Archive of SID

اثر سایتوتوکسیستی و بازدارندگی آلژینات سدیم بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در مقایسه با ترکیبات استروئیدی و غیراستروئیدی در کشت سلولی فیبروسارکوما

علی خدادادی*، دکتر عباس میرشفیعی**، دکتر محمدرضا خرمی زاده**، دکتر فرشید سعادت***، خدیجه حکمت****

خلاصه:
نظر به نقش ماتریکس متالوپروتئینازها در فیزیوپاتولوژی بسیاری از بیماریهای التهابی نظیر آرتریت روماتوئید و انواع بدخیمی ها بر آن شدیم که تاثیر آلژینات سدیم را در مقایسه ترکیبات با ترکیبات استروئیدی و ضدالتهابی غیراستروئیدی مورد کنکاش قرار دهیم. بدین جهت از روش زایموگرافی و سایتوتوکسیسیته سلولی بهره گرفتیم که در این مطالعه داروهای ضدالتهابی دگزامتازون و دیکلوفناک سدیم و پیروکسیکام در مقایسه با آلژینات سدیم به میزان ۱۰ تا ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از این ترکیبات به محیط کشت سلولهای فیبروسارکوما (Wehi 164) با توجه به توانایی این سلولها در تولید میزان بالای آنزیم (MMPs)[1] اضافه شده و به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. کلیه این ترکیبات توانایی کاهش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها را نشان دادند. از طرفی با بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته سلولی مشخص گردید که آلژینات سدیم سمیت به مراتب کمتری نسبت به سایر داروهای مورد استفاده دارا می باشد که همچنین دیکلوفناک دارای بیشترین سمیت بوده است و از طرفی مقادیر بالای آلژینات سدیم در مقایسه با ترکیبات دیگر اثر مهاری تقریباً مشابه در مهار (MMPs) ماتریکس متالوپروتئیناز داشته ولی از اثر سمیّت به مراتب کمتر برخوردار است. با در نظر گرفتن نتایج این تحقیق باتوجه به پائین بودن میزان سمیّت و اثرات ضدالتهابی آلژینات سدیم با سایر داروهای ذکر شده مطالعات بیشتری را به منظور استفاده بالینی از این ماده توصیه می شود.

واژگان کلیدی : آلژینات سدیم، ماتریکس متالوپروتئینازها، سایتوتوکسیسیته

مقدمه :

آلژینات سدیم یک ترکیب نمکی آلژنیک اسید است که از پلی ساکاریدهای طبیعی متشکل از مقادیر متغیر β1-4-D-mannuronic و α-1-4-L-gluronic acid می باشد. این ماده به وسیله باکتریها و جلبکهای قهوه ای تولید و کاربرد

---

* عضو هیئت علمی گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز
** استادیار ایمنولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** دستیار ایمنولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** مربی گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

1- Matrix Metalo Proteinase

دریافت مقاله: ۸۱/۹/۱٤ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۲/۳/۵ اعلام قبولی: ۸۲/۳/۷

www.SID.ir

Archive of SID

فراوانی در صنایع غذایی و دارویی دارد. بررسی و مطالعاتی که در این خصوص صورت پذیرفته است اثرات متفاوتی را مبنی براثر ساپرسوری یا تحریکی این ماده گزارش نموده‌اند (۱و۲). از جمله اثرات تحریکی آن بر سلولهای مونوسیت و تولید TNFα و افزایش روند التهاب و یا مهار تولید هیستامین از ماست سلها است که منجر به مهار روند التهاب می‌گردد و یا شرکت و تأثیر آلژینات در روند ترمیم زخم می‌باشد (۲). ماتریکس متالوپروتیئنازها (mmps) خانواده‌ای از آنزیمهای پروتئولتیک بوده و توانایی تجزیه اکثر ساختارهای شناخته شده در ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژنها، پرتئوگلیکانها و کلیکوپروتئینها را دارا می‌باشد و باعث تشدید روند پاسخهای التهابی می‌شوند (۵-٤). بنابراین ممانعت کننده های این آنزیم در کنترل فرایند التهاب نقش به سزایی دارند (۹و۱۰). در این مطالعه سعی شده است اثرات سایتوتوکسیسیته و ضدالتهابی آلژینات سدیم را در کشت سلولی و با بهره‌گیری از تکنیکهای زایموگرافی، فعالیت تجزیه کنندگی و اثرات ضدالتهابی این ماده در مقایسه با سه داروی ضدالتهابی دگزامتازون و دیکلوفناک سدیم و پیروکسیکام مورد بررسی قرار گیرد. این ماده با مهار فعالیت آنزیمهای ماتریکس متالوپروتئینازها که خانواده ای از آنزیم های پرتئولیتیک می باشند و توانایی تجزیه ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژنها، پرتئوگلیکانها و گلیکوپروتئینها را دارند عمل میکند(۵).

مواد و روشها:

کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز در این تحقیق از شرکت Sigma-Aldrich نمایندگی آلمان تهیه شده است.

کشت سلول : سلول لاین فیبروسارکوما Wehi 164 تهیه شده از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران به تعداد بیست هزار سلول در هر چاهک درپلیت نود و شش خانه‌ای در محیط کشت RPMI 1640 با پنج درصد پنی‌سیلین صد میکرویونیت در میلی‌لیتر و استرپتومایسین صد میکروگرم در میلی‌لیتر تحت شرایط پنج درصد دی اکسید کربن در دمای سی و هفت درجه سانتی‌گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند.

آنالیزهای دوز پاسخ: رقتهای سریال آلژینات سدیم، دیکلوفناک سدیم و دگزامتازون و پیروکسیکام به صورت سه تایی با غلظت ۱۰ الی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به کشت‌های سلولی اضافه شد و پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون سلولها مورد رنگ سنجی قرار گرفتند و به منظور آزمایش زایموگرافی از محیط کشت سلولها نمونه برداری شد.

رنگ سنجی : به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیتوسیتی پس از هر آزمایش سلولها با بافر سالین فسفات سرد شسته و با محلول فرمالدئید پنج درصد ثابت شدند. سلولهای تثبیت شده با کریستال ویوله یک درصد رنگ آمیزی شدند. پس از شستن به سلولهای رنگ شده محلول اسیداستیک سی و سه درصد اضافه گردید. رنگ ارغوانی حاصل با استفاده از دستگاه اسپکترو فوتومتری EPSON LX-400;

www.SID.ir

Archive of SID

ORGANON TEKNIKA; AUSTRIA در طول موج پانصد و هشتاد نانومتر خوانده شد.

زایموگرافی : تکنیک Heussen and Dowdle که برای تشخیص ژلاتیناز (کلاژناز چهار یا MMP2) و MMP در محیط کشت می باشد با پاره ای تغییرات انجام پذیرفت (۱۹). نمونه در ژل پلی آکریل آمید حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر در حضور سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط غیراحیاء به مدت سه ساعت در ولتاژ هشتاد ولت الکتروفورز شدند. سپس ژل با Tritonx 100 با غلظت دو و نیم درصد به منظور حذف سدیم دودسیل شسته شد. ژل حاصل به مدت یک شب در سی و هفت درجه سانتیگراد در درون محلول حاوی 0.1M تریس هیدروکلراید و 100MM کلسیم کلراید نگهداری و سرانجام با کوماسی بلو 0.05% رنگ آمیزی گردید. پس از رنگ بری مناطق پروتئولیز شده در زمینه اصلی مشخص گردیدند. ارزیابی کمی از طریق محاسبه چگالی سطح به وسیله نرم افزار رایانه ای امکان پذیر شد که در نهایت فعالیت آنزیم به صورت نسبی بیان شد (نمودار شماره ۱).

آنالیز آماری تفاوت رشد سلولها و فعالیت ژلاتیناز به روش T تست مورد بررسی قرار گرفت که $P<0.05$ می‌باشد.

نتایج:

اثرات سایتوتوکسیک دو ترکیب ضدالتهابی شامل دیکلوفناک و پیروکسیکام و ترکیب استروئیدی یعنی دگزامتازون و آلژینات سدیم با ویسکوزیته پائین (LVA)[1] و بالا (HVA)[2] در غلظت‌های مختلف از ده تا دویست میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلولهای فیبروسارکوما در نمودار شماره یک نشان داده شده است. چنان که مشاهده می شود در مقایسه با نمودار استاندارد تهیه شده کلیه این ترکیبات با افزایش غلظت اثرات سایتوتوکسیک شدیدتری را اعمال می‌نمایند در صورتیکه آلژینات سدیم با ویسکوزیته بالا و پائین نمودار کاهش در میزان تعداد سلول و اثرات سایتوکسیته این ماده را نشان نمی‌دهد.

نمودار شماره ۲ تاثیر این ترکیبات را بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها نشان می دهد که نشان می‌دهد که با افزایش غلظت کلیه این ترکیبات تأثیر افزاینده‌ای در مهار بیان ماتریکس متالوپروتئینازها را نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری:

در این بررسی مشخص گردید که آلژنیک اسید در مقایسه با ترکیبات ضدالتهابی دگزامتازون، دیکلوفناک و پیروکسیکام فاقد اثرات سایتوکسیتوسیتی بوده و دارای اثرات ضدالتهابی مشابه این ترکیبات با اثر مهاری روی MMP می‌باشد.

ماتریکس متالوپروتئینازها در مقادیر اندک بیان شده و عمل تنظیم در سطح بیان ژن، ترشح و فعالیت آن صورت می گیرد و خانواده ای از آنزیمهای پروتئولیتیک بوده که توانایی تجزیه همگی ساختارهای شناخته شده در ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژنها، پروتئوگلیکانها و گلیکوپروتئینها را دارا میباشند (۸). در پاسخهای التهابی این ترکیبات به سرعت بیان می گردند (۹).

1- Low Viscosity Alginate

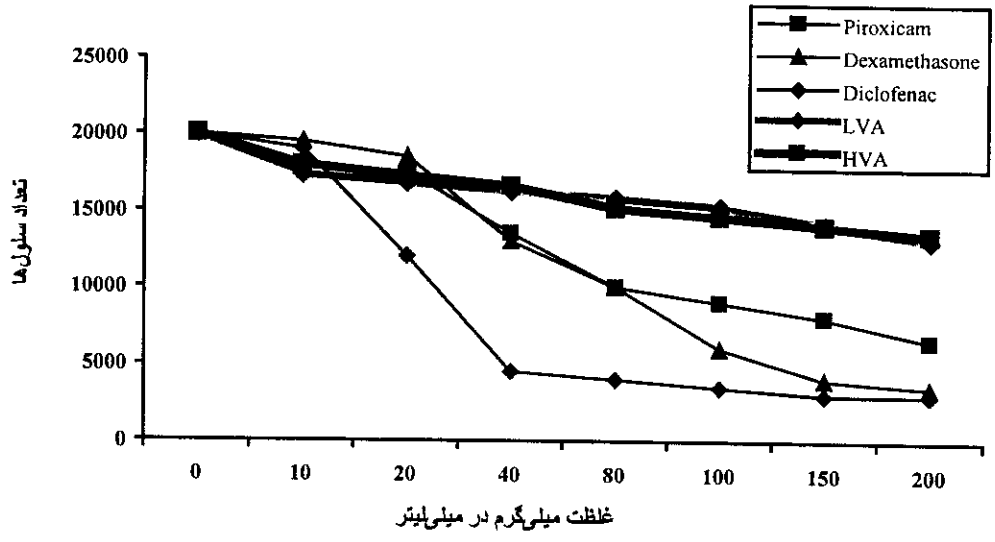
2- High Viscosity Alginate

www.SID.ir

کتابخانه منطقه‌ای علوم و تحقیقات شیراز

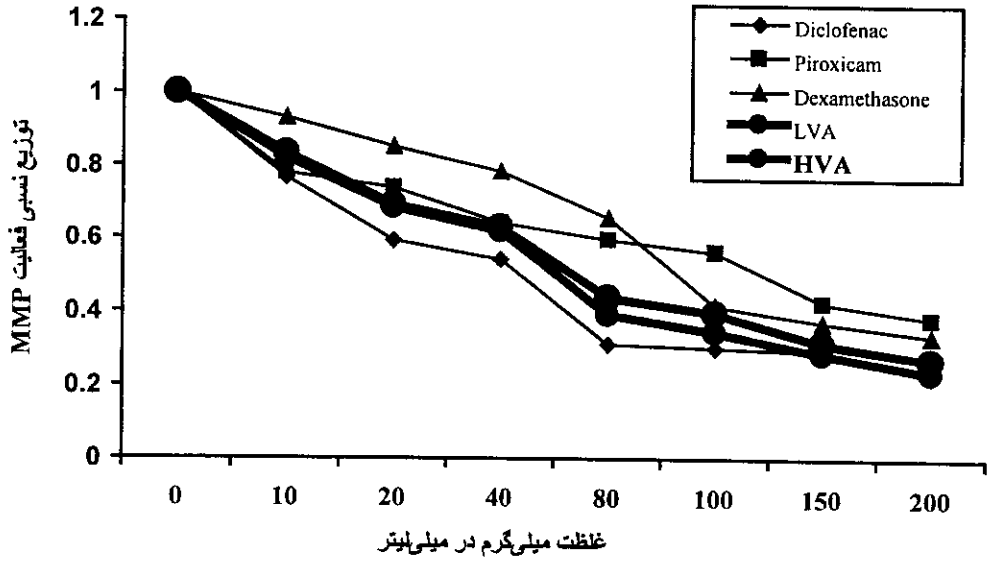
Archive of SID

نمودار شماره ۱ : اثرات سایتوتوکسیستی LVA و HVA بر روی سلولهای فیبروسارکوما



نمودار شماره ۱

نمودار شماره ۲ : تأثیرات LVA و HVA بر میزان MMP در سلولهای فیبروسارکوما



نمودار شماره ۲

www.SID.ir

Archive of SID

تولیدMMP در اکثر سلولها یک فرآیند دائمی است. لیکن در سلولهای سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها و نوتروفیلها به فرم ذخیره وجود داشته و تحت شرایط مختلف آزاد میگردد. لذا ممانعت کننده های طبیعی MMP در کنترل فرایند التهاب نقش بسزایی دارند (۹) و در شرایط پاتولوژیک نظیر بیماری آرتریت روماتوئید، بیماریهای قلبی عروقی و سایر بیماریهای التهابی تجزیه بیش از حد ماتریکس خارج سلولی موجب تخریب بافت می‌گردد و واکنشهای التهابی را تسریع می‌کند (۱۵و۱٤).

ترکیبات ضدالتهابی غیراستروئیدی به علت اثرات ضدالتهابی ضد تب و ضددرد در طب بالینی به وفور به کار می‌روند (۲٤ و ۲۳). استفاده از این ترکیبات موجب عوارض متعددی نظیر بروز اختلالات گوارشی تا ایجاد زخمهای وسیع در سیستم گوارشی می گردد (۱۹). اساس مولکولی اثرات ضدالتهابی این ترکیبات را به توانایی ممانعت از فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز نسبت می‌دهند (۲۰). که موجب وقفه در تولید پروستاگلاندین ها شده لیکن از سوی دیگر عملکرد محافظتی آنها را در سطوح مخاطات حذف می نماید. اکثر این ترکیبات ممانعت کننده هر دو ایزوفرم سیکلواکسیژناز می‌باشند (۲۰). هرچند که توان ممانعتی آنها با یکدیگر متفاوت است. از طرف دیگر کورتیکواستروئیدها ترکیبات ضدالتهابی قوی بوده که اثرات خود را با ممانعت از بیان عامل‌های نسخه برداری نظیر NF-KappaB و Ets-1 اعمال می نمایند (۲۱). بر مبنای یافته های موجود مشخص گردید که دیکلوفناک از توانایی بیشتری در جهت کاهش MMP برخوردار است ولی از سمیت بیشتری نسبت به آلژینات سدیم و پیروکسیکام و دگزامتازون برخوردار می باشد که در این بین دگزامتازون نیز به لحاظ اثرات سایتوتوکسیسیته مشابه پیروکسیکام رفتار نموده لیکن در مقادیر بالا تأثیر آن بر سلولها مشابه دیکلوفناک می باشد (نمودار شماره ۱). نقش دگزامتازون و پیروکسیکام در مقایسه با دیکلوفناک و آلژینات ضعیف تر بوده و تنها در مقایر بالا اثرات کاهندگی مناسبی از خود بروز می دهند. باتوجه به اثرات سمی کمتر آلژینات نسبت به سایر ترکیبات به کار رفته و تأثیرات نسبتاً قوی آن در دوزهای مشابه با ترکیبات ضدالتهابی در مهار MMP و با توجه به اینکه در بسیاری از شرایط پاتولوژیک و بیماریهای التهابی میزان بیان و عرضه ماتریکس متالوپروتئینازها افزایش می‌یابد با در نظر گرفتن یافته های فوق میتوان با تنظیم مقدار آلژینات مورد نیاز در جهت تعدیل بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها نسبت به تجویز دوز مناسب و تصحیح شرایط به منظور مهار التهاب با توجه به عدم سمیت آلژینات اقدام لازم به عمل آورد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

1. kulseng. B, Skjak-Braek G. TNF production from peripheral blood mononuclear cells in diabetic patiens after stimulation with alginate. Scand. J. Immunol 1996. Mari, 43(3): 335-40.
2. Mai GT, Seow WK, Pier GB. Suppression of lymphocyte and neutrophil funchon by pseudomonas aeruginosa mucoid exopoly sacharide (alginate). Infe Immun 1993 Feb; 61(2): 55-64.
3. Kulseng B. Skjak-Braek G- Pyan Li. Generation of antibodies against alginates. Transplantation 1999. AP. 15; 67(7) : 978-84.
4. Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494(1999)
5. Massova, I., Kotra LP , Fridman R , Mobashery S , Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 12, 1075–1095(1998)
6. Sanchez-Lopez, R. Alexander CM , Be*hrendtsen O , Breathnach R , Werb Z.* Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 7238–7247(1993)
7. Gross, J. and Lapiere, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 1014–1022(1962)
8. Lovejoy, B. Cleasby A , Hassell AM , Longley K , Luther MA , weigl D , McGeehan G , McElroy AB , Drewry D , Lambert MH , et al. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* 263, 375–377(1994)
9. Edwards, D.R. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int. J. Obes.* 20, S9–S15. (1996)
10. Tissue remodelling and cell growth. *Int. J. Obes.* 20, S9–S15. (1996)
11. Gomez, D.E. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regu-lation and biological function. *Eur. J. Cell Biol.* 74, 111–122. (1997)
12. Pilcher B. K ,Wang M , Oin XJ , Parks WC , Senior RM , Welgus HG .Role of MMPs & their inhibitors in cutaneous wound healing & contact hypersensitivity . *Ann NY Acad Sci* . 878 : 12-14 (1999)
13. Khoramizadeh M. R. .Aging differentially modulates the expression of collagen & collagenase in dermal fibroblasts . Mol Cell Biochem 94 :99-108 (1999)
14. Fidler, I.J. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (5th edn) (Devita, V.T. , eds), pp. 135–152, Lippincott–Raven (1997)
15. Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases and tumor invasion–from correlation and causality to the clinic. *Semin. Cancer Biol.* 7, 147–154(1996)
16. Jones, L. Ghaneh P , Humphreys M , Neoptolemos JP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Ann. New York Acad. Sci.* 880, 288–307(1999)
17. Drummond, A.H. Beckett P , Brown PD, Bone EA , Davidson AH , Galloway WA , Gearing AJ , Huxley P , Laber D , Mccourt M , Whittaker M , Wood LM , Wright A. Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *Ann. New York Acad. Sci.* 878, 228–235(1999)
18. Shalinsky, D.R. Brekken J , Zou H , McDermott CD , Forsyth P , Edwards D , Margosiak S , Bender S , Truitt G , Wood A , Varki NM , Appelt K , *et al.* Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Ann. New York Acad. Sci.* 878, 236–270(1999)
19. Heussen C , Dowdle EB . Electrophoretic analysis of plasminogen activator in polyacrylamide gels containing Sodium dodecyl sulfate and coplymerized substrates. *Analytical biochemistry.* 102, 196-202 (1980)
20. Wallare, J. L., Mechanism of non steroidal anti inflammatory drugs induced gastrointestinal damage. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* , 72 ,1493-1498 (1994)
21. Vane, J. R., Inhabition of Prostaglandin biosynthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature, New Biol.* 231, 232-235 (1997)
22. Eberhardt W., Schulze M., Glucorticoid-Mediated Suppresion of MMPs in Rat

www.SID.ir

Archive of SID

Mesangial cells. *Mol Endocrinol.* 16(8): 1752-1766 (2002)

23. Pross C, Farooq MM, Angle N , Lane JS , Cerveira JJ , Xavier AE , Freischlag JA , Law RE , Gelabert HA , *et al*: Dexamethasone inhibits vascular smooth muscle cell migration via modulation of matrix metalloproteinase activity. *J Surg Res* 102(2): 57-62 (2002.)

24. Sadowski T, Steinmeyer J: Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and Dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase –1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis C ,* artilage 9(5): 407-415 (2001).

www.SID.ir