Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۵، شماره ۱ و ۲، پائیز و زمستان ۱۳۸۲

اثر سایتوتوکسیسیتی و بازدارندگی پیروکسیکام بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در مقایسه با دیکلوفناک و دگزامتازون

علی خدادادی[1*](M.Sc)، فرشید سعادت[1](Ph.D)، محمدرضا خرمی‌زاده[1](Ph.D)، عباس میرشفیعی[1](Ph.D)، خدیجه حکمت[2](M.Sc)

۱- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه پاتوبیولوژی

۲- دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشکده پرستاری و مامایی، گروه مامائی

چکیده

سابقه و هدف: نظر به نقش ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) در فیزیوپاتولوژی بسیاری از بیماری‌های التهابی نظیر آرتریت روماتوئید و انواع بدخیمی‌ها، در این مطالعه تأثیر پیروکسیکام در مقایسه با سایر ترکیبات ضدالتهابی استروئیدی و غیراستروئیدی بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از روش زایموگرافی و سایتوتوکسیسیته سلولی بهره گرفته شد؛ به میزان ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ترکیبات دگزامتازون، دیکلوفناک و پیروکسیکام به محیط کشت سلول‌های فیبروسارکوما (Wehi 164)، با توجه به توانایی این سلول‌ها در تولید میزان بالای آنزیم MMPs اضافه شد.

یافته‌ها: براساس یافته‌های این تحقیق مشخص گردید که کلیه این ترکیبات توانائی کاهش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها را دارا می‌باشند. از طرفی با بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته سلولی دو دسته ترکیبات استروئیدی و ضدالتهابی غیراستروئیدی (دگزامتازون، دیکلوفناک و پیروکسیکام) مشخص گردید که پیروکسیکام سمیت به مراتب کمتری نسبت به دیکلوفناک دارا می‌باشد؛ به طوری که مقایسه حداقل مقدار داروی لازم برای کشتن پنجاه درصد سلول‌ها، برای دیکلوفناک حدود بیست میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای دگزامتازون و پیروکسیکام حدود هشتاد میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. این در حالی است که دیکلوفناک در مقادیر بالاتر از سمیت بیشتری نسبت به دو ترکیب دیگر برخوردار است؛ به طوری که اثرات ناخواسته فراوانی نظیر جلوگیری از پرولیفراسیون سلولی و مرگ آن را موجب می‌گردد. از طرفی مقادیر بالای دگزامتازون و پیروکسیکام سمیت به مراتب کمتری را نشان داده‌اند. همچنین بر مبنای یافته‌های مذکور سایتوتوکسیسیته این ترکیبات با کاهش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن یافته‌های فوق می‌توان با تنظیم مقدار داروی مورد نیاز در جهت تعدیل بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها نسبت به تجویز دوز مناسب و تصحیح شرایط اقدام نمود.

واژگان کلیدی: ماتریکس متالوپروتئینازها، دیکلوفناک، دگزامتازون، سایتوتوکسیسیته، پیروکسیکام.

مقدمه

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک بوده که توانایی تجزیه اکثر ساختارهای شناخته شده در ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌ها را دارا می‌باشند [۱۲،۱۳]. ژن‌های مختلفی در بیان آنها نقش داشته لیکن محصولات پروتئینی آنها براساس خصایص ساختاری و عملکردی تقسیم‌بندی می‌گردند. همه ماتریکس متالوپروتئینازها دارای یک بخش پلی‌پپتیدی ابتدایی بوده که پس از حذف آن فعال می‌گردند؛ در واقع بخش مذکور به‌عنوان یک ممانعت کننده

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۰۹۶۱، نمابر: ۰۶۱۱-۳۳۳۵۲۰۰، E-mail: Alkhodadadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

درونی عمل نموده و در اثر شکسته شدن، با تغییر ساختار فضایی موجب فعال شدن آنزیم می‌گردد. ساده‌ترین ماتریکس متالوپروتئیناز، نوع هفت آن می‌باشد که تنها دارای یک دومن کاتالیتیک است؛ بقیه انواع ماتریکس متالوپروتئینازها دارای یک دومن هموپکسین می‌باشند که توانایی واکنش با سایر سوبستراها و ممانعت کننده‌های طبیعی را دارا می‌باشند [۶،۱۷].

به‌طور کلی ماتریکس متالوپروتئینازها در مقادیر اندک بیان شده و عمل تنظیم در سطح بیان، ترشح و فعالیت آنها صورت می‌گیرد. در شرایط نوسازی بافت این ترکیبات به سرعت بیان می‌گردند. تولید و ترشح ماتریکس متالوپروتئینازها در اکثر سلول‌ها یک فرایند دائمی است لیکن در سلول‌های سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به فرم ذخیره وجود داشته و تحت شرایط مختلف آزاد می‌گردند [۱۱].

فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها به صورت خارج سلولی نیز تنظیم می‌گردد. ممانعت‌کننده‌های طبیعی ماتریکس متالوپروتئینازها نیز در کنترل فرایند التهاب نقش به سزایی دارند [۳،۵]. بدین ترتیب در شرایط فیزیولوژیک نظیر ترمیم زخم [۱۴] و پیری [۹] تجزیه و فعال شدن ماتریکس متالوپروتئینازها تحت کنترل ممانعت کننده‌های اندوژن بوده لیکن در بسیاری از شرایط پاتولوژیک نظیر روماتوئید آرتریتیس، استئوآرتریت، بیماری‌های قلبی و عروقی، اولسراسیون، آمفیزم، سرطان و متاستازها [۱۹،۴] تجزیه بیش از حد ماتریکس خارج سلولی، موجب تخریب بافت می‌گردد و واکنش‌های التهابی را تسریع می‌نماید [۸،۱،۱۸].

از آنجا که ترکیبات غیراستروئیدی و استروئیدی به طور روزمره در درمان بیماری‌های التهابی به کار می‌روند؛ در این مطالعه تلاش شده است که با بهره‌گیری از تکنیک‌های زایموگرافی و کشت سلولی فعالیت تجزیه کنندگی ژلاتینازها به‌وسیله ترکیبات ضدالتهابی غیراستروئیدی شامل دیکلوفناک و پیروکسیکام و یک ترکیب استروئیدی یعنی دگزامتازون مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول. سلول لاین Wehi 164 به تعداد بیست هزار سلول در هر چاهک در پلیت نود و شش خانه‌ای در محیط RPMI 1640 با پنج درصد سرم؛ پنی‌سیلین صد میکرویونیت در میلی‌لیتر و استرپتومایسین صدمیکروگرم در میلی‌لیتر تحت شرایط پنج درصد دی اکسید کربن در دمای سی و هفت درجه سانتی‌گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند.

آنالیز پاسخ به دوز. رقت‌های سریال از ده تا دویست میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون، پیروکسیکام و دیکلوفناک به صورت سه‌تایی به کشت سلول‌ها اضافه شد. پس از بیست و چهار ساعت انکوباسیون، سلول‌ها مورد رنگ‌سنجی قرار گرفتند. جهت انجام تست زایموگرافی از محیط کشت سلول‌ها نمونه‌برداری شد.

رنگ‌سنجی. پس از هر آزمایش سلول‌ها با بافر سالین فسفات سرد شسته و با محلول فرمالدئید پنج درصد ثابت شدند. سلول‌های تثبیت شده سه بار شسته شده و با کریستال ویوله یک درصد رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستن، به سلول‌های رنگ شده محلول اسیداستیک سی و سه درصد اضافه گردید. رنگ ارغوانی حاصل در پانصد و هشتاد نانومتر خوانده شد.

زایموگرافی. تکنیک Heussen & Dowdle که برای تشخیص ژلاتیناز (کلاژناز چهار یا MMP2) و MMP9 در محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد با پاره‌ای تغییرات انجام پذیرفت [۷]. نمونه‌ها در ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر ژلاتین در حضور سدیم دو دسیل سولفات تحت شرایط غیرکاهنده به مدت سه ساعت در ولتاژ هشتاد ولت الکتروفورز شدند؛ سپس ژل با Triiton × 100 با غلظت دو و نیم درصد جهت حذف سدیم دو دسیل سولفات شسته شد. ژل حاصل به مدت یک شب در سی و هفت درجه سانتی‌گراد در درون محلول حاوی 0.1M تریس‌هیدروکلراید و 100mM کلسیم کلراید نگهداری و سرانجام با کوماسی‌بلو 0.05% رنگ‌آمیزی گردید. پس از رنگ‌بری، مناطق دچار پروتئولیز در زمینه اصلی مشخص گردیدند. ارزیابی کمی از

www.SID.ir

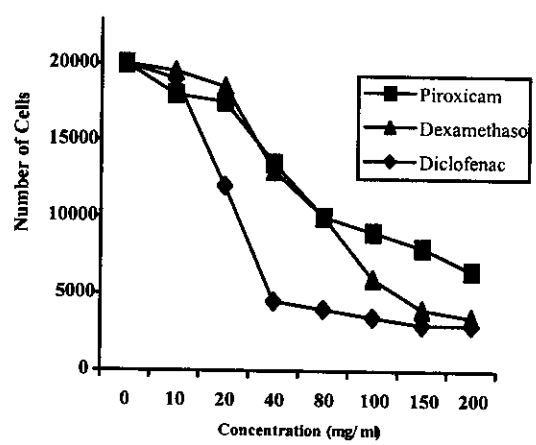
Archive of SID

طریق محاسبه چگالی سطح به وسیله نرم‌افزار رایانه‌ای Labwork امکان‌پذیر گشت که درنهایت فعالیت آنزیم به صورت نسبی بیان شد.

آنالیزهای آماری. تفاوت در رشد سلول‌ها و فعالیت ژلاتیناز به روش تست t-student مورد بررسی قرار گرفت و $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

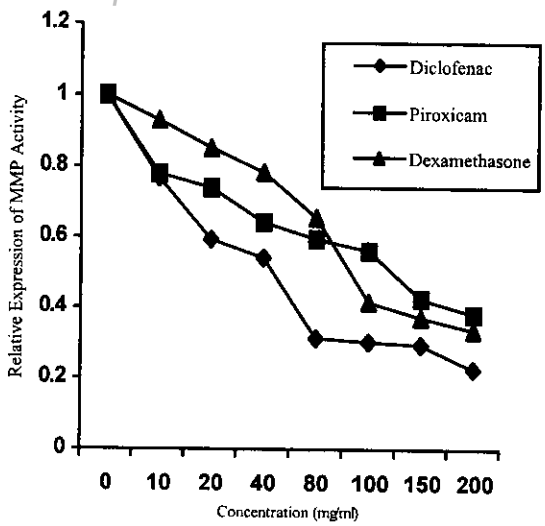
اثرات سایتوتوکسیک دو ترکیب ضدالتهاب غیراستروئیدی شامل دیکلوفناک و پیروکسیکام و یک ترکیب استروئیدی یعنی دگزامتازون در غلظت‌های مختلف از ده تا دویست میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های فیبروسارکوما در نمودار ۱ نشان داده شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود کلیه این ترکیبات با افزایش غلظت، اثرات سایتوتوکسیک شدیدتری را اعمال می‌نماید. دیکلوفناک این اثر را از غلظت بیست میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد، در صورتی که پیروکسیکام و دگزامتازون اثرات خفیف‌تری را اعمال می‌نمایند.



نمودار ۱. اثرات سایتوتوکسیسیتی پیروکسیکام بر روی سلول‌های فیبروسارکوما

تأثیر این ترکیبات بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در نمودار ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌گردد که با افزایش غلظت، کلیه این ترکیبات تأثیر بیشتری در مهار بیان ماتریکس متالوپروتئینازها دارا می‌باشند.

www.SID.ir



نمودار ۲. اثرات پیروکسیکام بر میزان MMP2 در سلول‌های فیبروسارکوما

بحث و نتیجه‌گیری

در بسیاری از شرایط پاتولوژیک و بیماری‌های التهابی میزان بیان و عرضه ماتریکس متالوپروتئینازها افزایش می‌یابد؛ لذا ترکیبات ممانعت کننده آنها می‌توانند نقش مؤثری را در فرایند بهبود و درمان ایفا نمایند. ترکیبات ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) به علت اثرات ضدالتهابی ضدتب و ضددرد در طب بالینی به وفور تجویز می‌گردند. استفاده از این ترکیبات موجب عوارض متعددی نظیر بروز اختلالات گوارشی تا ایجاد زخم‌های وسیع در سیستم گوارشی می‌گردد [۱۰]. اساس مولکولی اثرات ضدالتهابی این ترکیبات را به توانایی ممانعت از فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز نسبت می‌دهند که موجب وقفه در تولید پروستاگلاندین‌ها شده لیکن از سوی دیگر عملکرد محافظتی آنها را در سطوح مخاطات حذف می‌نماید. اکثر این ترکیبات، ممانعت کننده هر دو ایزوفرم سیکلواکسیژناز می‌باشند هرچند که توان ممانعتی آنها با یکدیگر بسیار متفاوت است [۲۰]. از طرف دیگر کورتیکواستروئیدها ترکیبات ضدالتهابی قوی بوده که اثرات خود را با ممانعت از بیان فاکتورهای نسخه‌برداری نظیر NF-KappaB و Ets-1 اعمال می‌نمایند [۲]. برمبنای یافته‌های موجود مشخص گردید که میزان سمیت پیروکسیکام به مراتب

Archive of SID

از دیکلوفناک کمتر بوده و در مقادیر پائین اثرات مهاری آن بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها مشابه دیکلوفناک می‌باشد. دگزامتازون نیز در مقادیر اندک به لحاظ اثرات سایتوتوکسیسیته مشابه پیروکسیکام رفتار می‌نماید لیکن اثرات مهاری ضعیف‌تری در قیاس با پیروکسیکام بر ماتریکس متالوپروتئینازها دارا می‌باشند. دیکلوفناک در مقادیر بالا دارای سمیت فوق‌العاده زیادی بوده لیکن در مقام مقایسه با دو داروی دیگر (پیروکسیکام و دگزامتازون) در جهت کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئینازها از قدرت بیشتری برخوردار است. نقش متالوپروتئینازها به نسبت دو ترکیب دیگر ضعیف‌تر بوده و تنها در مقادیر بالا اثرات کاهندگی مناسبی را از خود بروز می‌دهد به‌طوری که این یافته‌ها با داده‌های حاصل از تحقیقات سایر محققین مطابقت توانایی دارد [۲،۱۶،۱۵]. با در نظر گرفتن یافته‌های فوق می‌توان با انجام تست‌های بیشتر به منظور تنظیم مقدار داروی مورد نیاز در جهت تعدیل بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها نسبت به تجویز دوز مناسب و تصحیح شرایط اقدام نمود.

منابع

[1] Drummond AH, Beckett P, Brown PD, Bone EA, Davidson AH, Galloway WA, et al. Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. Ann N Y Acad Sci, 1999; 878: 228-35.

[2] Eberhardt W, Schulze M, Glucorticoid-Mediated suppresion of MMPs in Rat mesangial cells. Mol Endocrinol, 2002; 16: 1752-66.

[3] Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, et al. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. Int J Obes 1996; 20: S9-S15.

[4] Fidler IJ, Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: Devita VT. editor. Cancer Principles and Practice of Oncology. 5th ed, Lippincott-Raven; 1997. p. 135-152.

[5] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, regulation and biological function. Eur J Cell Biol, 1997; 74(2): 111-22.

[6] Gross J, Lapiere CM, Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1962; 48: 1014-22.

[7] Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activator in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry, 1980; 102(1): 196-202.

[8] Jones L, Ghaneh P, Humphreys M, Neoptolemos JP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. Ann N Y Acad Sci, 1999; 880: 288-307.

[9] Khorramizadeh MR, Tredget EE, Telasky C, Shen Q, Ghahary A. Aging differentially modulates the expression of collagen & collagenase in dermal fibroblasts. Mol Cell Biochem, 1999; 94(1-2): 99-108.

[10] Lare JL, Mechanism of non steroidal anti-inflammatory drugs induced gastrointestinal damage. Can J Physiol Pharmacol, 1994; 72: 1493-8.

[11] Lovejoy B, Cleasby A, Hassell AM, Longley K, Luther MA, Weigl D, et al. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. Science, 1994; 263(5145): 375-7.

[12] Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. FASEB J, 1998; 12(12): 1075-95.

[13] Nagase H, Woessner JF, Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, 1999; 274: 21491-4.

[14] Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM, Welgus HG. Role of MMPs & their inhibitors in cutaneous wound healing & contact hypersensitivity. Ann NY Acad Sci, 1999; 878: 12-14.

[15] Pross C, Farooq MM, Angle N, Lane JS, Cerveira JJ, Xavier AE, et al. Dexamethasone inhibits vascular smooth muscle cell migration via modulation of matrix metalloproteinase activity. J Surg Res, 2002; 102(2): 57-62.

[16] Sadowski T, Steinmeyer J, Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and Dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-l, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 2001; 9: 407-15.

[17] Sanchez-Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen 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, 1993; 268(10): 7238-47.

www.SID.ir

Archive of SID

[18] Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, McDermott CD, Forsyth P, Edwards D, et al. Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. Ann N Y Acad Sci, 1999; 878: 236-70.

[19] Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion from correlation and causality to the clinic. Semin Cancer Biol, 1996; 7(3): 147-54.

[20] Vane JR, Inhabition of prostaglandin biosynthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature New Biol, 1997; 231: 232-5.

www.SID.ir