

ارزیابی فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در درمانیت نیکلی به روش زایموگرافی در مقایسه با افراد طبیعی

رضا فلک* دکتر محمد رضا خرمی زاده** دکتر محمد پزشکی*** دکتر پروین منصوری****

*کارشناس ارشد ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

**دانشیار بیوتکنولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***دانشیار ایمنولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

****استاد پوست، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مکیده

زمینه و هدف

ماتریکس متالوپروتئینازها در ترمیم زخم نقش اساسی دارند. فیبروبلاست‌ها منبع اصلی تولید این آنزیم‌ها در پوست هستند. این مطالعه جهت بررسی تغییرات احتمالی فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در فیبروبلاست‌های لایه درمال اطراف ضایعات درمانیت مزمن نیکلی انجام گردید.

روش بررسی

برای مطالعه نقش ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در درمانیت تماسی آلرژیک، فیبروبلاست‌های لایه درمال اطراف ضایعات درمانیتی بیماران مبتلا به درمانیت نیکلی و افراد طبیعی کشت داده شد و فعالیت و کینتیک تولید ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در مایع‌رویی محیط کشت به روش زایموگرافی اندازه‌گیری و با استفاده از نرم افزار کامپیوتری دانسیتومتری (UVI) مورد ارزیابی کمی مقایسه‌ای قرار گرفت. هم‌چنین از آزمون MTT برای بررسی و مقایسه تکثیر سلول‌های فیبروبلاست ضایعات درمانیت نیکلی در مقایسه با فیبروبلاست‌های افراد طبیعی استفاده شد.

یافته‌ها

زایموگرافی اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ سلول‌های بیماران درمانیت نیکلی در مقایسه با سلول‌های طبیعی به‌خصوص در فاصله روزهای ششم الی هشتم پس از کشت نشان داد که بر اساس واحد محاسبه شده دانسیتومتری، میانگین و انحراف معیار در سلول‌های بیماران و سلول‌های طبیعی به‌ترتیب $(170 \pm 9/2)$ در مقابل $(134/3 \pm 5/9)$ بود $(P < 0/05)$ هم‌چنین بین روزهای ششم الی هشتم پس از کشت میزان تکثیر فیبروبلاست‌های بیماران (385938 ± 28116) در مقایسه با فیبروبلاست‌های طبیعی (270261 ± 6527) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود $(P < 0/05)$.

نتیجه‌گیری

با توجه به نقش ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در تخریب بافت کلاژنی، یافته‌های این بررسی نشان داد که فعالیت دژنراتیو فیبروبلاست‌ها در درمانیت نیکلی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. مطالعات ما نشان می‌دهد که افزایش فعالیت ژلاتینازی فیبروبلاست‌های درمانیت نیکلی وابسته به تعداد سلول‌ها نبوده و مستقل از آن است. احتمالاً سیگنال‌های داخل سلولی یا بین سلولی نیز تغییر یافته‌اند و فیبروبلاست‌های ناحیه درمانیت نیکلی به تحریکات میتوژنیک و فیبروژنیک پاسخ بیشتری می‌دهند.

کلید واژه‌ها: درمانیت، ماتریکس متالوپروتئیناز ۲، فیبروبلاست، زایموگرافی

نویسنده مسئول: کارشناس ارشد ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

آدرس: تقاطع بزرگراه شهید همت و شهید چمران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی تلفن: ۰۹۱۲۲۷۵۳۹۴۲

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۹

Email: Falakr851@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱۸

مقدمه

درماتیت تماسی آلرژیک^۱ یکی از واکنش‌های ناخواسته ولی شایع سیستم ایمنی به عوامل غیرپاتوژن است. واکنش‌های تماسی آلرژیک طی دو مرحله حساس شدن و القا ایجاد می‌شوند. در مرحله حساس شدن یک خاطره ایمونولوژیک ایجاد می‌شود. به‌طوری‌که هاپتن با پروتئین‌های ناحیه اپیدرم کونژوگه شده و پس از برداشت توسط سلول‌های لانگرهانس در غدد لنفی منطقه به لنفوسیت‌های T اختصاصی عرضه می‌شود. این امر در نهایت سبب ایجاد یک پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی می‌شود. مرحله القا همان مرحله مواجه مجدد با آنتی‌ژن می‌باشد که باعث تکثیر لنفوسیت‌های T اختصاصی و مهاجرت آن‌ها به ناحیه تماس شده و پاسخ ایمنی سلولی ثانویه رخ می‌دهد (۱). مهم‌ترین عوامل ایجادکننده درماتیت‌های تماسی هاپتن‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۷۰۰ دالتون هستند که به پروتئین‌های محلول بدن یا پروتئین‌های غشا سلولی متصل شده و در کنار مولکول‌های کمپلکس سازگاری نسجی اصلی^۲ کلاس II عرضه می‌شوند. هم‌چنین هاپتن‌های مذکور ممکن است به‌طور مستقیم به مولکول‌های کمپلکس سازگاری نسجی اصلی کلاس II متصل شده و باعث تغییر ساختمان آن‌ها شوند (۲). درماتیت نیکلی^۳ نوعی ازدیاد حساسیت تأخیری است که در اثر تماس مداوم پوست با آلیاژهای نیکلی ایجاد می‌شود (۳). شیوع درماتیت نیکلی در خانم‌ها نسبت به آقایان بیشتر بوده و حدود ۱۰ درصد می‌باشد ولی طی سال‌های گذشته شیوع آن افزایش یافته است که احتمالاً در اثر رواج استفاده از جواهرآلات حاوی نیکل می‌باشد. عدم پیشگیری و درمان مناسب درماتیت نیکلی موجب تغییرات ساختمانی پوست و ایجاد ضایعات مزمن می‌گردد (۴). متالوپروتئینازها اندوپتیدازهایی هستند که اولین بار در سال ۱۹۶۲ با شناخته شدن نقش آن‌ها در تکامل نوزاد قورباغه مطرح شدند. این پروتئازها در بازسازی ماتریکس خارج سلولی نقش اساسی دارند و می‌توانند باعث تجزیه بسیاری از اجزای آن شوند. از

آن‌جایی که اجزای ماتریکس خارج سلولی در فرآیندهای مختلف ایمونوبیولوژیک نظیر پرولیفراسیون، تمایز و مهاجرت سلولی نقش دارند، تغییرات این آنزیم‌ها روی فرآیندهای ایمونولوژیک مؤثر است. به‌علاوه این آنزیم‌ها در فرآیندهای التهابی، ترمیم زخم، تولیدمثل، تکامل و رگ‌زایی نیز اهمیت دارند (۵، ۶). متالوپروتئینازها توسط بسیاری از سلول‌های سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و لنفوسیت‌های T ساخته می‌شوند و در عملکردهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک آن‌ها دخیل هستند (۷). البته متالوپروتئینازهای مترشحه از سلول‌های سیستم ایمنی در ایجاد ساختمان طبیعی بافت همبند نقش فیزیولوژیک مستقیمی ندارند بلکه سایتوکاین‌ها، ایکوزانوئیدها، لوکوترین‌ها و سایر مدیاتورهای التهابی آزاد شده از آن‌ها نقش تنظیمی در تولید متالوپروتئینازها دارند که فاکتور رشد توموری بتا^۴، پروستاگلندین E₂^۵ و لوکوترین B₄^۶ از جمله مهم‌ترین آن‌ها به‌شمار می‌آیند (۸). تأثیر کلی متالوپروتئینازها به غلظت فرم فعال آن‌ها بستگی دارد که خود بازتابی از سلول‌های تولیدکننده و عوامل محرک آن‌هاست. به‌علاوه محل انتشار آنزیم و میزان غلظت مهارکننده‌های آن‌ها نیز در تنظیم فعالیت آن‌ها مؤثر است.

متالوپروتئینازها به چهار گروه عمده کلازانازها، ژلاتینازها، استرومیلین‌ها و متالوپروتئینازهای غشایی تقسیم می‌شوند (۵). ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ یا ژلاتیناز A یکی از مهم‌ترین ژلاتینازها بوده و توسط بسیاری از سلول‌ها از جمله فیبروبلاست‌ها، لوکوسیت‌ها و سلول‌های توموری تولید و ترشح می‌شود. عوامل مختلفی از جمله برهم کنش سلول‌ها با یکدیگر و برهم کنش سلول‌ها با اجزای ماتریکس خارج سلولی و هم‌چنین اثرات سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد و انکوژن‌ها روی بیان متالوپروتئینازها مؤثر هستند. میزان فعالیت این آنزیم‌ها به شدت تحت کنترل می‌باشد. اختلال در تعادل بین فعالیت متالوپروتئینازها و مهارکننده‌های آن‌ها منجر به مشکلات پاتولوژیک می‌شود به‌طوری‌که افزایش فعالیت آن‌ها باعث تخریب بافتی و افزایش مهارکننده‌های

^۴. Tumor growth factor-beta (TGFβ)

^۵. Prostaglandin E₂ (PDE2)

^۶. Leukotrien B₄ (LTB₄)

^۱. Allergic contact dermatitis

^۲. Major histocompatibility complex (MHC)

^۳. Nickel dermatitis

بیشتری به فلاسک اضافه شد تا تراکم سلول‌ها به ۷۰-۵۰ درصد برسد. سپس سلول‌ها به فلاسک‌های جدید پاساژ داده شدند و پس از تکثیر فیبروبلاست‌های پاساژ دوم و سوم در نیتروژن مایع فریز شدند.

آزمون زایموگرافی: سلول‌های پاساژ سوم دفریز شده و مجدداً کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده (پاساژ چهارم) جمع‌آوری و شمارش شد و سوسپانسیون با غلظت یک میلیون سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. برای هر یک از نمونه‌ها یک پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه انتخاب شد و ۲۰۰ میکرولیتر (دویست هزار سلول) از سوسپانسون فوق در هر یک از چاهک‌های آن کشت داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. هر روز یک ردیف از سلول‌های تمام نمونه‌ها انتخاب شده و مایع‌رویی جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ به‌روش زایموگرافی اندازه‌گیری شد (۱۰). به‌عنوان سوبسترای اختصاصی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ به مقدار ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ژلاتین A به ژل پلی‌آکریلامید اضافه شد. مایع‌رویی محیط کشت سلول‌ها در غیاب مواد احیاکننده به مدت ۳ ساعت با جریان الکتریکی ۸۰ ولت روی این ژل الکتروفورز شد. پس از اتمام SDS-PAGE ژل‌ها دو ساعت در محلول ۲/۵ درصد Triton X-100 بر روی روتاتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شسته شدند (محلول شستشو در این فاصله یک بار تعویض گردید) تا SDS از ژل‌ها خارج گردد. در نهایت ژل‌ها یک‌بار با آب مقطر شسته شده و در بافر زایموگرافی (بافرتریس-اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار حاوی ۱۰ میلی‌مول کلرید کلسیم با $PH=7.4$) به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ژل‌ها پس از شستشو با کوماسی آبی ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده و توسط متانول و اسیداستیک رنگبری گردید و نواحی بی‌رنگ شده توسط سیستم UVI^۶ دانسیتومتری شده و مساحت سطح بی‌رنگ شده و شدت بی‌رنگی^۷ بر اساس معیار مربوطه^۸ و به‌صورت واحدهای قراردادی^۹ اندازه‌گیری شد. برای تأیید هویت آنزیم وزن مولکولی آنزیم با SDS-PAGE

آن‌ها موجب فیبروز می‌گردد (۹،۵). در ناحیه درماتیت تماسی، ارتشاح سلول‌های التهابی در اطراف سلول‌های پوست تشکیل یک ناحیه فعال ایمونولوژیک موضعی می‌دهند و به نظر می‌رسد که سلول‌های ایمونولوژیک فعال با تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی موجب تغییر بیان متالوپروتئینازها در سلول‌های این ناحیه می‌شوند. با توجه به یافته‌ها و فرضیه‌های فوق، در مطالعه حاضر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در سلول‌های فیبروبلاست که مهم‌ترین سلول‌های مولد ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در پوست هستند در بیماران درماتیت تماسی نیکلی در مقایسه با افراد طبیعی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

محیط کشت DMEM^۱، سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین/ استرپتومایسین از شرکت Invitrogen^۲ و ژلاتین A و پودر MTT^۳ از شرکت Sigma^۴ و وسایل کشت نظیر فلاسک‌ها و پلیت‌ها و لوله‌های استریل از شرکت BD^۵ تهیه شد. شش بیمار مبتلا به درماتیت نیکلی (بین سنین ۲۰ الی ۴۰ سال) که توسط متخصص پوست تشخیص قطعی داده شده بودند و دو فرد به‌ظاهر طبیعی (۲۵ و ۳۵ ساله) که به بخش پوست بیمارستان امام خمینی دانشگاه تهران مراجعه کرده بودند پس از اخذ رضایت‌نامه در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. توسط متخصص پوست، از پوست ناحیه اطراف ضایعات فعال و پوست نواحی مشابه در افراد طبیعی بیوپسی تهیه شد. بیوپسی‌ها در محیط کشت DMEM بر روی یخ خشک به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران منتقل گردید. ناحیه درم جدا شد و توسط دو اسکالپل تکه‌تکه شده و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت داده شد. فلاسک‌ها در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فلاسک‌ها روزانه از نظر مهاجرت فیبروبلاست‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده مهاجرت سلولی قطعات بافتی خارج شده و محیط

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium

2. Invitrogen life technologies, Burlington, Ontario, Canada

3. MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

4. Sigma Inc., Germany

5. Becton Dickinson, USA

6. UVITec Limited, Cambridge, UK

7. Mean area density

8. Grey Scale

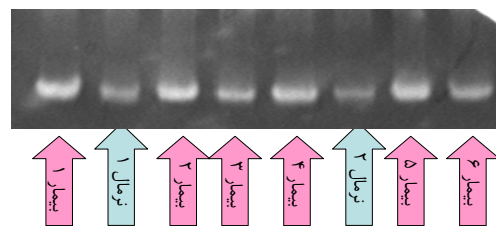
9. Arbitrary units

استفاده شد. برای انجام آزمون، محیط کشت چاهک مربوطه به آرامی با ۲۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر MTT جایگزین شده و پلیت ها پس از پوشانده شدن با فویل آلومینیومی به مدت ۴ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس به آرامی محیط کشت چاهک ها با ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید^۲ و ۲۵ میکرولیتر بافر شورنس (حاوی ۰/۱ مول گلايسين و ۰/۱ مول کلريد سدیم که PH آن با هیدروکسید سدیم روی ۱۰/۵ تنظیم شده بود) جایگزین شد تا کریستال های تترازولیوم در حلال فوق حل شوند. سپس محلول داخل چاهک ها چند بار توسط سمپلر کشیده و دوباره در پلیت برگردانده شد. پلیت ها ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شدند تا عمل انحلال به طور کامل صورت پذیرد. سپس محلول هر یک از چاهک ها پس از میکروفیوژ به یک چاهک خالی پلیت الیزا منتقل شده و چاهک های مصرف شده پلیت کشت سلولی با بافر فسفات استریل شسته شد. در نهایت جذب نوری چاهک ها توسط الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول های چاهک ها محاسبه گردید و با تعیین نسبت سلول ها به فعالیت آنزیم میزان فعالیت ژلاتینازی به ازای هر سلول محاسبه گردید. برای رسم منحنی استاندارد مقادیر فزاینده ای از سلول های فیرو بلاست (۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول) به طور پنتا پلیکیت در یک پلیت کشت داده شده و ۶ ساعت بعد آزمایش MTT مطابق روش معمول برای سلول های فوق انجام شده و منحنی استاندارد رسم گردید.

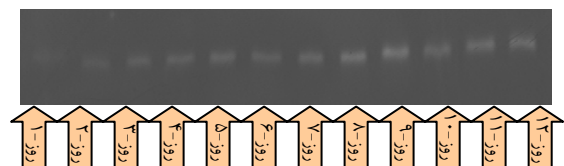
یافته ها

برای تعیین اختلافات آماری بین نتایج آزمون های MTT و MMP2 بیماران با افراد طبیعی از آزمون T استفاده شد و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. مقایسه نتایج زایموگرافی و پرولیفراسیون فیرو بلاست های بیماران و افراد طبیعی اختلاف قابل توجهی بین میانگین بیماران و گروه کنترل نشان داد. میانگین تکثیر نمونه های درمانی نیکلی

بررسی شد که حدود ۶۸ کیلودالتون بود و با وزن مولکولی ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ فعال هم خوانی داشت. به علاوه تأثیر EDTA به عنوان مهار کننده غیر اختصاصی متالوپروتئیناز روی فعالیت آنزیم بررسی شد. به طوری که افزودن یک میلی مول EDTA باعث مهار کامل فعالیت آنزیم می شد. شکل شماره ۱ نتایج زایموگرافی مایع رویی کشت نمونه های بیماران و افراد طبیعی را در روز چهارم و شکل شماره ۲ نتایج زایموگرافی مایع رویی کشت یکی از نمونه های طبیعی را در روزهای یکم الی دوازدهم پس از کشت نشان می دهد.



شکل شماره ۱: زایموگرافی مایع رویی کشت نمونه های بیماران و افراد طبیعی در روز چهارم پس از کشت



شکل شماره ۲: زایموگرافی مایع رویی کشت یکی از نمونه های طبیعی در روزهای ۱-۱۲ پس از کشت

آزمون پرولیفراسیون (تکثیر سلولی): برای بررسی تکثیر سلولی از آزمایش MTT استفاده شد. پس از بهینه سازی تعداد سلول، برای هر یک از بیماران یک پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه در نظر گرفته شد و در هر یک از چاهک ها به تعداد دویست هزار سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد FCS و آنتی بیوتیک (۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین در هر میلی لیتر) و ۱۰ میلی مول HEPES^۱ کشت داده شد و پلیت ها در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. هر روز سلول های یک ردیف از چاهک ها برای آزمون MTT

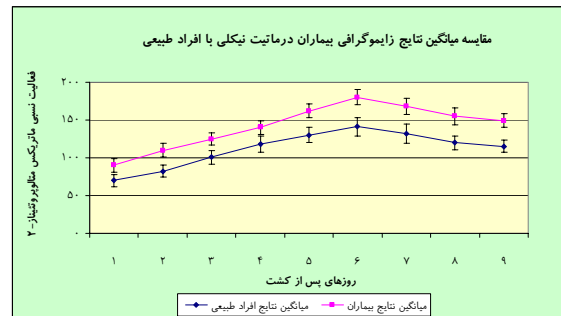
^۱. Hepes: N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

^۲. DMSO: Dimethyl sulphoxide

سلولی و ایجاد التهاب نقش مهمی دارند ولی هنوز در رابطه با عملکردهای این آنزیم‌ها در پاسخ‌های ایمنی اطلاعات کافی وجود ندارد. درمانیت نیکلی نوعی درمانیت تماسی آلرژیک است که عمدتاً در خانم‌های جوان در اثر استفاده از بدلیجات ایجاد می‌شود و ضایعات ایجاد شده تمایل به مزمن شدن دارند. اولین بار در سال ۱۹۹۹ میلادی با مطالعه روی موش‌های تخریب ژن شده^۱، ارتباط بین درمانیت تماسی آلرژیک با متالوپروتئینازها نشان داده شد (۱۱). مطالعات نشان داد که در مرحله حساس‌سازی درمانیت‌های آلرژیک حضور آنزیم استرومیلیزین^۲ برای شروع پاسخ ایمنی ضروری است و در غیاب این آنزیم مرحله حساس‌شدن صورت نمی‌گیرد. از طرفی نشان داده شد که آنزیم ژلاتیناز^۳ B برای فروکش و بهبودی واکنش‌های درمانیت آلرژیک ضروری بوده و در غیاب این آنزیم واکنش‌های التهابی تداوم بیشتری دارند. این تداوم التهاب به دلیل عدم تولید موضعی اینترلوکین ۱۰ رخ می‌دهد که از عوامل لازم جهت کنترل و فروکش واکنش‌های تماسی آلرژیک می‌باشد (۱۲، ۱۱).

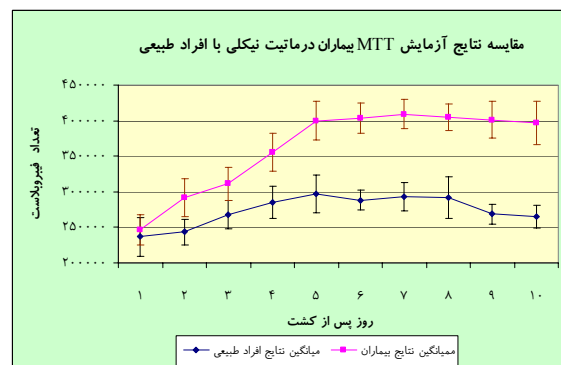
در درمانیت تماسی آلرژیک افزایش فعالیت بعضی از متالوپروتئینازها در سلول‌های لانگرهانس اپیدرم که سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن پوست هستند و نیز سلول‌های طحالی که حاوی لنفوسیت‌های T اختصاصی هستند نشان داده شده است. در درمانیت تماسی آلرژیک ابتدا آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های لانگرهانس اپیدرم برداشت شده و این سلول‌ها پس از مهاجرت در غدد لنفی منطقه آنتی‌ژن‌های خود را به لنفوسیت‌های T اختصاصی عرضه می‌کنند. نقش ژلاتینازها در عبور سلول‌های لانگرهانس از غشا بازال و مهاجرت این سلول‌ها در فاز القایی درمانیت تماسی نشان داده شده است (۱۳). به علاوه در فاز القایی تعداد سلول‌های لانگرهانس بیان‌کننده ژلاتیناز B در ناحیه درم افزایش می‌یابد (۱۴). همچنین افزایش فعالیت ژلاتینازی سلول‌های لانگرهانس پس از مالیدن هاپتن‌هایی نظیر دی نیتروکلروبنزن^۴ و تری نیتروکلروبنزن^۵ بر روی پوست نشان داده شده است. بررسی کینتیک تولید ژلاتیناز

در مقایسه با گروه کنترل 337922 ± 58505 در مقابل 253013 ± 21422 (شکل شماره ۳) و میانگین فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در سلول‌های بیماران در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل به ترتیب $142/1 \pm 29/1$ در مقابل $112/1 \pm 23/6$ (شکل ۴) می‌باشد.



شکل شماره ۳: مقایسه میانگین نتایج زایموگرافی بیماران درمانیت نیکلی با افراد طبیعی

به طور کلی اختلاف این نتایج در روزهای ششم الی هشتم پس از کشت محسوس‌تر بوده و معنی‌دار بود ($P < 0.05$). به طوری که میانگین تکثیر نمونه‌های درمانیت نیکلی در مقایسه با گروه کنترل در روزهای ششم الی هشتم پس از کشت 385938 ± 2816 در مقابل 270261 ± 6527 و میانگین فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در سلول‌های بیماران در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل به ترتیب $170 \pm 9/2$ در مقابل $134/3 \pm 5/9$ (شکل ۴) می‌باشد.



شکل ۴: مقایسه نتایج میانگین آزمون MTT بیماران درمانیت نیکلی با افراد طبیعی

بحث

متالوپروتئینازها توسط سلول‌های مختلفی از جمله بعضی از سلول‌های سیستم ایمنی نظیر لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها در بازسازی ماتریکس خارج

¹. Gen Knock out

². MMP3

³. MMP9

⁴. DNCB

⁵. TNCB

B در این سلول‌ها نشان می‌دهد که شش ساعت پس از مالیدن این مواد تولید ژلاتیناز B القا شده و طی ۱۲ الی ۲۴ ساعت فعالیت ژلاتینازی این سلول‌ها به حداکثر میزان خود می‌رسد و سپس طی ۷ الی ۱۰ روز به میزان طبیعی برمی‌گردد (۱۵). استفاده از مهارکننده‌های متالوپروتئینازها نظیر باتیماستات^۱ از مهاجرت سلول‌های لانگرهانس به دنبال ایجاد درماتیت نیکلی تجربی جلوگیری می‌کند (۱۵). اثرات ضد التهابی این داروهای غیر استروئیدی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. تحقیقات نشان داده است که استفاده از باتیماستات قبل از حساس کردن یا تحریک مجدد موش با کلرید پیکریل سبب مهار واکنش‌های درماتیت تماسی می‌شود. به‌طوری‌که تزریق داخل پری‌توانی ۰/۴ الی ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن قبل از حساس کردن موش باعث عدم ظهور واکنش‌های درماتیتی می‌شود. بنابراین می‌توان از مهارکننده‌های متالوپروتئینازها برای پیشگیری و التیام تظاهرات پوستی درماتیت تماسی آلرژیک و سایر بیماری‌های التهابی استفاده کرد (۱۶-۱۷). سلول‌های طحالی و لنفوسیت‌های T جدا شده از طحال موش‌های حساس شده با کلرید پیکریل نسبت به سلول‌های طحالی و لنفوسیت‌های T دست نخورده فعالیت ژلاتینازی بیشتری دارند. مهار فعالیت ژلاتینازی سلول‌های طحالی و لنفوسیت‌های T می‌تواند باعث کاهش مهاجرت لنفوسیت‌ها شده و بدین ترتیب فعالیت آن‌ها را سرکوب نماید. این امر می‌تواند باعث کاهش التهاب ناشی از ازدیاد حساسیت تماسی شود (۲۰-۱۸). موادی نظیر نیکل می‌توانند باعث افزایش بیان ژلاتینازها در کراتینوسیت‌ها شوند (۲۱). لذا از تغییرات بیان متالوپروتئینازها می‌توان به‌عنوان یک نشان‌گر بیولوژیک جهت تعیین میزان سمیت بعضی از مواد استفاده کرد. افزودن نیکل در مقادیر کمتر از حد سمی به مایع رویی کراتینوسیت‌ها موجب افزایش سلول‌های 4N کروموزومی و افزایش بیان MMP2 می‌گردد و حذف نیکل از مایع رویی کشت موجب کاهش بیان MMP2 به حد طبیعی شده و موجب طبیعی شدن سرعت تکثیر سلول‌ها می‌شود (۲۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که میزان فعالیت MMP-2 در فیبروبلاست‌های درماتیت نیکلی که در معرض تماس طولانی با نیکل بوده‌اند نسبت به

فیبروبلاست‌های افراد طبیعی افزایش دارد. با این‌که فعالیت MMP2 و MMP9 در سلول‌های ناحیه درماتیت تماسی آلرژیک افزایش می‌یابد، ولی چنین افزایشی در سرم این بیماران مشاهده نشده است. هم‌چنین فعالیت MT1-MMP که آنزیم فعال‌کننده ژلاتینازها می‌باشد، نیز تغییری نشان نمی‌دهد. لذا ژلاتینازهای موضعی می‌توانند در مکانیسم‌های ایجاد درماتیت تماسی آلرژیک به‌خصوص در تغییر ساختمان پوست و پاتوژنز ضایعات درماتیتی نقش داشته باشند (۲۳). افزایش فعالیت MMP2 باعث افزایش تکثیر سلولی شده (۲۲، ۲۴) و هم‌چنین موجب کاهش چسبندگی سلول‌ها می‌شود (۲۴). به‌علاوه متالوپروتئینازها با تأثیر بر ماتریکس خارج سلولی و آزادسازی کموکاین‌ها در مهاجرت سلول‌ها نیز نقش اساسی به‌عهده دارند (۲۵). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان تکثیر فیبروبلاست‌های ناحیه درماتیت نیکلی افزایش یافته است. علت این افزایش تکثیر می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت متالوپروتئینازها به‌خصوص ژلاتینازها باشد. هم‌چنین نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که میزان افزایش فعالیت ژلاتینازی سلول‌ها نسبت به افزایش قدرت تکثیر آن‌ها بیشتر است. علت این افزایش می‌تواند ناشی از اثرات موضعی سایتوکاین‌ها، لوکوترین‌ها، ایکوزانوئیدها و سایر واسطه‌های التهابی بر سلول‌های ناحیه درماتیتی باشد. مطالعات پیشین ما روی بیماران درماتیت تماسی آلرژیک ناشی از کروم، نیکل و چرم نیز نتایج مشابهی نشان داده بود (۲۷).

کلاژن جدا شده از پوست بیماران درماتیت تماسی آلرژیک مزمن نسبت به پوست طبیعی دارای خصوصیات متفاوتی می‌باشد. مثلاً حاوی کلاژن تیپ III بیشتری بوده و ژل تهیه شده از آن می‌تواند باعث افزایش بیان MMP2 در فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال گردیده و قدرت تجزیه کلاژن را در این فیبروبلاست‌ها افزایش دهد. بنابراین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکردی کلاژن بافت درماتیت مزمن متفاوت بوده و می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های پوستی مزمن نقش داشته باشد (۲۶). یکی از دلایل احتمالی افزایش فعالیت ژلاتینازی در درماتیت نیکلی می‌تواند مربوط به مزمن بودن ضایعات باشد که باعث تغییراتی در ساختمان پوست شده و موجب افزایش تولید متالوپروتئینازها در اثر برهم کنش بین سلول‌های ناحیه با بافت درماتیتی شده

^۱. Batimastat: BB-94

خارج سلولی در درماتیت نیکلی باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که استعمال داروهای مهارکننده متالوپروتئینازها ممکن است بتوانند در بهبودی سریع‌تر علائم درماتیت تماسی مؤثر واقع شوند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت ژلاتینازی فیبروبلاست‌ها در درماتیت نیکلی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این افزایش ممکن است دلایل متعددی داشته باشد. از جمله این‌که نیکل اثرات سمی دارد و شاید تماس طولانی مدت پوست با نیکل موجود در بدلیجات و غیره موجب افزایش بیان ژلاتینازها شده باشد. نتایج مطالعات ما نشان می‌دهند که میزان تکثیر فیبروبلاست‌های ناحیه درماتیت نیکلی نیز افزایش می‌یابد که می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت متالوپروتئینازها به‌خصوص ژلاتینازها باشد. همچنین نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که میزان افزایش فعالیت ژلاتینازی سلول‌ها نسبت به افزایش قدرت تکثیر آن‌ها بیشتر است که ممکن است ناشی از اثرات موضعی مدیاتورهای التهابی باشد. به‌طور کلی، شاید در آینده بتوان به کمک داروهای مهارکننده فعالیت ژلاتینازها بهبودی علائم درماتیت تماسی آلرژیک را تسریع نمود.

است. MMP2 فعال فقط در مرحله مزمن بیماری قابل‌مشاهده است و در مرحله حساس‌شدن موش فقط MMP2 غیر فعال و MMP9 قابل‌اندازه‌گیری هستند. هر چند نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در ضایعات مزمن‌تر میزان فعالیت ژلاتینازی بیشتر است ولی به‌دلیل کافی نبودن نمونه‌ها قادر به محاسبه نسبت افزایش فعالیت ژلاتینازی به‌طول دوره ایجاد ضایعات نبودیم. آزمایشات ما اولین مطالعه در رابطه با افزایش فعالیت ژلاتینازی فیبروبلاست‌ها در درماتیت تماسی آلرژیک است. همچنین اغلب مطالعات انجام شده در رابطه با درماتیت تماسی آلرژیک و متالوپروتئینازها روی بافت گوش موش‌ها و به‌کمک آلرژن‌های تجربی مثل دی و تری نیتروکلروبنزن صورت گرفته است و تاکنون مطالعه‌ای روی سلول‌های انسانی انجام نشده است. به‌طور کلی، تاکنون مطالعات انجام شده حاکی از افزایش فعالیت ژلاتینازی در سلول‌های لانگرهانس پوست و سلول‌های طحالی اختصاصی درماتیت تماسی بوده‌اند و مطالعات ما افزایش فعالیت این آنزیم را در فیبروبلاست‌های ناحیه درماتیت آلرژیک مختلف (۲۷) و درماتیت آلرژیک نیکلی (مطالعه حاضر) که در حقیقت مهم‌ترین منبع تولید این آنزیم‌ها در پوست هستند نشان می‌دهد. این افزایش فعالیت ژلاتینازی می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در تغییر ساختمان پوست و اجزای ماتریکس

References:

1. Sinigaglia F. The Molecular Basis of Metal Recognition by T Cells. *J Invest Dermatol* 1994 Apr;102(4):398-401.
2. Basketter D, Dooms-Goossens A, Karlberg AT, Lepoittevin JP. The Chemistry of Contact Allergy: Why is a Molecule Allergenic? *Contact Dermatitis* 1995 Feb;32(2):65-73.
3. Sosroseno W. The Immunology of Nickel-Induced Allergic Contact Dermatitis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1995 Dec;13(2):173-81.
4. Peltonen L. Nickel Sensitivity in the General Population. *Contact Dermatitis* 1979 Jan;5(1):27-32.
5. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.
6. Hijova E. Matrix Metalloproteinases: Their Biological Functions and Clinical Implications. *Bratisl Lek Listy* 2005;106(3):127-32.
7. Goetzel EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix Metalloproteinases in Immunity. *J Immunol* 1996 Jan 1;156(1):1-4.
8. Ries C, Petrides PE. Cytokine Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity and Its Regulatory Dysfunction in Disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995 Jun;376(6):345-55.
9. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF, Jr. Nomenclature and Glossary of the Matrix Metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992;1:421-4.
10. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl

- Sulfate and Copolymerized Substrates. *Anal Biochem* 1980 Feb;102(1):196-202.
11. Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM, Welgus HG. Role of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibition in Cutaneous Wound Healing and Allergic Contact Hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Jun 30;878:12-24.
 12. Wang M, Qin X, Mudgett JS, Ferguson TA, Senior RM, Welgus HG. Matrix Metalloproteinase Deficiencies Affect Contact Hypersensitivity: Stromelysin-1 Deficiency Prevents the Response and Gelatinase B Deficiency Prolongs the Response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 8;96(12):6885-9.
 13. Kobayashi Y. Langerhans' Cells Produce Type IV Collagenase (MMP-9) Following Epicutaneous Stimulation with Haptens. *Immunology* 1997 Apr;90(4):496-501.
 14. Heffler LC, Kastman AL, Jacobsson EG, Scheynius A, Fransson J. Langerhans Cells That Express Matrix Metalloproteinase 9 Increase in Human Dermis During Sensitization to Diphenylcyclopropanone in Patients with Alopecia Areata. *Br J Dermatol* 2002 Aug;147(2):222-9.
 15. Lebre MC, Kalinski P, Das PK, Everts V. Inhibition of Contact Sensitizer-Induced Migration of Human Langerhans Cells by Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Arch Dermatol Res* 1999 Jul;291(7-8):447-52.
 16. Mattei M, Carnieri E, Politi V, D'Alessio S, Sella A, Cassol M, et al. Inhibition of Contact Hypersensitivity Reaction to Picryl Chloride: Effect of Small Molecular Weight Peptidomimetic Compounds Possessing Inhibitory Activity Against Metalloproteinases. *Int Immunopharmacol* 2002 Apr;2(5):699-710.
 17. Holleran WM, Galardy RE, Gao WN, Levy D, Tang PC, Elias PM. Matrix Metalloproteinase Inhibitors Reduce Phorbol Ester-Induced Cutaneous Inflammation and Hyperplasia. *Arch Dermatol Res* 1997 Feb;289(3):138-44.
 18. Zhang L, Sun Y, Chen T, Xu Q. Selective Depletion of Glycyrrhizin From Si-Ni-San, a Traditional Chinese Prescription, Blocks Its Effect on Contact Sensitivity in Mice and Recovers Adhesion and Metalloproteinases Production of T Lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 2005 Jul;5(7-8):1193-204.
 19. Wang J, Sun Y, Li Y, Xu Q. Aqueous Extract From Aerial Parts of *Artemisia Vestita*, a Traditional Tibetan Medicine, Reduces Contact Sensitivity in Mice by Down-Regulating the Activation, Adhesion and Metalloproteinase Production of T Lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 2005 Feb;5(2):407-15.
 20. Cai Y, Chen T, Xu Q. Astilbin Suppresses Delayed-type Hypersensitivity by Inhibiting Lymphocyte Migration. *J Pharm Pharmacol* 2003 May;55(5):691-6.
 21. Lamberti M, Perfetto B, Costabile T, Canozo N, Baroni A, Liotti F, et al. In Vitro Evaluation of Matrix Metalloproteinases as Predictive Testing for Nickel, a Model Sensitizing Agent. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 Mar 15;195(3):321-30.
 22. Cammarota M, Lamberti M, Masella L, Galletti P, Rosa MD, Sannolo N, et al. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors as Biomarkers for Metal Toxicity In Vitro. *Toxicol In Vitro* 2006 Mar 6.
 23. Giannelli G, Foti C, Marinosci F, Bonamonte D, Antonaci S, Angelini G. Gelatinase Expression at Positive Patch Test Reactions. *Contact Dermatitis* 2002 May;46(5):280-5.
 24. Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The Role of Thrombospondins 1 and 2 in the Regulation of Cell-Matrix Interactions, Collagen Fibril Formation, and the Response to Injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 Jun;36(6):1115-25.
 25. Koch S, Kohl K, Klein E, von BD, Bieber T. Skin Homing of Langerhans Cell Precursors: Adhesion, Chemotaxis, and Migration. *J Allergy Clin Immunol* 2006 Jan;117(1):163-8.
 26. Hirota A, Ebihara T, Kusubata M, Kobayashi M, Kobayashi K, Kuwaba K, et al. Collagen of Chronically Inflamed Skin is Over-Modified and Upregulates Secretion of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix-Degrading Enzymes by Endothelial Cells and Fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2003 Dec;121(6):1317-25.
 27. Khorramizadeh MR, Falak R, Pezeshki M, Safavifar F, Mansouri P, Ghahary A, Saadat F, Varshokar K. Dermal Wound Fibroblasts and Matrix Metalloproteinases (MMPs): Their Possible Role in Allergic Contact Dermatitis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2004 Mar;3(1):7-11

***Evaluation of Matrix Metaloproteinase 2 (MMP2) Activity in Contact Nickel Dermatitis
Using Zymoanalysis in Comparison to Normal Individuals.***

R. Falak MSc* M.R. Khoramizadeh MD** M. Pezeshki MD*** P. Mansoori MD****

* Master of Science of Immunology, Iran University of Medical Sciences

** Associate Professor of Biotechnology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences

*** Associate Professor of Immunology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences

**** Professor of Dermatology, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Background and objective

Matrix Metaloproteinases (MMPs), produced mainly by fibroblasts, play a major role in wound healing processes. This study aimed to investigate the MMP2 activity in dermal fibroblasts found in chronic contact nickel dermatitis lesions.

Methods

In order to study the role of MMP2 in contact nickel dermatitis, fibroblast from patients and healthy individuals were cultured based on ex-plantation of skin. MMP2 activity was measured in fibroblast culture media using zymoanalysis. Zymograms were then analyzed by quantitative densitometry. MTT assay was also used to evaluate and compare proliferation capacity of fibroblasts in both cell cultures.

Results

The mean MMP2 activity 6-8 days after ex-plantation was significantly higher in patients fibroblasts than in normal individuals(170 ± 9.2 and 134.3 ± 5.9 in patients and normals, respectively ($p < 0.05$)). The proliferation capacity of patients' fibroblasts was significantly higher than that of normal cases (385938 ± 2816 and 270261 ± 6527 respectively, $p < 0.05$) in the same days.

Conclusion

Our study shows a significant increase in degenerative activity of fibroblasts in nickel dermatitis lesions. It was also seen that the MMP2 activity per cell was significantly higher in patients' fibroblasts compared to healthy individuals and that gelatinolytic activity of MMP2 is independent of cell number. Therefore, intra- and inter-cellular signals may be altered in fibroblasts of nickel dermatitis lesions which lead to promotion of fibroblast response to mitogenic and fibrogenic stimulations.

Keywords: Nickel dermatitis, Matrix Metaloproteinase 2 (MMP2), Fibroblast, Zymoanalysis.

Corresponding Author: Master of Science of Immunology, Iran University of Medical Sciences

Email: Falakr851@mums.ac.ir