) اتیلن آمید دی‌هیدروکلراید*، سولفانیل‌آمید† و اسید فسفوریک‡ ۵٪ و آب مقطر در دمای اتاق تیمار شده، سپس جذب نمونه‌ها توسط دستگاه خواننده الیزا در طول موج ۵۴۵ نانومتر قرائت شد. غلظت نیتریت تولید شده توسط ماکروفاژهای 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 نیتریک‌اکساید سنتاز القایی از روش لکه‌گذاری وسترن§ استفاده شد. ماکروفاژهای J774A.1 کشت داده‌شده در گروه‌های مورد و شاهد به تعداد $۱/۵\times۱۰^{۶}$ 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 ۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و از محلول رویی به عنوان عصاره سیتوزولی استفاده شد. غلظت پروتئین عصاره سیتوزولی با استفاده از روش برادفورد†† و منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین شد. ۵۰ میکروگرم پروتئین لیزات (موجود در عصاره سیتوزولی گروه‌های مورد و شاهد) همراه بافر لاملی‡‡ (حاوی سدیم دودسیل‌سولفات (SDS)§§، ۲- مرکاپتو اتانول (2-ME)*** و بلوبرموفنل††† بر روی ژل ۸٪ پلی‌آکریل‌آمید‡‡‡ همراه سدیم دودسیل‌سولفات 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 ۱/۱۰۰۰۰ در دمای اتاق تیمار شد؛ سپس بلات‌ها شستشو داده شدند و با استفاده از معرف‌های ردیابی شیمی‌لومینسنت‡‡‡‡ بر طبق دستور شرکت سازنده مجاور شده و باند ۱۳۰ کیلو دالتونی iNOS با استفاده از دستگاه ردیاب سیگنال‌های ECL ظاهر شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف§§§§ مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع نرمال هستند؛ بنابراین برای بررسی داده‌ها از آزمون آماری پارامتری تی به منظور مقایسه داده‌ها بین گروه‌های مورد (ماکروفاژهای تیمار شده با LPS و غلظت‌های مختلف رزبنگال) به صورت جداگانه با گروه شاهد (ماکروفاژهای تیمار شده با LPS به تنهایی) استفاده گردید. سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

* *N-(naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride*
† *Sulfanilamide*
‡ *Phosphoric Acid*
§ *Western Blotting Protocol*
** *Phosphate Buffered Saline*
†† *Bradford Protein Assay*
‡‡ *Laemmli Buffer*

§§ *Sodium Dodecyl Sulfate*
*** *2-mercaptoethanol*
††† *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*

## یافته‌ها

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 فعال‌شده با LPS مهار می‌کند.

میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول± انحراف‌معیار خطا) توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب ۱۷/۱±۰/۱۷، ۱۴/۳±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 فعال‌شده 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 ۹۹±۰/۶۶، ۹۷±۱/۲۰، ۹۰±۰/۸۸، ۸۸±۰/۵۷، ۸۱±۰/۸۸، 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 دادند که رزبنگال به طور وابسته به دوز، سبب کاهش بیان آنزیم iNOS شده‌است (شکل ۱).

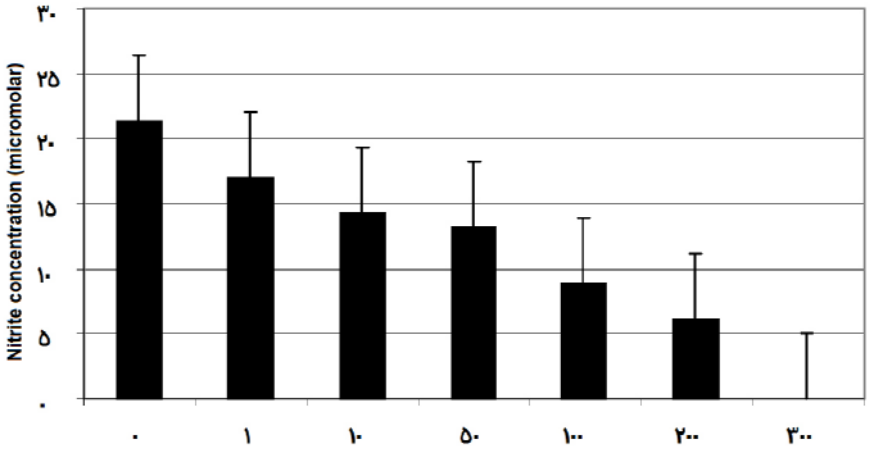
**جدول ۱- مقایسه میانگین میزان تولید NO توسط ماکروفاژهای J774A.1 تحریک‌شده با LPS بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال**

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

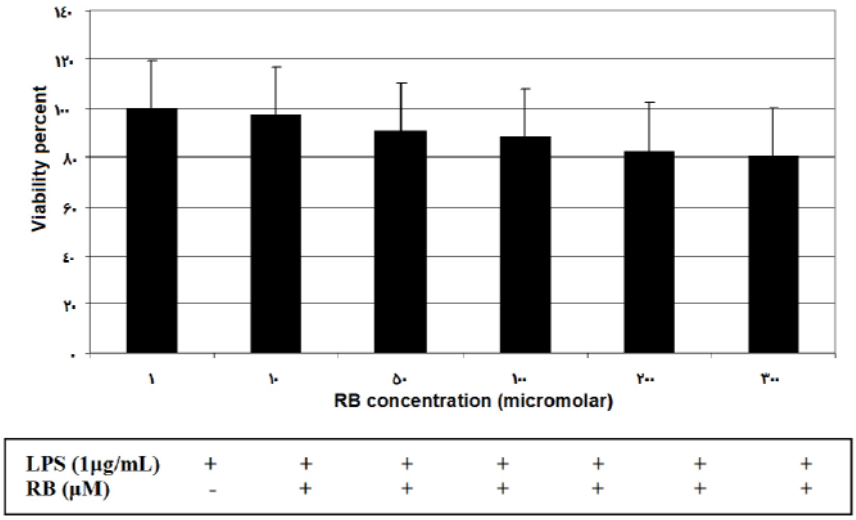
* مقادیر **P** ذکر شده مربوط به مقایسه هر گروه با گروه شاهد می‌باشد.

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

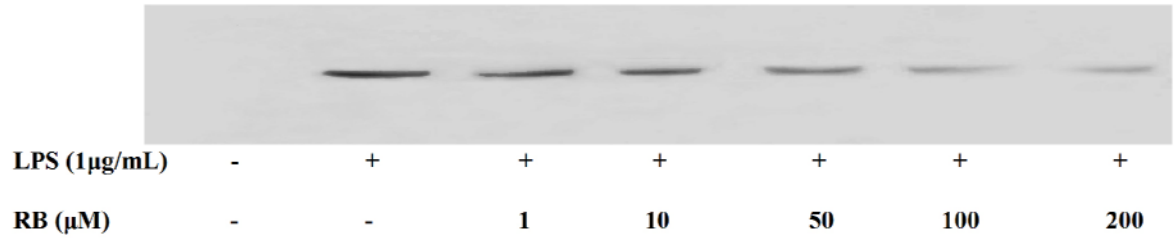
| رزبنگال (میکرومول) | درصد زنده‌بودن سلول‌ها |
|---|---|
| ۱ | ۹۹±۰/۶۶ |
| ۱۰ | ۹۷±۱/۲۰ |
| ۵۰ | ۹۰±۰/۸۸ |
| ۱۰۰ | ۸۸±۰/۵۷ |
| ۲۰۰ | ۸۱±۰/۸۸ |
| ۳۰۰ | ۸۰±۰/۵۷ |




**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 زنده‌بودن ماکروفاژهای J774A.1 بعد از ۲٤ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال**




**شکل ۱- تنظیم بیان iNOS توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال در ماکروفاژهای J774A.1 تحریک‌شده با LPS**

## 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 گرم منفی، سنتز آنزیم iNOS در بسیاری از سلول‌ها، از جمله ماکروفاژها القا شده و توانایی کشندگی سلولی، آسیب بافتی، عفونت التهابی و شوک را بر می‌انگیزد (۲۵،۲۴)؛ بنابراین سنجش میزان تولید اکسید نیتریک می‌تواند روشی جهت ارزیابی اثرات ضدّ التهابی ترکیبات دارویی مختلف باشد.

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

به منظور ایجاد یک مدل التهابی، ماکروفاژها در شرایط برون‌تنی با لیپوپلی‌ساکارید (۱µg/mL) تیمار شدند که محرک قوی تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی می‌باشد؛ سپس غلظت‌های مختلف رزبنگال به ماکروفاژهای التهابی اضافه شد و تولید اکسید نیتریک (توسط روش گریس) و بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی (توسط روش لکه‌گذاری وسترن) ارزیابی گردید. غلظت‌های مورد استفاده رزبنگال (جز غلظت ۱ میلی‌مولار) در سطح معنی‌داری تولید اکسید نیتریک را توسط ماکروفاژهای فعال‌شده با LPS مهار کردند و این مهار وابسته به دوز بود؛ همچنین، میزان بیان پروتئین آنزیم نیتریک‌اکساید 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 ضدّ التهابی خوب بدون سمیت قابل

توجهی بر ماکروفاژها داشته باشند. این معیارها نشان می‌دهند که رزبنگال می‌تواند به عنوان یک ماده ضدّ التهابی جدید و بی‌خطر در بررسی در شرایط درون‌تنی مورد استفاده قرارگیرد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده‌شد که رزبنگال به طور وابسته به دوز، تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز را در ماکروفاژهای التهابی کاهش می‌دهد؛ بدون این که تأثیر قابل توجهی بر زنده‌بودن سلول‌ها (در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میکرومول) داشته باشد. همچنین چگونگی تأثیر ضدّ التهابی رزبنگال از طریق مهار بیان آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز القایی (iNOS) نشان داده‌شد. این نتایج نشان می‌دهد که رزبنگال می‌تواند یک عامل ضدّ التهابی جدید برای بررسی در شرایط درون‌تنی باشد.

## 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. Pharmacolol 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.

*Abstract* *Original Article*

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

**S.A. Mousavi [1], Sh . Zamani TR [2], Z. Siadat [3], M. Mahmoudi [4]**

**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)±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*