

اثر داروی تالیدومید بر بیان پروتئین MMP-2 و ماست سل‌ها در فیروز ریوی القا شده توسط بلئومایسین در موش

غزل کشاورز^۱، محمد جعفر رضایی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران.

۲- دانشیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۷

چکیده

زمینه و هدف

ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-2) از خانواده آنزیم‌های پروتئولیتیک کننده هستند که در تخریب ماتریکس خارج سلولی و تجزیه غشای پایه نقش دارند. ماست سل‌ها در بیماری‌های التهابی از جمله فیروز ریوی نقش مهمی ایفا کرده و می‌توانند به عنوان منشأ پروتئین‌های ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در نظر گرفته شوند. هدف از این تحقیق بررسی اثر داروی تالیدومید بر بیان پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ و جمعیت ماست سل‌ها در فیروز ریوی القا شده به وسیله بلئومایسین در موش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۳۲ موش نر بالغ با نژاد C57BL/6 بطور تصادفی به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند: موش‌ها در گروه اول سولفات بلئومایسین (Bleomycin)، در گروه دوم علاوه بر بلئومایسین تالیدومید (Bleomycin + Thalidomide)، در گروه سوم تالیدومید (Thalidomide) و در گروه چهارم کربوکسی متیل سلولز (Carboxy Methyl Cellulose) را بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از اتمام دوره، نمونه‌های ریوی از موش بدست آمد و مطالعات هیستولوژیکی و ایمنوهیستوشیمی روی آنها انجام شد. بعد از بررسی لام‌های بافتی تعداد سلول‌های بیان کننده پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ و ماست سل‌ها بدست آمد و نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری One Way-ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

مطالعات هیستولوژیکی و ایمنوهیستوشیمیایی افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های بیان کننده ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ و ماست سل‌ها را در گروه Bleomycin نسبت به گروه Carboxy Methyl Cellulose نشان داد ($P < 0.001$). اما تعداد این سلول‌ها در گروه Bleomycin + Thalidomide کاهش معنی‌داری نسبت به گروه Bleomycin نشان داد ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری

تالیدومید تعداد سلول‌های بیان کننده پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ و ماست سل‌ها را کم و متعاقب آن فیروز ریوی را کاهش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها

تالیدومید، فیروز ریوی، ماتریکس متالوپروتئیناز-۲، ماست سل

* نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی کردستان، گروه آناتومی.

پست الکترونیک: Rezaiejafar@gmail.com

■ مقدمه

فیبروز ریوی بیماری خطرناکی است که در اثر آسیب سلول‌های آلوئولار ریوی بوجود آمده و نشانگر مراحل ترمیم نامناسب بافت‌ها می‌باشد. منشأ آسیب نامشخص است و ممکن است به علت چندین مسیر و مکانیسم باشد که همه آنها به فزونی و پیشرفت اسکار ریه ختم می‌شوند. مشکل بزرگی که در مراکز تحقیقاتی و کلینیکی در ارتباط با این بیماری وجود دارد تأخیر در بروز علائم بیماری است و زمانی مشخص می‌شود که کمتر از ۵۰ درصد حجم ریه باقی مانده است. متأسفانه در این مرحله بیماری غیرقابل درمان بوده و احتمال بهبودی ضعیفی دارد.

در مطالعات پاتولوژی معمولاً درجه پایینی از التهاب ریه وجود دارد و با توجه به وجود سلول‌های التهابی در بافت ریه، مباحثی در رابطه با نقش این سلول‌ها در پیشرفت بیماری وجود دارد، اما برخی مطالعات بر روی نمونه‌های انسانی نشان داده است که داروهای ضد التهاب مانند کورتیکواستروئیدها و آزیتوپرین درمان موثری برای فیبروز نبوده است. بنابراین علاوه بر نقش التهاب، این تئوری مطرح است که فیبروز ریه ممکن است ناشی از ترمیم غیرطبیعی و آسیب مزمن سلول‌های اپیتلیال آلوئولار باشد^(۱،۲).

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده بزرگی از آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که نقش مهمی در تجزیه و تخریب ماتریکس خارج سلولی و ایجاد فیبروز بر عهده دارند^(۳). در فیبروز ریوی فعالیت MMPها به وسیله عوامل متعددی از جمله فاکتور رشد تنظیم می‌شود و ممکن است واسطه‌های التهابی نقش مهمی در تعدیل صدمات بافت ریه و تخریب ماتریکس خارج سلولی ایفا کنند. MMPها از منابع مختلفی از جمله فیبروبلاست‌ها، ماکروفاژها و ماست‌سل‌ها تولید می‌شوند^(۴).

از میان این خانواده بزرگ، MMP-2 که در ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها یافت شده است، توانایی زیادی در تجزیه طیف وسیعی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن نوع چهار، غشای پایه، فیبرونکتین و ژلاتین دارد^(۵،۶).

عملکرد چندگانه ماست‌سل‌ها از طریق آزاد شدن واسطه‌ها بستگی به روابط متقابل آن‌ها با مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی در داخل بافت همبند دارد. مطالعات مختلف نقش ذاتی ماست‌سل‌ها را در متعادل کردن تجزیه ماتریکس خارج سلولی از طریق فعال کردن تولیدات MMPها مشخص نموده است^(۷). نشان داده شده است که آنزیم‌های ماست‌سل در فعالیت MMP-2 نقش داشته، باعث تجزیه ترکیبات غشای پایه می‌شود^(۸).

ماست‌سل‌ها بطور اختصاصی در ارتباط نزدیک با عروق خونی، در میان بافت همبند و سلول‌های اپیتلیال قرار می‌گیرند. بنابراین بعد از دگرانوله شدن، توانایی نفوذ سریع به بافت‌های اطراف خود را دارند^(۹). با توجه به تحریک شدن ماست‌سل‌ها در شرایط غیرطبیعی و مهاجرت آنها به محل ضایعه، امکان دارد داروهای متفاوت با مکانیسم متفاوت در پیشگیری از مهاجرت این سلول‌ها و کاهش تعداد آنها موثر باشد. تالیدومید در اوایل سال ۱۹۵۴ به عنوان داروی خواب‌آور و آرام‌بخش معرفی شد، اما به علت اثرات تراتوژنیک

آن از بازار برداشته شد. بعدها پی بردند که این دارو کاربرد زیادی در بیماری‌های مختلف از جمله کاستلمن^(۱۰)، کرون^(۱۱)، ایدز^(۱۲) و بیماری میلودیسپلاستیک^(۱۳) دارد و خواص بی‌نظیر آن مانند خاصیت ضدالتهاب^(۱۴)، ضد رگ‌زایی^(۱۵) و تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی^(۱۶-۱۸) گزارش شده است. این دارو دارای خاصیت آنژیواستاتیک می‌باشد و باعث مرگ وسیع سلول‌های آندوتلیال و آسیب عملکرد عروقی و ایجاد تجمع رگی می‌شود^(۱۹). همچنین گزارش داده‌اند که تالیدومید تولیدات فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) و اینترلوکین-۶ (IL-6) را که نقش مهمی در فیبروز ریه ایفا می‌کند، از ماکروفاژهای آلوئولار در فیبروز ریه کم می‌کند^(۲۰).

با توجه به اینکه در مورد اثر داروهای ضد التهاب بر روی مهار و یا درمان روند فیبروزیس در بین محققین اتفاق نظر وجود ندارد^(۲۱-۲۳)، در مطالعه حاضر برای تحقیق بیشتر، اثر داروی تالیدومید روی بیان پروتئین MMP-2 و ماست‌سل‌ها در فیبروز ریوی القا شده به وسیله بلئومایسین بررسی شده است. لازم به ذکر است که این سلول‌ها نقش موثری در فیبروز ریوی دارند.

■ مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های نر بالغ C57BL/6 با وزن تقریبی ۲۰ تا ۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها از مرکز انستیتو پاستور تهران خریداری شده و جهت رعایت موازین اخلاقی از مراجع ذیربط مجوز کار با حیوانات گرفته شد. نمونه‌ها به مدت دو هفته در لانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کردستان نگهداری شدند تا با محیط سازگار شوند و طی این مدت سعی شد محیط مناسب از قبیل دما، روشنایی و رطوبت کافی فراهم شده و آب و غذای کافی در اختیار آنها قرار داده شود.

در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۲ موش نر بالغ ۶ تا ۸ هفته با نژاد C57BL/6 در محدوده وزنی ۲۰ تا ۲۵ گرم تهیه شده و بصورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. گروه اول (Bleo): حدود ۲ میلی گرم سولفات بلئومایسین (Nipponkayako, Japan) حل شده در ۰/۱ میلی لیتر کربوکسی متیل سلولز (CMC, Sigma, USA) نیم درصد به روش داخل صفاقی در روزهای ۱، ۸ و ۱۵ تزریق شد. گروه دوم (Bleo + Thal): به موش‌ها علاوه بر داروی بلئومایسین، ۴ میلی گرم تالیدومید (Sigma, USA) حل شده در ۰/۱ میلی لیتر CMC نیم درصد به روش داخل صفاقی ۵ بار در هفته و به مدت ۴ هفته تزریق شد. گروه سوم (Thal): موش‌ها ۴ میلی گرم تالیدومید حل شده در ۰/۱ میلی لیتر CMC نیم درصد به روش داخل صفاقی ۵ بار در هفته و به مدت ۴ هفته دریافت کردند. گروه چهارم (CMC): موش‌ها فقط ۰/۱ میلی لیتر کربوکسی متیل سلولز نیم درصد به روش داخل صفاقی ۵ بار در هفته و به مدت چهار هفته دریافت کردند^(۲۱،۲۴). پس از اتمام دوره آزمایش، حیوانات با دوز بالای ماده القای بیهوشی کشته شدند. قفسه سینه آنها باز و ریه‌ها خارج شد و پس از شستشو با محلول PBS، جهت مطالعات بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و

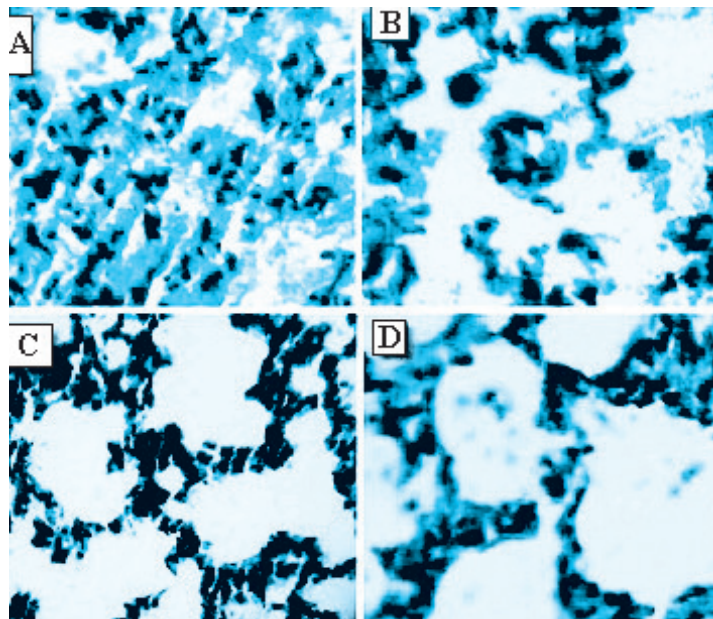
(Abcam, England) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس شستشو صورت گرفت و آنتی بادی ثانویه ضد آنتی بادی موشی (Abcam, England) اضافه شد. پس از شستشو، نمونه‌ها در محلول دی‌آمینوبنزیدين انکوبه شدند و رنگ‌آمیزی مخالف با همتوکسیلین صورت گرفت. سلول‌های بیان کننده پروتئین MMP-2 که سیتوپلاسم قهوه‌ای داشتند در چهار گروه مورد مطالعه و در ده فیلد در واحد حجم (۶۱/۲۵ میکرومتر مکعب) شمارش شدند. جهت مطالعات مورفومتریک، از میکروسکوپ نوری (CarlZeiss, West Germany) با بزرگنمایی ۴۰ استفاده شد.

■ یافته‌ها

نتایج کیفی هیستولوژیکی حاصل از رنگ‌آمیزی همتوکسیلین اتوزین بافت ریه نشان داد که در گروه Bleo (تصویر ۱- A) بهم خوردن ساختار آلئول‌های ریوی، افزایش ضخامت دیواره‌ی آلئول‌ها و ارتشاح سلول‌های التهابی به داخل فضاها‌ی آلئولی وجود دارد. در گروه Bleo + Thal (تصویر ۱- B) تغییرات تخریبی کمتر شده و ارتشاح سلول‌های التهابی به داخل فضاها‌ی آلئولی کمتر دیده شد.

مراحل آماده‌سازی که شامل آبگیری، شفاف‌سازی، اینفیلتراسیون و قالب‌گیری بود به عمل آمد و برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون روی لام تهیه شد. سپس رنگ‌آمیزی‌های همتوکسیلین اتوزین، گیمسا و ایمونوهیستوشیمیایی جهت بررسی تغییرات هیستولوژیکی بافت ریه، بررسی جمعیت ماست‌سل‌ها و بیان پروتئین MMP-2 انجام شد. ماست‌سل‌ها که سلول‌هایی متراکم و به رنگ آبی تیره بودند در گروه‌های مختلف در ده برش در واحد حجم (۶۱/۲۵ میکرومتر مکعب) با استفاده از گراتیکول صفحه شطرنجی مدل kpl-w12.5×/18 شمارش شده و نتایج بدست آمده وارد نرم‌افزار SPSS v.20 شده و به کمک آزمون آماری One Way-ANOVA و آزمون Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

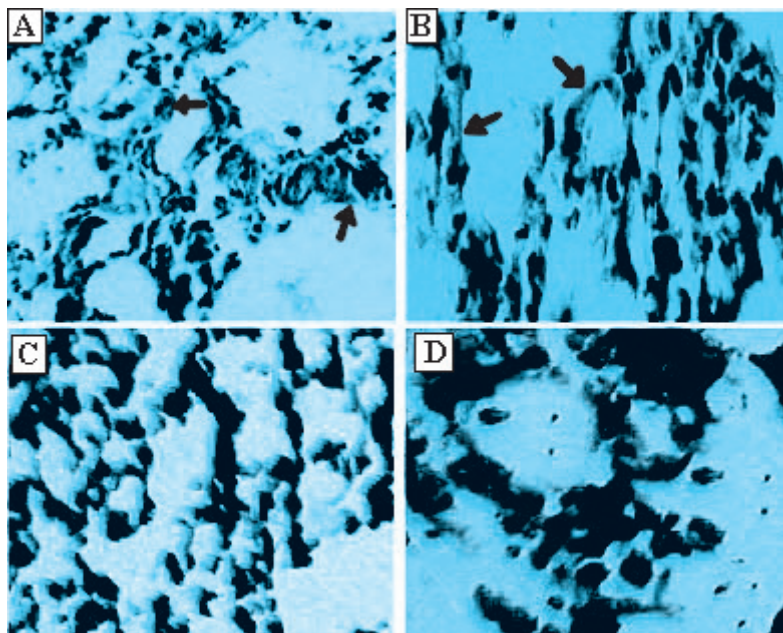
برای انجام تکنیک ایمونوهیستوشیمیایی مقاطع بافتی روی لام‌های باردار قرار داده شد و بعد از قرار دادن آنها در فور ۶۰ درجه، در سه مرحله پارافین‌زدایی و آبدهی شدند. برای بازیابی آنتی‌ژن از بافر سیترات و برای توقف فعالیت پراکسیداز داخلی از آب اکسیژنه ۳ درصد استفاده شد. با استفاده از محلول سرم آلبومین گاوی، پروتئین‌های اضافی خنثی شده و نمونه‌ها به مدت یک شب با آنتی بادی اولیه اختصاصی ضد MMP-2 (6E3F8)



تصویر شماره ۱- تغییرات هیستولوژیکی مقاطع بافت ریه با رنگ‌آمیزی همتوکسیلین اتوزین در گروه‌های مورد مطالعه با بزرگنمایی واقعی ۴۰. در این تصاویر A گروه Bleo، B گروه Bleo+ Thal، C گروه Thal و D گروه CMC می‌باشد.

و سلول‌هایی بودند که سیتوپلاسم قهوه‌ای داشتند. اما این سلول‌ها در گروه‌های دیگر کمتر دیده شدند.

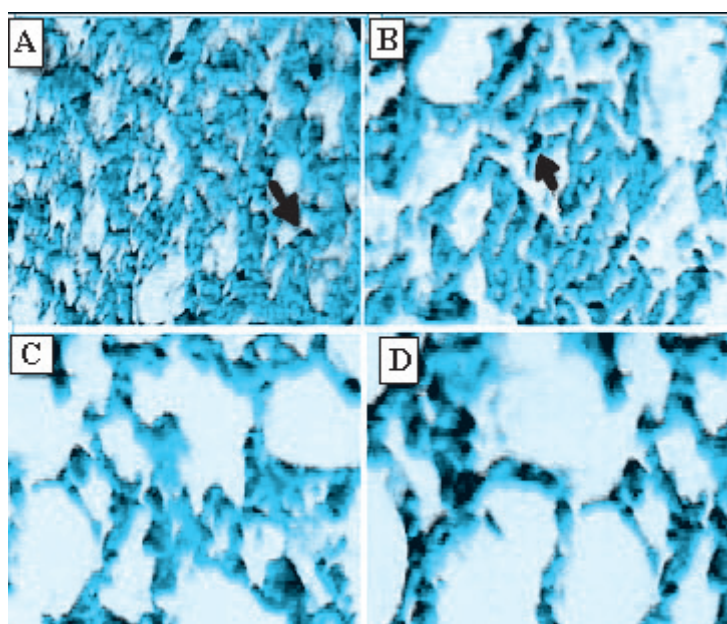
نتایج کیفی حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی سلول‌های بیان کننده MMP-2 نشان داد که این سلول‌ها در گروه Bleo (تصویر ۲- A) در تیغه‌های آلئولی و اپیتلیوم آلئول‌ها وجود داشته



تصویر شماره ۲- تکنیک ایمنوهیستوشیمیایی برای نشان دادن سلول‌های بیان کننده پروتئین MMP-2 در مقاطع بافتی ریه در گروه‌های مورد مطالعه با بزرگنمایی واقعی ۴۰.

کربوکسی‌متیل سلولز مشاهده نشد (C و D). در گروه Thal (تصویر ۱-C) و گروه CMC (تصویر ۱-D) تغییرات قابل ملاحظه‌ای دیده نشد، آلوئول‌ها منظم بوده و آثاری از ضخیم شدگی تیغه‌های آلوئولی دیده نشد. نتایج کیفی حاصل از رنگ‌آمیزی گیمسا نشان داد که جمعیت ماست سل‌ها در گروه Bleo (تصویر ۳-A) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بوده و بیشتر آنها در حال دگرانولاسیون بودند.

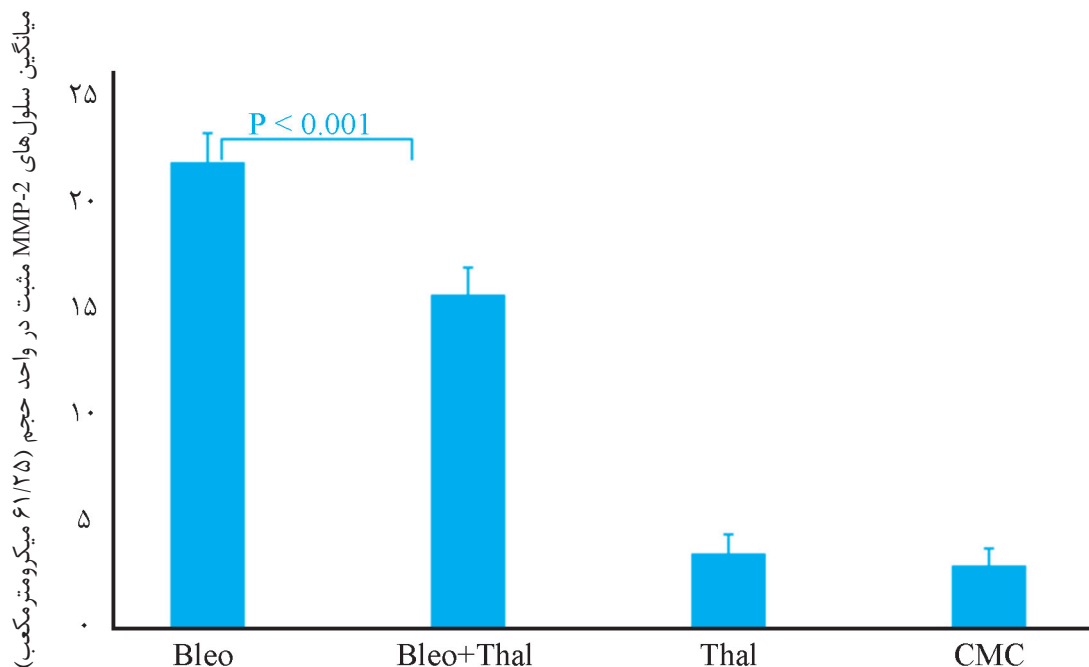
در تصویر فوق A گروه Bleo، B گروه Bleo+ Thal، C گروه Thal و D گروه CMC می‌باشد. سلول‌های اپیتلیوم انتهایی و ماکروفاژهای بیان کننده این پروتئین با فلش نشان داده شده است (A) و ماده زمینه‌ای ماتریکس خارج سلولی که بیان پروتئین MMP-2 در آن مشاهده می‌شود (B)، در گروه‌های Thal و CMC که به ترتیب تالیدومید و کربوکسی‌متیل سلولز را دریافت کردند، شواهدی از سلول‌های بیان کننده MMP-2 بعد از ۲۸ روز از اولین تزریق



تصویر شماره ۳- رنگ آمیزی گیمسا برای نشان دادن ماست سل‌ها در گروه‌های مورد مطالعه با بزرگنمایی واقعی ۴۰. در این تصاویر A گروه Bleo، B گروه Bleo + Thal، C گروه Thal و D گروه CMC می‌باشد. فلش‌ها در تصاویر A و B نشان دهنده ماست سل‌ها هستند.

Bleo + Thal (۲۲/۱۴ ± ۱/۳۴) بطور معنی‌داری بیشتر از گروه Bleo (۱۵/۸۵ ± ۱/۳۴) بودند ($P < ۰/۰۰۱$) (نمودار شماره ۱).

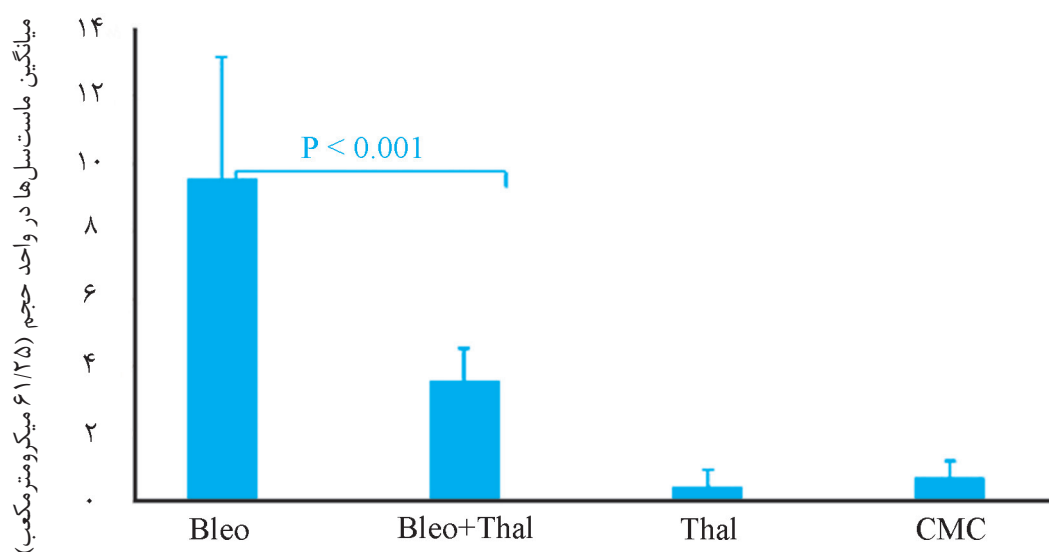
نتایج کمی حاصل از شمارش سلول‌های MMP-2 مثبت در گروه‌های مورد آزمایش نشان داد که تعداد سلول‌های MMP-2 در گروه Bleo



نمودار شماره ۱- میانگین سلول‌های MMP-2 مثبت در واحد حجم در گروه‌های مورد مطالعه. گروه اول (Bleo) فقط سولفات بلئومایسین، گروه دوم (Bleo + Thal) علاوه بر بلئومایسین تالیدومید، گروه سوم (Thal) فقط تالیدومید و گروه چهارم (CMC) فقط کربوکسی متیل سلولز را بصورت داخل صفاقی دریافت کردند.

آماري نشان داد که تعداد سلول‌های ماست سل در گروه Bleo (۹/۵۷ ± ۳/۵۹) بطور معنی‌داری بیشتر از گروه Bleo + Thal (۳/۵۷ ± ۰/۹۷) می‌باشد ($P < ۰/۰۰۱$).

نتایج کمی حاصل از شمارش سلول‌های ماست سل در رنگ‌آمیزی گیمسا وارد نرم افزار SPSS شده و میانگین، انحراف معیار و P-value داده‌ها مطابق نمودار ۲ بدست آمد. نتایج آزمون‌های



نمودار شماره ۲- میانگین سلول‌های ماست سل مثبت در واحد حجم در گروه‌های مورد مطالعه



■ بحث

در این تحقیق اثر داروی تالیدومید بر بیان پروتئین MMP-2 و ماست سل‌ها در فیبروز ریوی القا شده به وسیله بلئومایسین بررسی شد. نتایج کیفی هیستولوژیکی مقاطع بافتی گروه Bleo در این تحقیق و تحقیق قبلی نویسندگان^(۲۴) نشان داد که تزریق بلئومایسین بصورت داخل پریئوئن مدل مناسبی جهت ایجاد فیبروز ریه می‌باشد چرا که در بررسی هیستولوژیک، تمام نشانه‌های فیبروز ریوی از قبیل عدم سازمان یافتگی آلوئول‌ها، وجود سلول‌های التهابی و پرخونی در مقاطع بافتی این گروه مشاهده شد. بلئومایسین آنتی‌بیوتیکی است که در مراکز شیمی‌درمانی برای درمان تومور استفاده می‌شود و از عوارض مهم آن فیبروز ریوی می‌باشد. مکانیسم عمل آن به این صورت بوده که از طریق القای پاسخ ایمنی و التهاب باعث ایجاد آسیب اکسیداتیو شده که به DNA سلول‌ها آسیب رسانده و سلول‌های اپیتلیال آلوئولار را تخریب می‌کند^(۲۵).

با توجه به اینکه فعالیت‌های ایمنی در فیبروز مؤثر است، اگر بتوان با داروهای ایمنومودولاتور واکنش‌های التهابی را تعدیل کرد شاید بتوان تا حدی فیبروز ریه را مهار کرد. در تحقیق حاضر تالیدومید به عنوان داروی ایمنومودولاتور قوی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی هیستولوژیک مقاطع بافتی گروه Bleo+Thal نشان دهنده کاهش علائم فیبروز بصورت کاهش علائم التهاب، پرخونی و سازمان یافتگی بهتر آلوئول‌های ریوی بود که می‌تواند ناشی از داروی تالیدومید باشد. به علت اینکه تالیدومید دارای خواص زیادی مانند ضد التهاب^(۱۴)، ضد رگ‌زایی^(۱۵) و تعدیل کننده پاسخ ایمنی^(۱۶-۱۸) است می‌تواند خاصیت آنتی‌فیبروتیک هم داشته باشد. همچنین تالیدومید در درمان بیماری‌های متعددی استفاده شده است^(۱۰-۱۳). محققین در یک مطالعه انسانی که در سال ۲۰۱۲ انجام دادند متوجه شدند که مصرف تالیدومید با دوز پایین نه تنها سرفه را در بیماران مبتلا به فیبروز ریوی بطور چشمگیری کاهش می‌دهد، بلکه وضعیت دستگاه تنفس را نیز بهبود می‌بخشد^(۲۶) که این مسئله ناشی از خواص درمانی این دارو در فیبروز ریه می‌باشد. نکته قابل توجه این است که بین محققین معدودی که در زمینه اثر داروی تالیدومید روی فیبروز ریوی در موش کار کرده‌اند اختلاف نظر وجود دارد چرا که بعضی از آنها مانند Tabata و همکاران در سال ۲۰۰۷^(۲۱) و Zhao و همکارانش در سال ۲۰۰۹^(۲۲) اشاره به اثرات مفید این دارو در درمان فیبروز داشتند. آنها فاکتورهای التهابی را مورد سنجش قرار دادند و نشان دادند که تالیدومید می‌تواند تولیدات IL-6 وابسته به ترزاید سلولی و TGF- β وابسته به تمایز سلولی را کم کند که این دو عامل می‌تواند مکانیسم اصلی و اساسی اثرات پیشگیری تالیدومید روی فیبروز ریوی باشد. اما رفیعیان و همکارانش^(۲۳) در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ ارائه دادند روند آنژیوژنز را در فیبروز ریوی بررسی کردند و گزارش دادند که تالیدومید هیچ اثری بر روند آنژیوژنز و فیبروز ریوی ندارد. بنابراین مطالعات بیشتر در زمینه تالیدومید و فیبروز ریوی حائز اهمیت است.

در تحقیق حاضر اثر داروی تالیدومید روی دو فاکتور بسیار مهم (پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ و ماست سل‌ها) در روند فیبروزیز مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات کیفی نشان داد که در گروه Bleo سلول‌های بیان کننده MMP-2 مثبت به تعداد زیادی در بین تیغه‌های آلوئولی و حتی در بین سلول‌های اپیتلیالی مشاهده شدند، اما در گروه Bleo+Thal که بلئومایسین و تالیدومید را با هم دریافت کردند این سلول‌ها کمتر مشاهده شدند.

بررسی مورفومتریک نشان داد که میانگین سلول‌های MMP-2 مثبت در واحد حجم در گروه Bleo بیشتر از گروه Bleo+Thal می‌باشد که این مسئله نشان داد تالیدومید بیان پروتئین MMP-2 را بطور معنی‌داری در گروه Bleo+Thal نسبت به گروه Bleo کاهش داده است ($P < 0/001$). مطالعات معدودی اثر پروتئین MMP-2 را در فیبروز ریوی مورد بررسی قرار داده‌اند^(۲۷-۲۹) که اکثر آنها روی نمونه‌های انسانی تحقیق کرده‌اند و تاکنون در مورد اثر تالیدومید روی این پروتئین مهم گزارشی یافت نشده است. MMP-2 به عنوان ژلاتیناز 72KDa در نظر گرفته شده است و به دلیل توانایی در تجزیه کلاژن نوع چهار که ساختار اصلی غشای پایه را تشکیل می‌دهد به خوبی شناخته شده است.

مطالعات متعدد از جمله مطالعه گذشته ما^(۲۴) نشان داد که فعالیت این پروتئین در فیبروز ریوی بالا می‌رود^(۳۰-۳۱) و بوسیله سلول‌های متفاوتی از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتلیال، اندوتلیال و بسیاری از سلول‌های التهابی دیگر مانند ماکروفاژها، ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و ماست سل‌ها در ریه تولید می‌شود^(۳۲-۳۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ روی نمونه‌های انسانی صورت گرفت نشان داده شد که در فیبروز ریوی مقدار MMPها در مایع برونکوآلوئولار بیماران بالا رفته و احتمال می‌رود درمان دارویی برای آنها مؤثر نباشد و داروهایی که در بیماری ریوی انسدادی مزمن (COPD) به عنوان تارگت برای MMPها بکار می‌رود در حکم درمان دارویی جدید برای فیبروز ریوی باشد^(۳۵). در تحقیق حاضر با توجه به نقشی که ماست سل‌ها در روند التهاب و فیبروز دارند و با توجه به اینکه این سلول‌ها منشأ پروتئین‌های MMP-2 مثبت هستند، توزیع ماست سل‌ها هم مورد بررسی قرار گرفت.

ماست سل‌ها سلول‌های التهابی هستند که وقتی فعال می‌شوند دگرانوله شده و مدياتورهای التهابی زیادی را از قبیل هیستامین، سیتوکین‌هایی مانند (TNF- α)، پروتئوگلیکان‌ها و پروتئازها آزاد می‌کنند که این پروتئازها شامل تریپتاز، کیماز و کربوکسی پپتیداز A هستند^(۳۶-۳۸). آنزیم‌های ماست سل می‌توانند بطور مستقیم اجزای غشای پایه را از جمله کلاژن نوع چهار و پنج، لامینین، فیبرونکتین و الاستین را تجزیه کنند^(۳۹).

مطالعات نشان داده است که ماست سل‌ها یک نقش محوری در بسیاری از پاسخ‌های بیولوژیک مانند واکنش افزایش حساسیت، التهاب، ریمودلینگ بافت‌ها و آنژیوژنز ایفا می‌کند و در پاتوژنز بیماری‌های دژنراتیو مهم مانند آسم و آرتریت روماتوئید درگیر هستند^(۴۰).

■ نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در فیبروز ریوی تعداد سلول‌های بیان کننده پروتئین MMP-2 و ماست‌سل‌ها افزایش می‌یابد و استفاده از تالیدومید موجب کاهش جمعیت سلول‌های بیان کننده پروتئین MMP-2 و ماست‌سل‌ها شده و متعاقب آن روند فیبروزیس کاهش می‌یابد.

با توجه به اهمیت بیماری فیبروز ریوی که بیماری غیرقابل برگشت بوده و شیوع آن رو به افزایش است، پیشنهاد می‌شود جهت بررسی بیشتر این بیماری از روش‌های متفاوت دیگری جهت القای فیبروز استفاده کرده و نتایج آن با نتایج مطالعه حاضر مقایسه شود. همچنین مارکرهای دیگری که در فیبروز دخیل هستند مورد ارزیابی قرار گیرد.

■ تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ۱۳۹۱/۷۱ در تاریخ ۹۱/۶/۲۶ در دانشگاه علوم پزشکی کردستان تصویب شده و بودجه آن از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تأمین شده است که بدینوسیله از همکاری مسئولین سپاسگزاریم.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط محققین صورت گرفت نشان دادند که ماست‌سل‌ها نقش اساسی را در شروع فیبروز ریوی ایفا می‌کنند. آنها متوجه شدند که موش‌هایی که بطور ژنتیکی نقص در سلول‌های ماست‌سل داشتند از بیماری فیبروز ریوی الفا شده به وسیله‌ی بلئومایسین محافظت شدند و این حفاظت بعد از اعاده جمعیت ماست‌سل‌ها در ریه موش از بین رفت و موش‌ها مبتلا به فیبروز ریه شدند^(۴۱). در تحقیق حاضر نتایج کمی ماست‌سل‌ها نشان داد که تعداد این سلول‌ها در گروه Bleo بیشتر از گروه Bleo+Thal است که نشان می‌دهد تالیدومید بطور معنی‌داری تعداد ماست‌سل‌ها را در گروه Bleo+Thal نسبت به گروه Bleo کاهش داده است ($P < 0.001$). با این حال مکانیسم عمل تالیدومید به خوبی شناخته شده نیست که آیا اثرش را از طریق تعدیل پاسخ ایمنی ایفا کرده یا به علت اثر ضد التهابی آن است. بنابراین مطالعات بیشتر روی این دارو حائز اهمیت است. با توجه به یافته‌های این تحقیق و با توجه به اینکه افزایش ماست‌سل‌ها بیان پروتئین MMP-2 را افزایش داده است می‌توان گفت که بین تعداد ماست‌سل‌ها، بیان پروتئین MMP-2 و فیبروز ریوی ارتباط وجود دارد.

■ References

1. Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: The whole story or the last chapter of a long novel. *Chest*. 2005; 128: 526-32.
2. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2001; 134(2): 136-51.
3. Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Biol Chem*. 1985; 260(22): 12367-76.
4. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol*. 2001; 22(10): 571-9.
5. Gadek JE, Kelman JA, Fells G, Weinberger SE, Horwitz AL, Reynolds HY, et al. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 1979; 301(14): 737-42.
6. Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Muschel RJ. Induction of fibroblast 92 kDa gelatinase /type IV collagenase expression by direct contact with metastatic tumor cells. *J Cell Sci*. 1994; 107(2): 477-86.
7. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkovich R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol*. 2001; 167(7): 4008-16.
8. Lohi J, Harvima I, Keski-Oja J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem*. 1992; 50(4): 337-49.
9. Di Girolamo N, Wakefield D. In vitro and in vivo Expression of Interstitial Collagenase/MMP-1 by Human Mast Cells. *Dev Immunol*. 2000; 7(2-4): 131-42.
10. Lee FC, Merchant SH. Alleviation of systemic manifestations of multicentric Castleman's disease by thalidomide. *Am J Hematol*. 2003; 73(1): 48-53.

11. Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumor necrosis factor α and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut*. 2002; 50(2): 196-200.
12. Solèr RA, Howard M, Brink NS, Gibb D, Tedder RS, Nadal D. Regression of AIDS-related Kaposi's sarcomas during therapy with thalidomide. *Clin Infect Dis*. 1996; 23(3): 501-3.
13. Zorat F, Shetty V, Dutt D, Lisak L, Nascimben F, Allampallam K, et al. The clinical and biological effects of thalidomide in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2001; 115(4): 881-94.
14. Koch HP. Thalidomide and congeners as anti-inflammatory agents. *Prog Med Chem*. 1985; 22: 165-242.
15. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(9): 4082-5.
16. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*. 1991; 173(3): 699-703.
17. Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8⁺ subset. *J Exp Med*. 1998; 187(11): 1885-92.
18. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, et al. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- α . *J Immunol*. 1999; 163(1): 380-6.
19. Ng SS, Brown M, Figg WD. Thalidomide, an antiangiogenic agent with clinical activity in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2002; 56(4): 194-9.
20. Ye Q, Chen B, Tong Z, Nakamura S, Sarria R, Costabel U, et al. Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF- α release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Eur Respir J*. 2006; 28(4): 824-31.
21. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, et al. Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Immunol*. 2007; 179(1): 708-14.
22. Zhao L, Xiao K, Wang H, Wang Z, Sun L, Zhang F, et al. Thalidomide has a therapeutic effect on interstitial lung fibrosis: evidence from in vitro and in vivo studies. *ClinExpImmunol*. 2009; 157(2): 310-5.
23. Rafeiean SH, Alave H, Merkeshti N, Sadeqzade A. The investigation of Thalidomide effect on the lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Med journal of Esfahan*. 2008; 27(91): 373-8. [In Persian].
24. Keshavarz G, Rezaie M, Fathi F, Nikkhoo B, Roshani D. Investigating the Expression of Matrix Metaloproteinase-2 Protein in Lung Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice. *Med journal of Ilam*. 2013; 21(7): 102-12. [In Persian].
25. Ali EN, Mansour SZ. Boswellic acids extract attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin and oxidative stress from gamma irradiation in rats. *Chin Med*. 2011; 6: 36.
26. Cundari S, Cavaletti G. Thalidomide chemotherapy-induced peripheral neuropathy: actual status and new perspectives with thalidomide analogues derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2009; 9(7): 760-8.
27. Kim JY, Choeng HC, Ahn C, Cho SH. Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Yonsei Med J*. 2009 28; 50(1): 68-77.
28. Fukuda Y, Ishizaki M, Okada Y, Seiki M, Yamanaka N. Matrix metalloproteinases And tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in fetal rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279(3): 555-61.



29. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respire Res.* 2005; 6: 56.
30. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(5): 1949-56.
31. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest.* 2000; 117(3): 684-94.
32. Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, et al. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: effects of steroid and immunosuppressive treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(5): 903-13.
33. Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol.* 1999; 276: 814-24.
34. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 2001; 22(10): 571-9.
35. Stevens RL, Austen KF. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today.* 1989; 10(11): 381-6.
36. McKeown S, Richter AG, O'Kane C, McAuley DF, Thickett DR. MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF. *Eur Respir J.* 2009; 33(1): 77-84.
37. Miller HR, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology.* 2002; 105(4): 375-90.
38. Caughey GH. New developments in the genetics and activation of mast cell proteases. *Mol Immunol.* 2002; 38: 1353-7.
39. Vartio T, Seppa H, Vaheri A. Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteases, mast cell chymase and cathepsin G. *J Biol Chem.* 1981; 256(1): 471-7.
40. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med.* 1993; 328(4): 257-65.
41. Veerappan A, O'Connor NJ, Brazin J, Reid AC, Jung A, McGee D, et al. Mast cells: a pivotal role in pulmonary fibrosis. *DNA Cell Biol.* 2013; 32(4): 206-18.



Effect of Thalidomide on the MMP-2 Protein Expression and Mast Cells in the Lung Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice

Ghazal Keshavarz¹, Mohammad Jafar Rezaie^{*2}

1- MSc in Anatomical Sciences, Kurdistan University of Medical Sciences, Kurdistan, Iran.

2- Associate Professor, Kurdistan University of Medical Sciences, Kurdistan, Iran.

Received Date: 2014/07/08

Accepted Date: 2014/12/02

Abstract

Introduction and Aims

Matrix metallo proteinase-2 (MMP-2) is a family of proteolytic enzymes involved in degrading and remodeling the extra-cellular matrix and basement membrane. Researchers have shown that Mast cells have an important role in the inflammatory disease including lung fibrosis and they can be as the source of MMP-2 protein. The aim of this research is the examination of Thalidomide effect on the MMP-2 protein expression and Mast cells in the lung fibrosis induced by Bleomycin in mice.

Materials and Methods

In this research, 32 male adult C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups. Mices received in group 1 (Bleomycin) Bleomycin sulfate, in group 2 (Bleomycin+Thalidomide) Bleomycin beside Thalidomide, in group 3(Thalidomide) Thalido-mide and in group 4 (Carboxy Methyl Cellulose) Carboxy Methyl Cellulose via intraperitoneum. At the end of experiment, mice's lung samples were prepared and histological and immunohistochemical studies were performed about them. After the investigation of tissue slides, number of MMP-2 protein expression cells and Mast cells were calculated and results were analyzed by using OneWay ANOVA and Tukey's test.

Results

Histological and immunohistochemical studies showed a significant increase in the number of MMP-2 protein expression and Mast cells in the Bleomycin group in comparison with the Carboxy Methyl Cellulose group ($p < 0.001$). But number of these cells in the Bleomycin+Thalidomide group decreased significantly compared to the Bleomycin group ($p < 0.001$).

Conclusion

The results showed that the number of expressive cells of MMP-2 protein and Mast cells decreases by Thalidomide and subsequently reduces lung fibrosis in the mice.

Keywords

Lung Fibrosis, MMP-2, Mast Cells, Thalidomide

* Corresponding Author: Kurdistan University of Medical Science, Department of Anatomical Sciences.

Email: Rezaiejafar@gmail.com