L-گلوتامین با کاهش سیتوکین های پیش التهابی، اکسید نیتریک و بیان CD40، اندوتوکسمی را مهار می کند

یاسر جعفری خطایلو*[1]، سمیه احمدی افشار[2]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دام پزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۶**

چکیده

مقدمه: پژوهشگران در سال های اخیر در حال بررسی پاتوژنز اصلی درگیر در شوک سپتیک ناشی از لیپوپلی ساکارید بوده اند و استفاده از داروهای مناسب در جهت مداخله با پاتوزنز، دغدغه اصلی آن ها بوده است. بنا بر ابن هدف از این مطالعه، بررسی اثر ال گلوتامین به عنوان القاء کننده HSP 70 در کاهش سیتوکاین های پیش التهابی و واسطه های موثر در شوک سپتیک از جمله تولید نیتریک اکساید و بیان CD 40 در موش های تحت تجویز با LPS می باشد.

مواد و روش ها: ۲۵ سر موش نر نژاد swiss albino به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند ، شامل گروه A (n=5) یا گروه کنترل، گروه B (n=10) دریافت کننده LPS با دوز ۰/۷۵ میلی گرم به ازای هر حیوان به صورت داخل صفاقی و گروه C (n=10) دریافت کننده ال گلوتامین با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان(۳ دز هر ۲۴ ساعت ۳۰ دقیقه بعد تزریق LPS) به صورت داخل صفاقی می باشد. سپس یک روز بعد از تجویز دارو به بررسی سایتوکاین های TNF-α، IFN-γ، IL-4، IL-10، HSP70، CD40 و نیتریک اکساید پرداخته شد.

یافته های پژوهش: تجزیه و تحلیل داده ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه Scheffe test توسط نرم افزار SPSS vol.19 نشان داد ال گلوتامین می تواند باعث کاهش معنی دار سطح سرمی سایتوکاین پیش التهابی، نیتریک اکساید و بیان CD 40 در گروه تحت درمان با دارو(گروه C) نسبت به گروه تحت تجویز LPS (گروه B) شود($P<0.05$).

بحث و نتیجه گیری: ال گلوتامین به واسطه کاهش سطح واسطه های التهابی می تواند گزینه ای مناسب برای درمان باشد.

واژه های کلیدی: پروتئین شوک حرارتی، ال گلوتامین، لیپو پلی ساکارید، نیتریک اکساید

* نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: y.jafari@tabrizu.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

مقدمه

لیپوپلی ساکارید باکتریایی(LPS)، یک اندوتوکسین ضدالتهابی است که در پوشش بیرونی همه باکتری های گرم منفی وجود دارد و هنگامی که باکتری های گرم منفی به بدن راه می یابند و در میزبان تکثیر می شوند، LPS آن ها به داخل گردش خون آزاد می شود و در خون توسط انواع مختلفی از سلول های در گردش تشخیص داده می شود که موجب القاء سیتوکاین های پیش التهابی وابسته به (nuclear factor of kappa NF-κB binding) مانند TNF(tumor necrosis factor)-α، IL(interleukin)-1، پروستاگلاندین ها، و اکسید نیتریک می شود. این سیتوکاین ها و کموکاین ها پاسخ میزبان به عفونت باکتریایی را تقویت می کنند. با این حال، اگر سیتوکاین ها بیش از حد آزاد شوند، می توانند عواقب زیان آوری را برای بدن داشته باشند. به عنوان مثال، شوک سپتیک ناشی از LPS باعث تولید گونه های واکنش گر اکسیژن(ROS) و اختلال عملکرد چندین ارگان می شود که اختلال عملکرد در میوکارد قلب علت اصلی مرگ و میر این موارد است. در مطالعاتی نشان داده شده است که TNF-α اولین سیتوکاین تولید شده به مقادیر زیاد، در پاسخ به LPS است و این علت اصلی بسیاری از اثرات LPS می باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که در طی شوک سپتیک و آسیب های مرتبط با آن، مقدار زیادی از سیتوکاین ها، به ویژه TNF-α، IL-1β، IFN(interferon)-γ، (MCP1) macrophage-chemoattractant protein-1 و cyclooxygenase-2 (Cox-2) تولید می شوند(۱).

با وجود پیشرفت های قابل توجه در درمان ضد میکروبی، مرگ و میر در سپسیس ناشی از LPS شدید هم چنان در حدود ۴۰ درصد است، و منعکس کننده گزینه های محدود درمان می باشد البته امروزه مطالعات مختلفی در مورد درمان شوک سپتک صورت گرفته است که در تعدادی از مطالعات نشان داده شده است که پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP 70) می تواند در کاهش سیتوکاین های التهابی نقش داشته باشد.

پروتئین های شوک گرمایی(HSPs) خانواده ای از پروتئین های نگهدارنده درون سلولی هستند که عملکرد سلولی را حفظ می کنند و نقش آن ها در ارائه آنتی ژن، فعال سازی لنفوسیت ها و ماکروفاژها، فعال شدن و بلوغ سلول های دندریتیک و هم چنین نقش آن ها به عنوان محرک کاهش تولید سیتوکاین های پیش التهابی می باشد، بنا بر این پیشنهاد شده است که HSP ها ارتباط بین سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را فراهم می کنند. HSP 70، یکی از اعضای خانواده پروتئین HSP است که اثرات نظارتی بر سیستم ایمنی دارد و از طریق جلوگیری از آپوپتوز و مرگ سلولی، محافظت سلولی را تامین می کند. در شرایط فیزیولوژیکی، HSP 70 در پلاسمای افراد سالم قابل تشخیص است و این نشان می دهد که در طی زمان هوموستازی، HSP 70 واکنش التهابی را القاء نمی کند و عملکردهای رگولاتوری/التهابی ایمنی آن به شدت کنترل می شود. در مدل های مختلف التهابی در موش نشان داده شده است که HSP 70 دارای اثرات ضد التهابی و محافظتی می باشد، به عنوان مثال، درمان با HSP 70 می تواند از آرتریت در مدل های حیوانی به صورت وابسته به IL-10، ممانعت به عمل آورد. HSP 70 هم چنین می تواند در رد حاد پیوند و مدل های تومور تاخیر ایجاد کند و موش ها را در برابر کولیت ناشی از دکستران سولفات سدیم(DSS) محافظت کند. در هنگام استفاده از HSP 70 برای درمان بیماران مبتلا به آرتریت، نه تنها HSp 70 باعث القای تولید IL-10 توسط این سلول ها می شود بلکه منجر به مهار تولید سایتوکاین هایی مثل IFN-γ و TNF-α در این سلول ها می شود، هم چنین مشخص شده است که HSP 70 می تواند از تولید سایتوکاین های التهابی القا شده توسط LPS از طریق دخالت در رونویسی وابسته به NF-kB جلوگیری نماید(۲).

گمان می رود پروتئین های مختلف در سطح سلول های ایمنی نقش مهمی در القای پاسخ سلولی به پروتئین های شوک حرارتی داشته باشند و برخی از پروتئین ها از جمله TLR(toll like recepror)2 و TLR4 با کوفاکتور CD 14 و CD 36، باعث القاء ترشح سیتوکاین در مسیر وابسته به HSP 70 می شوند. در کل تعامل مستقیمی بین HSP 70 با CD 40 وجود دارد. از طرف دیگر مولکول های کمک تحریکی مانند CD 40 که بخشی از پاسخ های سیستم ایمنی اکتسابی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

می باشند در پیشبرد فرآیند شوک سپتیک بسیار موثر هستند و مشخص شده است در موش هایی که CD 40 در آن ها مهار شده است میزان زنده مانی موش ها در شوک سپتیک افزایش یافته است(۳).

از جمله مولکول های واسط موثر دیگر تولید نیتریک اکساید توسط نیتریک اکساید سنتتاز می باشد که در شرایط پاتولوژیک از جمله اندوتوکسمی ایجاد می شود و باعث عوارض مختلف از جمله نقص گردش خون، کاهش فشارخون و شوک سپتیک را می تواند پیش برد. به نظر می رسد که گلوتامین یک مولکول تعدیل کننده مهم در مسیر سنتز نیتریک اکساید می باشد(۴).

در مطالعه دیگری از یک مدل سپسیس نشان داده شد که افزودن گلوتامین به طور قابل توجهی باعث افزایش سطح HSP 70 و افزایش پاسخ های پیش التهابی اولیه می شود(۲).

گلوتامین یک α-اسید آمینه است و فراوان ترین اسید آمینه خارج سلولی in vivo است به طوری که غلظت خارج سلولی گلوتامین چیـــزی در حدود ۰/۷ میلی مول می باشد. میزان بالای جذب گلوتامین مشخصه سلول هایی با سرعت تقسیم بالا، مانند انتروسیت ها، فیبروبلاست ها و لنفوسیت ها می باشد. گلوتامین در مسیرهای مختلف بیوشیمیایی دخیل است. بعضی از آن ها به عنوان فراهم کننده بستر انـــرژی، پیش ساز سنتز اسید آمینه، اهدا کننده نیتروژن در تشکیل اسیدهای نوکلئیک، کمک به سنتز پروتئین های درون سلولی و تعادل اسید و باز، نقش دارند. گلوتامین یک سوخت اصلی برای بسیاری از ســلول ها از جمله لنفوسیت ها، ماکروفــاژها، فیبروبلاست ها در محیط کشت و سلول های بدخیم است و ارتباط نزدیکی بین میزان فاگوسیتوز در ماکروفاژهای مـــوش و غلظت گلوتامین وجود دارند. ماکروفاژها از دیدگاه متابولیکی سلول های فعالی هستند که میزان بالای ترشحات پروتئینی و بازیافت غشایی از مشخـــصه هـــای آن می باشد و بر این اساس، ماکروفاژها به منابع خارج سلولی گلوتامین وابسته هستند(۵).

سلول های سیستم ایمنی در شرایط التهابی مانند سپسیس و آسیب، نیاز به گلوتامین بالاتری دارند. به عنوان نتیجه افزایش نیاز، تقاضا برای این مواد مغذی ممکن است بیش از تولید، منجر به عدم تعادل شود. در نتیجه، غلظت آن در جریان خون و بافت کاهش می یابد. این غلظت های پـــایین گلوتامین، توانایی بافت های مختلف، به ویژه بافت های ایمنی بدن را برای رسیدن به عملکرد مطلوب، محدود می کند. غلظت گلوتامین پلاسما، تنها سلول هایی از غدد لنفاوی یا طحال را که در مجاورت مویرگ ها قرار دارند، تامین می کند. همان طور که گلوتامین از مایع خارج سلولی استخراج می شود، سلول هایی که فاصله بیشتری از مویرگ ها قرار دارند، در معرض میزان کمتری گلوتامین نسبت به پلاسما قرار دارند. بنا بر این، بر اساس دانش موجود، بافت های ایمونولوژیک با غلظت های پاییـــن گلـــوتامین مواجه می شوند(۵).

بسیاری از مطالعات از ال گلوتامین به عنوان یک القاء کننده غیرسمـــی پروتئین های شوک حرارتی نام برده اند و نشان داده اند که این اسید آمینه دارای اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی در بسیاری از بیماری های خودایمن می باشد. گلوتامین موجب غیر فعال کردن برخی مسیر های پیام رسانی داخلی سلول های ایمنی می شود و اثر محافظتی را در برابر شوک اندوتوکسیک پس از تزریق LPS ایجاد می کند(۶).

لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر ال گلوتامین در کاهش سیتوکاین های پیش التهابی و کاهش تولید نیتریک اکساید و واسطه های موثر در شوک ستیک از جمله CD 40 ازطریق القاء پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در موش های تحت تجویز با LPS، می باشد.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه، شامل مـــوش های نر نژاد swiss albino با وزن ۳۰-۲۵ گرم می باشد. موش های خریداری شده به طور تصادفی در ۳ گروه تقسیم شد. یک گروه که گروه A نامگذاری شد، شامل ۵ عدد موش سالمی بوده اند که فقط نرمال سالین به آن ها تجویز شد. گروه B شامل ۱۰ عدد موش هایی بودند که فقط تحت تجویز LPS (Sigma, Germany) با دوز ۰/۷۵ میلی گرم به ازای هر حیوان(۷) به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند. گروه C شامل ۱۰عدد موش هایی بودند که ۳۰ دقیقه بعد تزرق LPS، ال گـــلوتامین با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن(۸) به صورت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

داخل صفاقی(در ۳ دز هر ۲۴ ساعت به مدت ۳ روز) به آن ها تجویز شد.

مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه(شماره کمیته اخالق دانشـــگاه: IR.TABRIZU.REC.1398.003) مورد تایید قرار گرفت.

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طـــرفه One-way Analysis of variance (ANOVA) Scheffe test نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید. تمام بررسی ها مقدار($P<0.05$) به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. تمام داده ها به صورت میانگین ± SEM بـــیان شده است و سطح معنی داری آماری در این مطالعه $P<0.05$ در نظر گرفته شده است. تمامی آزمایشات یک روز بعد از آخرین دز تجویزی ال گلوتامین صورت گرفت.

اندازه گیری سیتوکاین ها: خون گیری از ورید دمی موش های مقید شده با استفاده از سرنگ انسولینی، یک روز بعد از آخرین دز تجویزی ال گلوتامین انجام شد و میزان سایتوکاین های TNF-α، IFN-γ، IL-4، IL-10 موجود در نمـــونه های سرم خون موش ها با استفاده از کیت تجربی الایزا(Bender Med Co.,Austria) به روش الایزای ساندویچی اندازه گیری شد به طور خلاصه، پلیت ۹۶ خانه توسط آنتی بادی اختصاصی سایتوکـــاین های TNF-α، IFN-γ، IL-4، IL-10 پوشیده شد و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شد. سپس پلیت ۵ بار به مدت ۱ دقیقه توسط بافر PBS ۰/۰۱ مولار و توئین ۲۰، ۰/۰۵ مولار شسته شد و بعد آن مرحله بلاک سازی پلیت ها توسط محلول موجود در کیت ها به مدت ۱ ساعت انجام شد و بعد آن دوباره مرحله شستـــشو به روش فوق انجام شد سپس استانداردها و نمونه ها به صورت دوتایی اضافه شدند و ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد آن آنتی بادی ثانویه اضافه شد و ۱ ساعت انکوبه شدند و پلیت ها دوباره شسته شدند. سپس Avidin-HRP افزوده شده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و دوباره مرحله شستشو داشته و سپس سوبسترای TMB اضافه شد و ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد و بعد واکنش توسط اضافه کردن اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف شد. شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۶۲۰nm توسط الایزا نگار ارزیابی شده و به محض این که استاندارد شماره ۱، جذب نوری در حد ۰/۹ الی ۰/۹۵ را نشان داد، ادامه واکنش توسط افزودن ۱۰۰ µl از محلول یک مولار اسید فسفریک متوقف شد و بلافاصله پلیت ها توسط دستگاه الایزا نگار و با طـــول موج ۴۵۰nm خوانده شد. و جذب نوری نمونه ها در ۴۵۰nm اندازه گیـــری شـــد و سطـــح سایتوکاین ها نسبت به منحنی استاندارد سنجیده شد. متوسط OD به دست آمده محاسبه و منحنی استاندارد بر روی کاغذ لگاریتمی رسم شد. به کمک منحنی استاندارد ترسیم شده مقدار هر یک از سایتوکین های موجود در نمونه تعیین و به صورت pg/ml تعیین گردید. ملاک مورد نظر جهت اطمینان صحت کار عدم اختلاف بیش از ۲۰ درصد هر یک از نمونه های مضاعف با میانگین محاسبه شده می باشد. لازم به ذکر است از آن جایی که در مرحله سوم نمونه مورد آزمایش به نسبت یک به دو رقیق شده است، غلظت نهایی سایتوکین ها با دو برابر کردن اعداد به دست آمده از روی منحنی استاندارد مشخص می گردد.

اندازه گیری HSP 70: از وریـــد دمی موش ها خون گیری به عمل آمد و پس از جداسازی سرم خون اندازه گیری میزان HSP 70 با استفاده ازکیت تجاری الایزا(شـــرکت Stress Gen., Biotechnologies. America) طبق پروتـــکل شرکت سازنده بر روی نمونه های سرم خون موش ها سنجش شد(جزئیات انجام کار مشابه ارزیـــابی سایتوکین هاست). منحنی استاندارد آن بین ۱۲۵-۰/۲ نانوگرم در میلی لیتر پروتئین موجود در محلول(ng/ml) رسم شد. حساسیت آزمایش ۰/۰۹ ng/ml بود و غلظـــت پروتئین HSP 70 توسط منحنی استاندارد سنجیده شد.

اندازه گیری CD 40: میزان تغییرات در بروز مارکر سطحی CD 40 به وسیله فلوسایتومتری سنجیده شد. بدین ترتیب موش های هر ۳ گروه نخاعی شدند و طحال آن هـــا خـــارج و له شد. از طحال موش ها سوسپانسیون تهیه شد و سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ گردید. RBC های موش با استفاده از بافر لیز کننده ACK (شـــــامـــــل NH4Cl، KHCO3 و EDTA.Na2.2H2O) لیز شدند. یک میلیون سلول دو بار با PBS شسته شد و سرانجام در ۳۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

PBS حل شد و با ۳ میکرو لیتر آنتی بادی anti mouse CD 40-FITC (eBioscience Co., Austria) در تاریکی به مدت ۱ ساعت مجاور شد. آنتی بادی های که متصل نشدند شسته شده و سلول ها با ۵۰۰ میکرولیتر PBS 1X، همان طور که در پروتکل اصلاح شده شرح داده شده است(۹) به حجم نهایی رسیدند و در FACS caliber با استفاده از نرم افزار Cell Quest Pro مورد بررسی قرار گرفت(BD FACS Calibur).

روش تهیه بافر لیز کننده ACK: ابتدا g ۸/۲۹ از کلرید آمونیوم g ۱ از بی کربنات پتاسم و mg ۳۲/۲ میلی گرم از EDTA توزین را به ۸۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه افزوده گردید. در این مرحله pH محلول با افزودن محلول ۱ نرمال اسیدکلریدریک بر روی ۷/۲ الی ۷/۴ تنظیم گردید و در نهایت حجم محلول با افزودن آب دیونیزه به یک لیتر رسانیده شد. محلول آماده شده در زیر هود لامینار توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون استریل شده و در حرارت اتاق نگهداری شد.

اندازه گیری نیتریک اکساید: سطح اکسید نیتریک توسط معرف Greiss با استفاده از پروتکل که در ابتدا توسط گریس توضیح داده شد، اندازه گیری شد(۱۸). ماکروفاژهای صفاقی جمع آوری شد. به این شکل که به منظور مطالعه برون تنی ماکروفاژهای پریتوئنی موش ها بلافاصله با استفاده از PBS سرد استریل توسط لاواژ کردن یا شستشو دادن محوطه شکمی جداسازی گردید. سلول های جداسازی شده پس از دو بار شستشو با PBS در داخل محیط RPMI ۱۶۴۰ که حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (GIBCO) و 100 U/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin بود کشت داده شده و به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد در انکوباتور قرارگرفته شد(۱۰) و بعد از آن به پلیت های ۹۶ خانه ای در غلظت $۰/۵\times۱۰^{۶}$ cells/ml با ex-vivo LPS اضافه شد. این پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، CO_2 ۵ درصد در ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، تولید نیتریت توسط سلول ها با معرف گریس تعیین شد. غلظت نیتریت در هر نمونه با نمودار استاندارد از غلظت شناخته شده(در µM) از نیتریت سدیم(NaNO2) اندازه گیری شد(۱۱).

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از ارزیابی سطح سرمی TNF-α، IFN-γ، IL-6، IL-1، SHP 70 و نیز اندازه گیری سطح CD 40، نیتریک اکساید در موش هایی گروه B که تنها LPS دریافت کرده بودند و گروه C که ۳۰ دقیقه قبل از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، به شرح زیر می باشد:

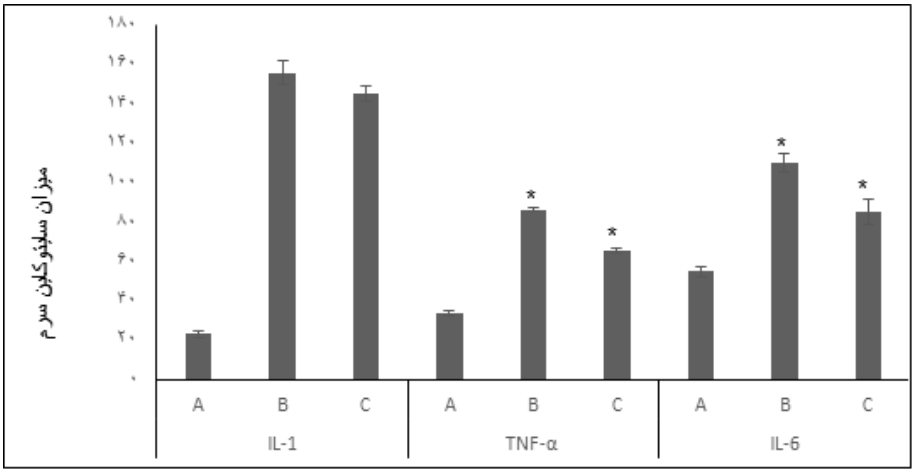
ارزیابی سطح IL-1: سرم خون گرفته شده نشان داد که میزان سایتوکاین IL-1 در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت که این تغییرات معنی دار نبود(شکل شماره ۱).

ارزیابی سطح TNF-α: ارزیابی سرم خون گرفته شده نشان داد که میزان سایتوکاین TNF-α در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت($P<0.05$) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت که این تغییرات معنی دار بود($P<0.05$)(شکل شماره ۱).

ارزیابی سطح IL-6: بررسی سرم خون گرفته شده نشان داد که میزان سایتوکاین IL-6 در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت($P<0.05$) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت که این تغییرات معنی دار بود($P<0.05$)(شکل شماره ۱).

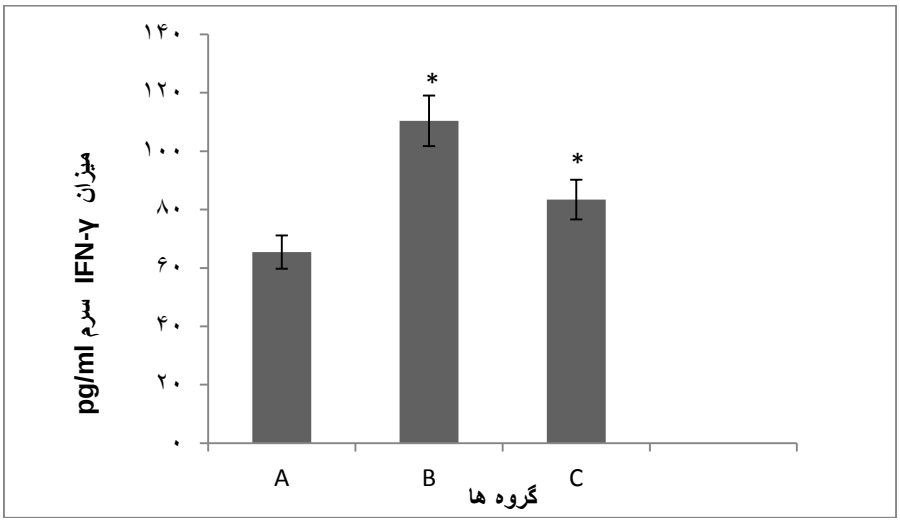
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]



شکل شماره ۱. تغییرات سطح سرمی IL-1، TNF-α و IL-6: میزان سایتوکاین IL-1 در سرم موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت که این تغییرات معنی دار نیست. میزان سایتوکاین های TNF-α و IL-6 در سرم موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت(P<0.05) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت(P<0.05) (*نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح(P<0.05) بین گروه های B و C).A گروه کنترل سالم، گروه B گروه دریافت کننده LPS تنها و گروه C گروه دریافت کننده LPS به همراه دارو

ارزیابی سطح IFN-γ: در مورد IFN-γ نیز ارزیابی سطح سرمی خون گرفته شده نشان داد که میزان سایتوکاین IFN-γ در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت(P<0.05) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت که این تغییرات معنی دار بود(P<0.05)(شکل شماره ۲).



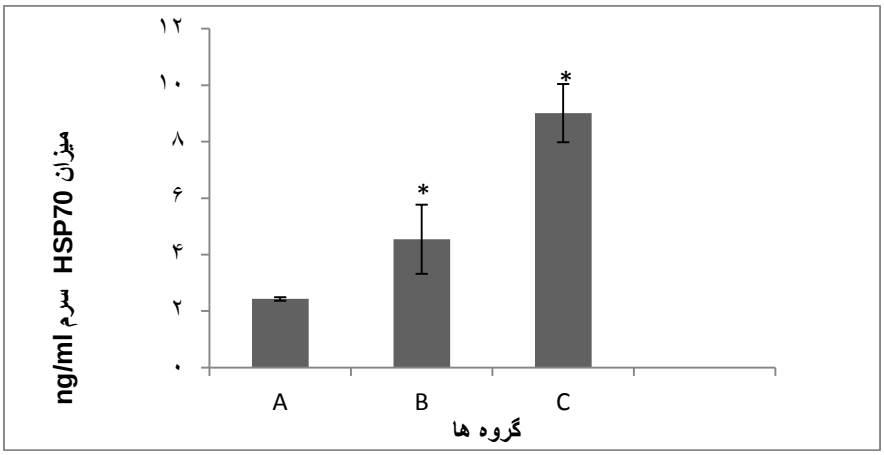
شکل شماره ۱. تغییرات سطح سرمی IFN-γ: میزان سایتوکاین IFN-γ در سرم موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت(P<0.05) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت(P<0.05)(*نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح(P<0.05) بین گروه های B و C).A گروه کنترل سالم، گروه B گروه دریافت کننده LPS تنها و گروه C گروه دریافت کننده LPS به همراه دارو

ارزیابی سطح HSP 70: با توجه به این که در مطالعات مختلف نشان داده شده است که ال گلوتامن می تواند سطح سرمی HSP 70 را تغییر دهد در این مطالعه به بررسی سطح سرمی این پروتئین پرداخته شد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

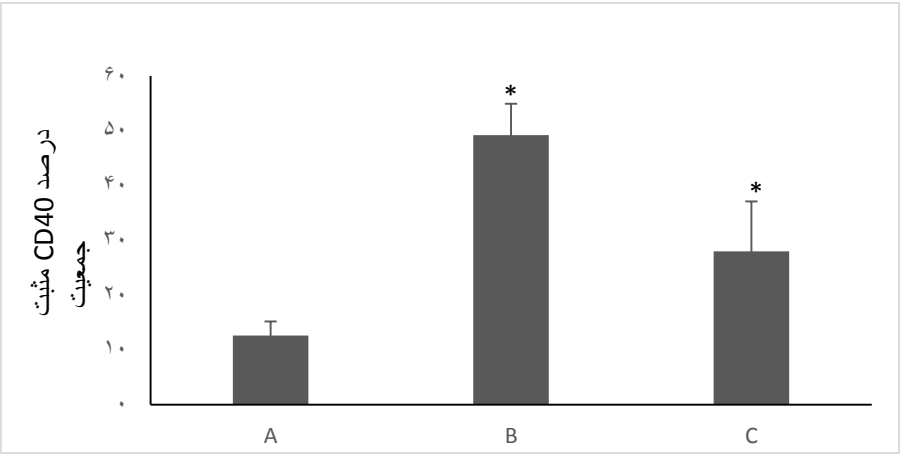
[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

و مشاهده گردید که سطح این پروتئین درموش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده بودند دچار افزایش معنی دار نسبت به گروه A (که تنها نرمال سالین دریافت کرده بودند)، شدند. در گروه C نیز افزاش سطح این پروتئین مشاهده شد که این افزایش بسیار بیشتر از افزایش مشاهده شده در گروه B بود(P<0.05)(شکل شماره ۳).



شکل شماره ۲. تغییرات سطح سرمی HSP 70: سطح HSP 70 در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده بودند دچار افزایش معنی دار نسبت به گروه A (شاهد) شدند. در گروه C نیز افزایش سطح این پروتئین مشاهده شد(P<0.05). (* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح(P<0.05) بین گروه های B و C).A گروه کنترل سالم، گروه B گروه دریافت کننده LPS تنها و گروه C گروه دریافت کننده LPS به همراه دارو

ارزیابی میزان CD 40: در مورد CD 40 ارزیابی میزان بروز این مارکر در سطح سلول های طحالی نشان داد که میزان بروز این مارکر در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت(P<0.05) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت(P<0.05)(شکل شماره ۴).

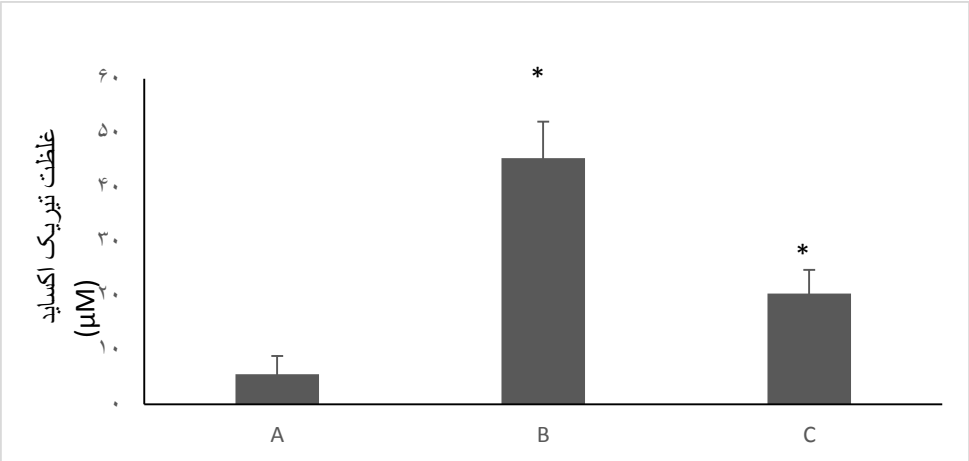


شکل شماره ۴. تغییرات سطح بروز CD 40: میزان بروز CD 40 در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت(P<0.05) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت(P<0.05)(* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح(P<0.05) بین گروه های B و C).A گروه کنترل سالم، گروه B گروه دریافت کننده LPS تنها و گروه C گروه دریافت کننده LPS به همراه دارو

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

ارزیابی نیترک اکساید: ارزیابی نیترک اکساید نشان داد که میزان نیتریک اکساید در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت($P<0.05$) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت که این تغییرات معنی دار بود($P<0.05$)(شکل شماره ۵).



شکل شماره ۳. تغییرات میزان نیتریک اکساید: میزان نیتریک اکساید در موش های گروه B که تنها LPS دریافت کرده اند به صورت معنی داری افزایش یافت($P<0.05$) و در موش های گروه C که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی LPS، ال گلوتامین دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه B کاهش یافت($P<0.05$)(* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح($P<0.05$) بین گروه های B و A).C گروه کنترل سالم، گروه B گروه دریافت کننده LPS تنها و گروه C گروه دریافت کننده LPS به همراه دارو

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه بررسی اثرات ال گلوتامین به عنوان کاهش دهنده سطح سایتوکاین های پیش التهابی، نیتریک اکساید و میزان بیان CD 40 در موش swiss albino مبتلا به شوک سپتیک تحت القاء LPS انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که LPS می تواند باعث افزایش معنی دار سطح سرمی سایتوکاین پیش التهابی مانند TNF-α، IFN-γ، IL-6 نیتریک اکساید و افزایش بیان CD 40 در گروه تحت القاء LPS شود و تجویز ال گلوتامین بعد از تجویز LPS (گروه C) می تواند سایتوکاین پیش التهابی TNF-α، IFN-γ، IL-6، میزان بیان CD 40 و نیتریک اکساید را در مقایسه با گروه B کاهش دهد و HSP 70 را افزایش دهد که تمامی این تغییرات معنی دار بود($P<0.05$). تغییرات برای سایتوکاین IL-1 در هر دو گروه معنی دار نبود.

جوندگان به طور گسترده ای به عنوان یک مدل آزمایشی حیوانی برای شوک سپتیک ناشی از LPS (۱۲) مورد استفاده قرار گرفته اند، که در آن سطوح بالای سیتوکین های سرم، به ویژه TNF-α مشاهده گردید. فاکتورهای اصلی که اختلال عملکرد چندگانه حاصل از LPS را تحت تاثیر قرار می دهند، شامل سیتوکین هایی نظیر TNF-α، IL-1β و IL-6 و دیگر واسطه های التهابی مانند اکسید نیتریک، پروستاگلاندین ها، متابولیت های Cox-2، CD 40 و لیپید هستند(۱). از این رو تاکنون مطالعات مختلفی در راستای کاهش سیتوکاین های التهابی برای درمان شوک سپتک ناشی از LPS، انجام گرفته است.

از جمله مواردی که بر روی القاء HSP 70 تاثیر می گذارد ال گلوتامن می باشد. در مطالعه حاضر نیز ما از ال گلوتامین به عنوان القاگر HSP 70 استفاده کرده ایم. و داده های ما حاکی از افزایش معنی دار در HSP 70 و کاهش معنی دار در سایتوکان های التهابی TNF-α، INF- γ و IL-6 در گروه های درمانی با ال گلوتامین بود این کاهش در سطح IL-1 نیز مشاهده شد که معنی دار نبود.

مطالعات تجربی گزارش داده اند که مکمل های گلوتامین می توانند از طریق مسدود کردن سیگنال های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

التهابی پایین دست فاکتور نسخـــه برداری NF-κB سلول ها، بافت ها و کل اندام ها را از استرس و آسیب محافظت کنند، بنا بر این باعـــث ایجاد تعادل بین سیتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی می شوند و با بهبود بخشیدن به عملکرد سلول های ایمنی، ممکن است مزایای بالقوه برای سلامتی داشته باشد(۱۳).

در مطالعه ای نـــشان داده شده است که ادغام ترکیبات گلوتامین و آرژیـــنین قادر به کاهش تولید سیتوکاین های پیش التهابی در بیماران مبتلا به کرون است که این امر با سرکوب مسیرهای التهابی مبتنی بر NF-κB و p38/MAPK همراه می باشد(۱۴).

در مطالعه ای که کروزات و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، نشان داده شد که گلوتامین از طریق افزایش بیان HSP 70 می تواند شرایط التهابی ای که معمولاً به تولید بی رویه سایتوکاین ها منجر می شود، را تنظیم کند(۱۵).

محققان معتقدند که گلوتامین می تواند نقش مهمی در تنظیم ایمنی بدن داشته باشد و می تواند تا حد زیادی تمایز و تکثیر ماکروفاژها و لنفوسیت ها وسنتز mRNA فسفولیپید را افزایش دهد و مانع از تولید بیش از حد TNF-α شود و به طور موثر عملکرد سیستم ایمنی را بهبود بخشد علاوه بر این، توانایی محافظت از سد مخاطی، جلوگیری از مـــهاجرت اندوتوکـــسین ها و باکتری ها را دارد که به کاهش سطح اندوتوکسین ها و کاهش آسیب بافتی منتهی می شود(۱۶).

در مطالعه ای که توسط وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد نشان دادند که میزان IL-10، سطح بیان ICAM-1 و سطح فعالیت میلوپراکسیداز به طور معنی داری در حضور گلوتامین بیشتر بوده و مـــیزان IL-15 و IL-18 به طور قابل توجهی در گروه درمانی پایین تر از گروه کنترل است، که نشان می دهد گلوتامین می تواند به طور موثری پاسخ های التهابی را کاهش دهد و ایمنی بدن را بهبود بخشد. گلوتامین هم چنین می تواند تولید عوامل التهابی را کاهش داده و سطح سیتوکین ها را به طور موثری تنظیم کند(۱۷) که نتایج حاصل از تحقیقات فوق با داده های حاصل از مطالعه حاضر هم راستا می باشند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط فرات اوساریو و همکاران انجام شد، مشخص گردید HSP 70 خارج سلولی نه تنها باعث تولید TNF-α در مونوسیت های انسانی نمی شود، بلکه ظرفیت مونوسیت را برای تولید TNF-α و IL-6 در پاسخ به LPS کاهش می دهد(۱۸). در مطالعه ای دیگر توسط باراکیورا نیز معلوم گردید HSP70 داخل سلولی دارای اثر محافظتی سلولی است؛ زیرا تولید مدیاتورهای التهابی را در هنگام استرس سلولی مهار می کند که این یافته نیز مطابق نتایج مطالعه ی حاضر می باشد(۱۹).

دیگر مطالعات نشان می دهند که HSP 70 خارج سلولی در بیماران مبتلا به آرتـــریت رومـــاتوئید باعث کاهش تولید IL-6، IL-8 و MCP-1 القاء شده توسط TNF-α می شود. به همین ترتیب گزارش شده است که، HSP 72 نوترکیب(از اعضای خانواده HSP 70) با کاهش سطح غلظت TNF-α و IL-6 سرم، باعث کاهش شدت آرتریت القاء شده با کلاژن در موش ها، می شود(۲۰). و در مطالعه بانجن و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده شد که زمـــانی که سلول های تک هسته ای خون محیطـــی انـــسان با LPS در حضور Hsp70 کشت داده شوند، تولید TNF-α توسط این سلول ها در حدود ۵۰ درصد کاهش می یابد(۲۱).

گمان می رود پـــروتئین های مـــختلف سطح سلول های ایمنی نقش مهمی در القای پاسخ سلولی به پروتئین های شوک حرارتی داشته باشند. گزارش اخیر وانگ و همکـــاران(۳) تعامل مستقیم بین HSP 70 با CD 40 را توصیف می کند و نشان داده شده که تزریق LPS موجب افزایش بیان CD 40، می شود. در مقابل HSP 70 انسانی به دمین اگزوپـــلاسم CD 40 متصل می شود که این کار مـــانع اتصال لیگاند CD 40 به CD 40 می شود و در نتیجه تولید TNF-α و IFN- γ کاهش می یابد(۲۲). که این یافته ها مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشند.

افزایش نسخه برداری از پروتئین های شوک حرارتی(HSP) بخشی از پاسخ عمومی به استرس های سلولی می باشد.HSP ها می توانند در غشای پلاسمایی سلول قرار بگـــیرند و تداخل با گیرنده های سطحی سلول های عرضه کننده آنتی ژن مانند CD 40 و CD 90 و LOX1 را تسهیل کنند و باعث انتقال آنتی ژن پپتیدی از سلول دچار استرس به ســـلول عرضه کننده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

آنتی ژن شوند. مشخص شده است در فرآیندهایی مانند التهاب که HSP 70 افزایش می یابد می تواند در کاهش بیان CD 40 به عنوان یک واسطه مهم در پیشبرد التهاب موثر باشد(۲۳).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۲ توسط دالپک و همکاران روی مدل شوک سپتیک و درمان از طریق CPG DNA انجام شد معلوم گردید در گروه هایی که شوک سپتیک القاء شده بود میزان بیان CD 40 و آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز و در نتیجه میزان تولید نیتریک اکساید افزایش یافته بود در صورتی که در گروه درمانی با افزایش میزان HSP 70 بیان CD 40 و میزان تولید نیتریک اکساید کاهش یافته بود که مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشد(۲۴). بریک و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که گلوتامین به عنوان یک مولکول تعدیل کننده مهم در تولید نیتریک اکساید دخالت می کند(۲۵).

در همین راستا دریک بررسی که تاثیر HSP ها را در تنظیم لنفوسیت های T در التهابات مزمن مطالعه کردند معلوم گردید افزایش این پروتئین ها می تواند تولید نیتریک اکساید را کاهش دهد که در راستای نتایج ما بود(۲۶).

در مطالعه ای دیگر که نتایج آن شبیه به نتایج حاصل از این پژوهش است مشخص شد که تجویز گلوتامین به رت های تحت القاء التهاب و درگیری قلبی-ریوی، میزان HSP 70 را در گروه های تحت درمان افزایش می دهد و میزان تولید نیتریک اکساید را از طریق کاهش میزان بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز، کاهش می دهد. HSP 70 از طریق مهار فعال سازی فاکتور نسخه برداری NF-kB و متعاقب آن مهار میزان بیان ژن(iNOS (nitric oxide synthase در مدل های شوک سپتیک در کاهش میزان تولید نیتریک اکساید موثر می باشد(۲۷). در مطالعه ای که HSP70 به موش های دچار سپتیک تزریق شد معلوم گردید میزان بیان ژن CD 40 در این موش ها کاهش می یابد(۲۸). فعال سازی CD 40 در فعال شدن فاکتور نسخه برداری NF-κB و تولید سایتوکاین های پیش التهابی مخصوصاً سایتوکاین های TH(T helper)1 مانند اینترلوکین ۱۲ (IL-12) موثر می باشد و این توانایی در تنظیم سایتوکاین های TH1 به این پروتئین نقش کلیدی در کنترل بیماری های به واسطه TH1 مانند توبرکولوزیس یا شوک سپتیک می دهد(۲۹). گزارش شده است که اتصال HSP70 به ماکروفاژ پس از تحریک با لیپوپلی ساکارید باکتریایی(LPS) به میزان قابل توجهی افزایش می یابد(۳۰).

مطالعه حاضر نشان می دهد که می توان از ال گلوتامین به عنوان کاهش دهنده میزان سایتوکاین های پیش التهابی استفاده کرد. در نهایت، به نظر می رسد که درمان شوک سپتیک با ال گلوتامین به علت کاهش عوارض شوک ناشی از LPS دارای چندین مزیت می باشد به طوری که این موش ها از یک طرف سطح پایینی از TNF-α، IFN-γ، IL-6 و IL-1 و از طرف دیگر سطح بالایی از HSP 70 نسبت به موارد درمان نشده با ال گلوتامین نشان دادند و میزان تولید نیتریک اکساید و میزان بیان CD 40 هم در گروه های درمانی کاهش یافت که این دو عامل از فاکتورهای مهم در پیشبرد التهابات شدید و سپسیس ناشی از باکتری های مختلف می باشند به نظر می رسد ال گلوتامین می تواند به عنوان یک استراتژی مفید در درمان شوک سپتیک ناشی از LPS باکتری های مختلف در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

هزینه های مربوط به این مقاله توسط دانشگاه تبریز تامین شده است بنا بر این بدین وسیله از دانشگاه تبریز و به خصوص معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه تشکر و قدر دانی می گردد.

مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه(شماره کمیته اخالق دانشگاه: IR.TABRIZU.REC.1398.003) مورد تایید قرار گرفت.

References

1.Kobayashi M, Tsuda Y, Yoshida T, Takeuchi D, Utsunomiya T, Takahashi H, et al. Bacterial sepsis and chemokines. Curr Drug Targ 2006; 7: 119-34. doi. 10.2174/138945006775270169

2.Marino LV, Pathan N, Meyer R, Wright V, Habibi P. Glutamine depletion and heat

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

shock protein 70 in children with meningococcal disease. Clin Nutr 2014; 33:915-21. doi.10.1016/j.clnu.2013.09.013

3.Wang Y, Kelly CG, Karttunen JT, Whittall T, Lehner PJ, Duncan L, et al. CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. Immunity 2001; 15:971-83. doi.10.1016/S1074-7613(01)00242-4

4.Ramana KV, Fadl AA, Tammali R, Reddy AB, Chopra AK, Srivastava SK. Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. J Biol Chem 2006 Nov 3;281:33019-29. doi. 10.1074/jbc.M603819200.

5.Newsholme EA, Parry M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system J Par Ent Nutr1990;14:63-7. doi. 10.1177/014860719001400406.

6.Ko HM, Oh SH, Bang HS, Kang NI, Cho BH, Im SY, et al. Glutamine protects mice from lethal endotoxic shock via a rapid induction of MAPK phosphatase-1. J Immunol 2009; 182:7957-62. doi.10.4049/jimmunol.0900043.

7.Carrillo A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez JM, Martin I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in Mice regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. J Pineal Res 2005; 39: 400-408. doi.10.1111/j.1600-079X.2005.00265. x.

8.Jafarikhatailou Y, Delirezh N, Farshid AA, Zafarshamspoor S, Shahabi SH. Effect of L-Glutamine on fasting blood sugar and pathological lesions of autoimmune diabetes in male C57BL/6 mice. Stud Med Sci 2012; 23:133-40.

9.Mishra KP, Rani R, Yadav VS, Naik S. Effect of lead exposure on lymphocyte subsets and activation markers. Immunopharmacol Immunotoxicol 2010; 32:446-9.

doi.10.3109/08923970903503668.

10.Azadmehr A, Afshari A, Baradaran B, Hajiaghaee R, Rezazadeh SH, Monsefesfahani H. Suppression of nitric oxide production in activated murine peritoneal macrophages in vitro and ex vivo by scrophularia striata ethanolic extract. Ethnopharmacol 2009; 124:166-169. doi.10.1016/j.jep.2009.03.042

11.Guzik TJ, Korbut R, Adamek T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J Physiol Pharmacol, :469-87.

12.Lindros KO, Jarvelainen HA. Chronic systemic endotoxin exposure an animal model in experimental hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis2005; 20: 393-8. doi.10.1007/s11011-005-7924-2.

13.Oliveira GP, Dias CM, Pelosi P, Rocco PR. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients. An Acad Bras Cienc 2010; 82:417-30. doi.10.1590/s0001-37652010000200018.

14.Lecleire S, Hassan A, Marion R, Antonietti M, Savoye G, Bole C, et al. Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohns patients in association with changes in nuclear factor kappaB and p38 mitogen activated protein kinase pathways. J Nutr 2008; 138:2481-6. doi. 10.3945/jn.108.099127.

15.Cruzat V, Macedo M, Noel K, Curi R, Newsholme P. Glutamine metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. Nutrients 2018; 23:10. doi.10.3390/nu10111564.

16.Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsen R, Willems L, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. Blood 2015; 126:1346-56. doi.10.1182/blood-2015-01-621870.

17.Xuefeng W, Lei H, Yanxia Qu, Hongmei Lv, Xiaohua He. Effects of glutamine on cytokines 1L-1 and TNF-α in rehabilitation and prognosis of patients with lobectomy. Exp Ther Med. 2018; 16: 2303-08. doi.10.3892/etm.2018.6443

18.Ferat E, Sanchez A, Gutierrez M, Bosco I, Wong I, Pastelin R, et al. Heat shock protein 70 down regulates the production of toll like receptor induced pro inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element binding factor dependent mechanism. J Inflamm 2014; 12; 11:19. doi.10.1186/1476-9255-11-19.

19. Barquera C, Rivera RRy. Obesidad en Mexico epidemiologia y politicas de salud

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

para su control y prevencion. Gac Med Mex 2010; 146:397-407.
20.Luo X, Zuo X, Mo X, Zhou Y, Xiao X. Treatment with recombinant Hsp72 suppresses collagen induced arthritis in Mice. Inflammation 2011; 34:432-9.
21.Bangen JM, Schade FU, Flohe SB. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin induced inflammation. Biochem Biophys Res Commun2007; 359:709-15. doi.10.1016/j.bbrc.2007.05.167.
22.Becker T, Hartl FU, Wieland F. CD40 an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70 peptide complexes. J Cell Biol 2002; 30; 158:1277-85. dol: 10.1083/ jcb.200208083.
23.Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. Cell 2010; 109: 4839-45. doi.10.1016/j.cell.2010.02.015
24.Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K. CpG DNA in the Prevention and treatment of infections. Biodrugs 2002; 16: 419-31. doi.10.2165/00063030-200216060-00003.
25.Bryk J, Ochoa JB, Correia MI, Munera V, Popovic PJ. Effect of citrulline and glutamine on nitric oxide production in RAW 264.7 cells in an arginine depleted environment. J Parent Ent Nutr 2008; 32:377-
83. doi.10.1177/0148607108319807.
26. Zanin A, Nussbaum G, Franitza S, Cohen IR, Lider O. T cells respond to heat shock protein 70 via TLR4 activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. Faseb J 2003; 17:1567-9. doi.10.1096/fj.02-1139fje
27.Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Preoperative glutamine administration induces heat shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. Circulation 2002; 106:2601-7. doi. 10.1161/01.cir.0000035651.72240.07.
28.Tone M, Tone Y, Babik JM, Lin CY, Waldmann H. The role of sp1 and NF-κB in regulating CD40 gene expression. J Biol Chem2002; 277:8890-7. doi.10.1074/ jbc.m109889200
29.Jong YP, Comiskey M, Kalled SL, Mizoguchi E, Flavell RA, Bhan AK, et al. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration. Gastroenterology 2000; 119:715-23. doi.10.1053/gast.2000.16485
30.Pullen SS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors. Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. J Biol Chem 1999; 274:14246-54. doi. 10.1074/jbc.274.20.14246.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]

L-Glutamin-Induced Inhibition of Endotoxemia by Reducing Pre-Inflammatory Cytokines, Nitric Oxide, and CD40 Expression

Jafarikhataylou Y[1], Ahmadiafshar S[1]*

(Received: January 05, 2020 Accepted: May 26, 2020)

Introduction: Researchers have been investigating the major pathogens involved in septic shock caused by lipopolysaccharide in recent years. Moreover, they have been concerned about the use of appropriate drugs to intervene with the main pathogenesis of the disease. This study aimed to investigate the effect of L-Glutamine as an HSP70 inducer in reducing pre-inflammatory cytokines and effective intermediaries in septic shock, including nitric oxide production and CD40 expression in mice treated with lipopolysaccharide (LPS).

Materials & Methods: In total, 25 Swiss Albino mice were randomly divided into three groups of A (control group, n=5), (received LPS with a dose of 0.75 mg/animal intraperitoneally [IP], (n=10), and (received L-glutamine with a dose of 50 mg/kg IP 30 minutes after the injection of LPS [three doses every 24 h], (n=10). Subsequently, one day after the final dose of drug induction, the number of cytokines, such as IFN-γ, IL-4, IL-10, HSP70, CD40, and nitric oxide, were evaluated in this study. *Ethics code:* IR.TABRIZU.REC.1398.003

Findings: The data were analyzed in SPSS software (version 19) through a one-way analysis of variance and Scheffe test. According to the results, L-glutamine can significantly reduce the serum levels of pre-inflammatory cytokine, nitric oxide, and CD40 expression in the drug-treated group (group C), compared to the LPS- treated group (group B) ($P<0.05$).

Discussions & Conclusions: L-glutamine could be a good choice for treatment by reducing the level of inflammatory mediators.

Keywords: Heat shock protein70, L-glutamine, Lipopolysaccharide, Nitric oxide

1 Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2 Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
Corresponding author Email: y.jafari@tabrizu.ac.ir

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.4.12]