مجلهٔ علوم دانشگاه تهران جلد ۱۷ شماره‌های ۱ و ۲ سال ۱۳۶۷ از صفحهٔ ۳۹ تا ٤٤

اثر اندومتاسین در تولید پروتئین CSF

دکتر عذرا ربانی چادگانی ، مسعود ودادی و دکتر بهرام گلیائی

مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران

چکیده

تکثیر وتمایز سلولهای گرانولوسیت وماکروفاژ در مغز استخوان بوسیله پروتئینهائی از نوع گلیکو پروتئین که CSF نامیده میشوند کنترل میشود . بافت ریه از بافتهای بسیار فعال در سنتز این پروتئین است باوجودیکه خصوصیات پروتئین CSF بدقت مطالعه‌شده است‌مکانیسم تولیدآن هنوزناشناخته است. دراین‌مقاله اثر اندومتاسین در تولید پروتئین CSF مورد بررسی‌قرارداده میشود. افزودن غلظت‌های مختلف اندومتاسین در محیط کشت بافت ریه واندازه‌گیری فعالیت CSF برروی سلولهای مغز استخوان درمحیط نیمه جامد آگار نشان میدهد که اندومتاسین در غلظت 1μg/ml موجب افزایش‌معنی‌دار درتولید پروتئین CSF میشود، در صورتیکه غلظت‌های بالاتراثرمهارکنندگی درتولید CSF دارند واردکردن پروستاگلاندین های E_1 و E_2 در حضور وعدم حضور اندومتاسین اثر افزایش دهندگی‌اندومتاسین را خنثی‌میکند هرچندکه برتولید CSF بافت طبیعی تاثیر چندانی ندارند . برداشت ماکروفاژهای ریوی ، افزایش تعداد کلنی های ایجاد شده توسط اندومتاسین‌را تا ۵۰٪ کاهش میدهد لیکن‌آنرا به‌حدطبیعی نمیرساند . نتایج‌فوق مؤید این‌است که‌اندومتاسین میزان تولید CSF در بافت ریه را افزایش میدهد. پروستاگلاندین‌ها وماکروفاژها با وجودیکه ممکن است در این روند تاحدودی موثر باشند لیکن اثر قابل‌ملاحظه‌ای در تولید CSF ندارند . لذا دراین مکانیسم باید سایر فاکتورهای ریوی خصوصاً سلولهای متنوع آن درنظرگرفته شوند.

J. of Science, Univ. of Tehran (1988) **17**, 39-44.

The Effect of Indomethacin on the CSF Production

Dr. A. Rabbani, M. Vedadi, and Dr. B. Goliaei,

Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran

Abstract

Proliferation and differentiation of granulocyte and macrophages in the bone marrow is regulated by glycoproteins called Colony - Stimulating - Factors (CSF). Lung is a very active tissue in the production of this pro+ein. Although the characteristics of CSF have been studied extensively, the mechanism of its production is still unknown. In this study the - effect of Indomethacin on the CSF production has been investigated. Addition of different concentrations of Indomethcin to the lung conditioned medium and measuring the CSF - activity on bone marrow stem cells in semi - solid agar cultures shows that Indomethacin at 1 μg/ml enhances CSF production, but at higher concentrations inhibits it. Using exogenous Prostaglandins El and E2 in the presence and absence of Indomethacin reverses enhancing effect, however, they have no significant effect on normal CSF production by the lung. Removal

of alveolar macrophages by lavaging also diminished Indomethacin effect to 50% but not to normal level. From the results obtained above, it is concluded that Indomethacin enhances CSF production by the lung tissue. Prostaglandins and macrophages, although affect this process but have not a significant role on the normal CSF production. Therefore the role of other cellular types of the lung should be considered in this mechanism .

مقدمه

اندومتاسین[1] داروی ضد التهاب غیر استروئیدی است که به عنوان مهارکننده بیوسنتز پروستاگلاندین ها[2] استفاده میشود (1987 ,Vane). درسلول پروستاگلاندین ها از پیش‌ساز اسیدآراشیدونیک[3] و تحت اثـر آنزیم سیکـلواکسیژناز[4] و سنتتازهـا ساخته میشونـد (Needleman, et al, 1986). اندومتاسین در واقع مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژنازهاست که درنتیجه موجب‌منع سنتزپروستاگلاندین ها خصوصاً گروه E میشود پروستاگلاندین های گروه E درتنظیم‌فرآیندهای سلولی مانندبالابردن سطح cAMP ومهار تولید فاکتورهای رشدی مانند2-IL لازم هستند(Box, et al, 1987; Walker, et al, 1983).

رشد ونمو و تکثیر سلولهای خونی درسیستم خونسازی بوسیله هورمون هائی از نوع گلیکوپروتئین انجام میگیرد تاکنون تعداد زیادی ازاین پروتئین ها جداسازی شده‌اند که هریک بطوراختصاصی باعث‌رشدونموگروه خاصی ازسلولهای‌خونی‌میشوند(Metcalf, 1984)

از بین‌این فاکتورهای‌رشد، گروهی که‌توانائی تولید کلنی های گرانولوسیت وماکروفاژ از سلولهای مادره[5] مغز استخوان در محیط نیمه جامد آگاردارند CSF[6] (Colony - Stimulating - Factor) نامیده شده‌اند (Metcalf, 1986; Sieff, 1987) . تاکنون حداقل چهار نوع CSF از سلولها وبافت‌های‌مختلف جداسازی و خالص شده است که برحسب اینکه تولیدکننده ماکروفاژ ،گرانولوسیت یا مخلوط آنها باشندبترتیب M - CSF, G - CSF, GM - CSF, Multi - CSF که‌قدرت‌عمل وسیع تری‌دارد نامگذاری‌شده‌اند (Morstyn & Burgess, 1988) . بافت ریه از بافت های بسیار فعال درتولید وآزادسازی GM - CSF است (Stanley, 1971 & Sheridan). باوجودیکه در مورد‌خصوصیات پروتئین CSF مطالعات بسیاری انجام شده است در مورد مکانیسم تولید آن‌اطلاعات‌بسیار کم وناقص است یکی از راههای بررسی این مکانیسم استفاده از مهارکننده‌های پروستاگلاندین هاست. اثر مهاری پروستاگلاندین ها برتولیدفاکتورهای‌رشدمانند2 - IL[7] ،TNF, Monokine[8] گزارش شده است (Quill, etal, 1989; Kunkel etal, 1988) و Moore و همکارانش بااستفاده از سلولهای فعال شده لوکوسیت‌ها بوسیلـه اندوتوکسین اثر مهاری پروستاگلاندین هارا در تولید CSF نشان داده‌اند (Moore, et al, 1979).

دراین‌گزارش اثر اندومتاسین درتولید CSF دربافت ریه مورد بررسی قرار داده شده است. نتایج حاصل نقش اندومتاسین وپروستا گلاندین درتولید پروتئین CSF توسط بافت‌ریه را مشخص میسازد.

مواد و روش

محیط کشت DMEM ازGibco تهیه ومورداستفاده‌قرارگرفت. اندومتاسین با خلوص ٩٦٪ درغلظت 25 mg/ml دراتانول‌حل و برای تهیه غلظت‌های مختلف‌با محیط‌کشت رقیق‌گردید. پروستا گلاندین ها (Sigma) درغلظت 1mg/ml دراتانول‌حل ودر°C ٢٠- ذخیره‌گردیدند . موش Balb/c با وزن‌های ٢٠٠-٢٥٠ گرم و ٣٠-٤٥ گرم استفاده شد. سرم جنین‌گوساله[9] ازکشتارگاه زیاران تهیه ودر آزمایشگاه مراحل آن انجام‌گردید.

تهیه CSF از بافت‌ریه: پس‌از بیهوش‌کردن‌حیوان، بافت‌ریه در شرایط استریل از قفسه سینه جدا ودر سرم فیزیولوژی به‌اطاق گشت منتقل‌گردید. قطعات ریه درپتریهای استریل حاوی 5ml از محیط‌کشتDMEMواردوبوسیله‌قیچی به‌قطعات‌ریزmm ١ خردشدند. نمونه‌ها بمدت٤٨ ساعت درشرایط استاندارد بادرجه حرارت ٣٧°C، ٥٪CO_2 در هوا ورطوبت‌کامل این‌گونه شدند. پس از زمان‌مقرر نمونه‌ها درg ٢٠٠٠ بمدت ٣٠ دقیقه سانتریفوژ ومحلول سوپرناتانت در٦٠°C ٥ بمدت نیم ساعت‌حرارت داده‌شد. نمونه پس ازسانتریفوژ مانند فوق ، در مقابل‌آب‌مقطر بمدت٤٨ ساعت دیالیزگردید. آب دیالیز یکبار عوض شد. محلول دیالیز شده بمدت یکساعت در

1 - Indomethacin
2 - Prostaglandins
3 - Arachidonic Acid
4 - Cyclooxygenases
5 - Stem - Cells
6 - Colony Stimulating Factor
7 - Interleukine 2
8 - Tumor - Necrosis - factor
9 - Fetal Calf Serum

۲۰۰۰g سانتریفوژو بعنوان منبع غنی از CSF مورد استفاده قرار گرفت.

اندومتاسین وپروستاگلاندین E1 و E2 بطور جداگانه ویادر حضور یکدیگر در محیط کشت بافت ریه واردگردیدند و بقیه مراحل مانند فوق انجام گرفت.

سنجش فعالیت CSF: به نمونه CSF آماده شده درفوق پلی اتیلن گلیکول[1] در غلظت نهائی ۱٪ اضافه و بوسیله فیلتر میلی پور[2] ۰/٤٥μm استریل گردید. برای تهیه سلولهای مغزاستخوان، استخوان‌های ران وساق موش Balb/c درشرایط استریل جدا ومغز استخوان بااستفاده ازسرنگ ومحیط کشت ازدرون استخوان خارج وسوسپانسیون سلولی از آن تهیه گردید، سلولها بوسیله هماستیومتر شمارش شدند.

برای تهیه محیط کشت نیمه جامد آگار محلولی از ۰/۵٪ محیط کشت، ۰/۲٪ سرم جنین گوساله و ۰/۳٪ آگار ۱٪ تهیه وسلولها در غلظت ۱۰۵ سلول درهرمیلی لیتر درمحلول وارد شدند. نمونه های CSF درغلظت ۰/۱ml در پتریهای ۳۵mm استریل وارد وبهرپتری ۱ml از محیط کشت واجد سلول واردگردید. از هرنمونه ۴-۳ پتری آماده ونمونه ها پس از بستن روی یخ بمدت ۷ روز در شرایط استاندارد مانند فوق کشت داده شدند.

بررسی کلنی ها: محیط پتریها ابتدا بوسیله رنگ رایت-ائوزین رنگ‌آمیزی وپس از شستشوی رنگ بوسیله بافر رایت (۶/۶۳ گرم KH_2PO_4 و ۲/۰۶ گرم Na_2HPO_4 pH = 6.4) کلنی ها زیر میکروسکوپ بررسی وشمارش گردیدند.

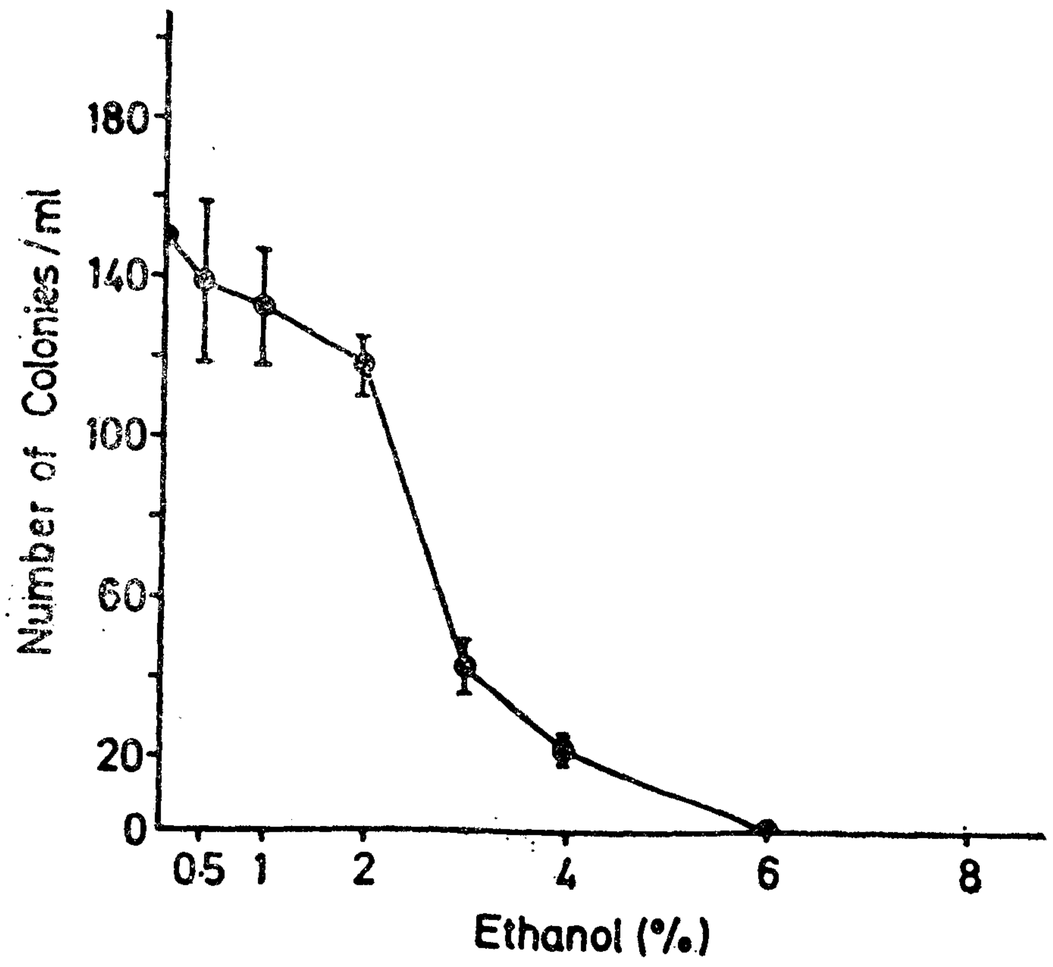
لاواژ بافت ریه: برای برداشت سلولهای ماکروفاژ ریوی، پس از بیهوش کردن حیوان وباز کردن قفسه سینه در شرایط استریل لوله موئین ازطریق نای واردبافت شد وبااستفاده از سرم فیزیولوژی استریل سلولهای ماکروفاژ از ریه خارج گردیدند (Rabbani, 1989 & Goliaei) شستشوی ریه ۳۰ بار وهر بار با ۱۰ml محلول انجام گرفت. پس از برداشت کامل سلولهای ماکروفاژ، بافت ریه مانند آنچه در فوق گفته شدبرای تهیه CSF در حضور وعدم حضور اندومتاسین مورداستفاده قرارگرفت.

سنجش پروتئین: میزان پروتئین نمونه ها با استفاده از روش هارتری (Hartree, 1972) انجام گردید. از سرم آلبومین بعنوان استاندارد استفاده شد.

نتایج

بمنظوربررسی مکانیسم تولید CSF توسط بافت ریه، اندومتاسین بعنوان مهارکننده سنتزپروستاگلاندین ها مورد استفاده قرارگرفت. بعلت نامحلول بودن اندومتاسین درمحلول های آبی، ماده در اتانول حل ومورد استفاده قرارگرفت، لذا لازم بود ابتدا اثر اتانول در تولید CSF مطالعه گردد. بدین منظور غلظت های مختلف اتانول درمحیط گشت ریه وارد وپس از شمارش کلنی های حاصل، نتایج درشکل ۱ نشان داده شده است. بطوری که مشاهده میشود اتانول تا غلظت ۲٪ اثر چندانی در تعداد کلنی های حاصل ندارد. لیکن با افزایش غلظت بشدت تولید CSF را در محیط کاهش میدهد بطوریکه در ۶٪ کاملا سنتز را مهار میسازد.

اندومتاسین درغلظت 10^{-5} mg/ml در محیط کشت بافت ریه واردگردید. برای اضافه کردن غلظت های بالای اندومتاسین و مطالعه اثرآنها درتولید CSF لازم بود اندومتاسین درغلظت اتانول ۳٪ در محیط وارد شود. درنتیجه محیط کشت ریه با غلظت ۳٪ اتانول بعنوان شاهد قرارگرفت. ضمناً جهت مقایسه بافت ریه طبیعی نیز بدون هرگونه افزودنی تهیه گردید. در حالت طبیعی ۰/۱ml از CSF حدود ۱۰۰-۱۵۰ کلنی ایجاد مینماید لیکن درحضوراتانول تعداد کلنی ها به ۴۵-۵۰ میرسد.

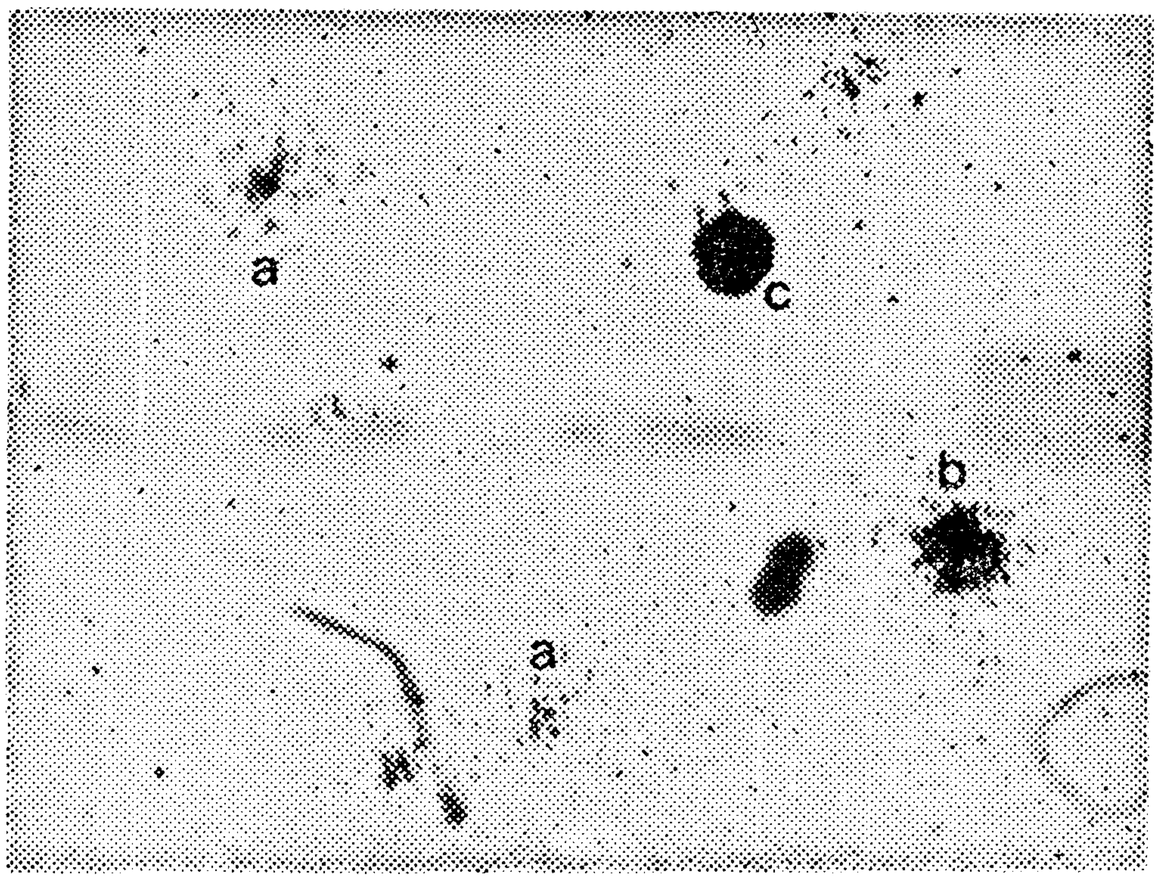


شکل ۱- اثر غلظت های مختلف اتانول درمحیط کشت بافت ریه.

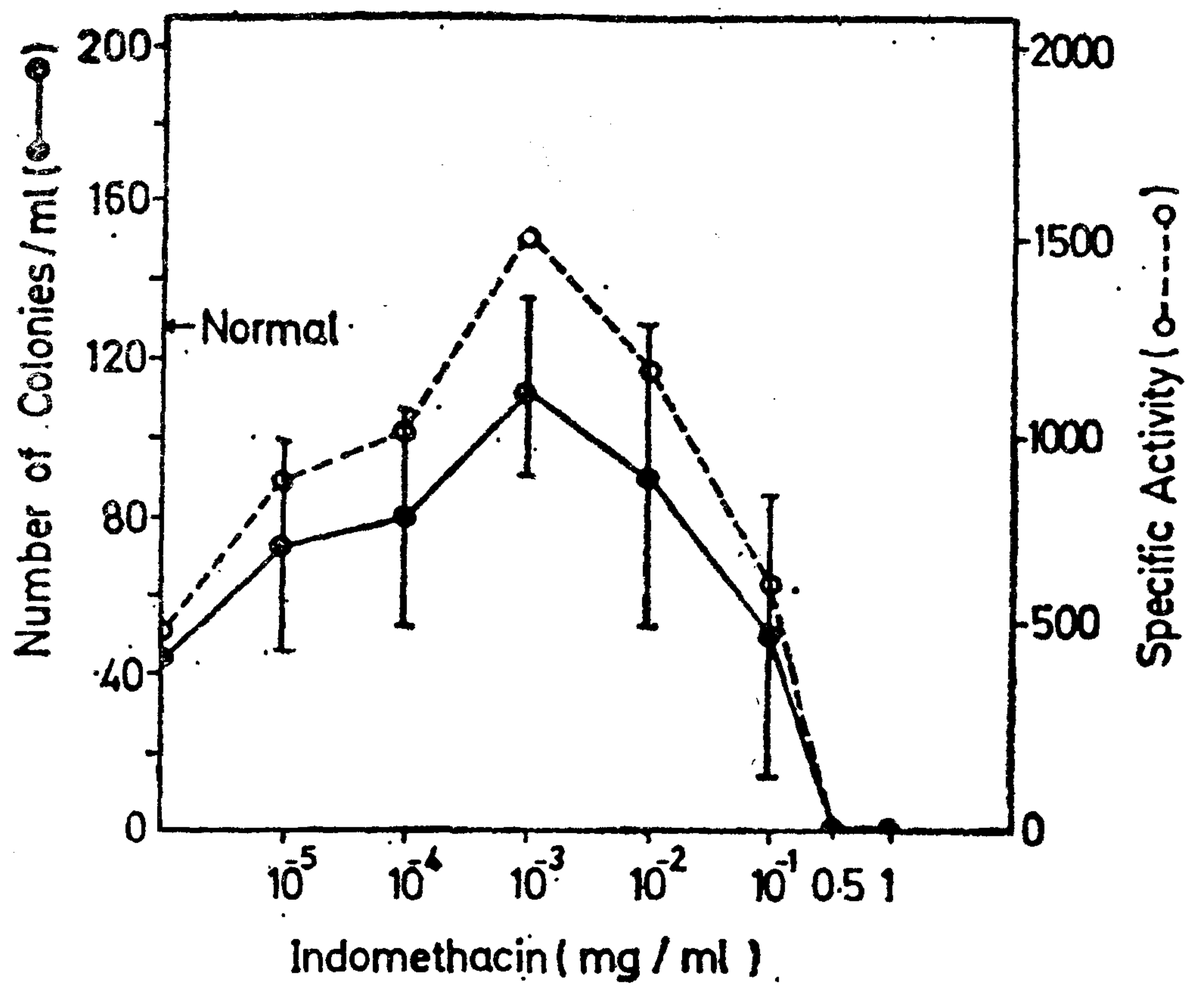
مطالعه کلنی ها در زیر میکروسکوپ سه نوع کلنی را مشخص میسازد (شکل ۲). کلنی هائی باسلولهای کاملاً پراکنده بانام تمایز یافته (۲a)، کلنی هائی با سلولهائی که در بخش مرکزی فشرده‌تر از بخش خارجی هستند بنام تاحدی تمایز یافته (۲b) و کلنی هائی که کاملا فشرده بوده وسلولهای پراکنده ندارند بنام تمایز نیافته (۲c). برای تعیین میزان فعالیت CSF هرسه نوع کلنی

1- Polyethylene glycol
2 - Millipore

شمارش گردید. میزان فعالیت بعنوان تعداد کلنی برحسب میلی گرم پروتئین اندازه‌گیری شد. شکل ۳ نتایج حاصل از اضافه کردن به‌محیط کشت بافت ریه اضافه شدند. نتایج درشکل ٤ نشان داده شده است. وارد کردن پروستاگلاندین‌ها به‌تنهائی اثر چندانی بر



شکل ۲ـ کلنی‌های حاصل از کشت سلولهای مغز استخوان در حضور CSF

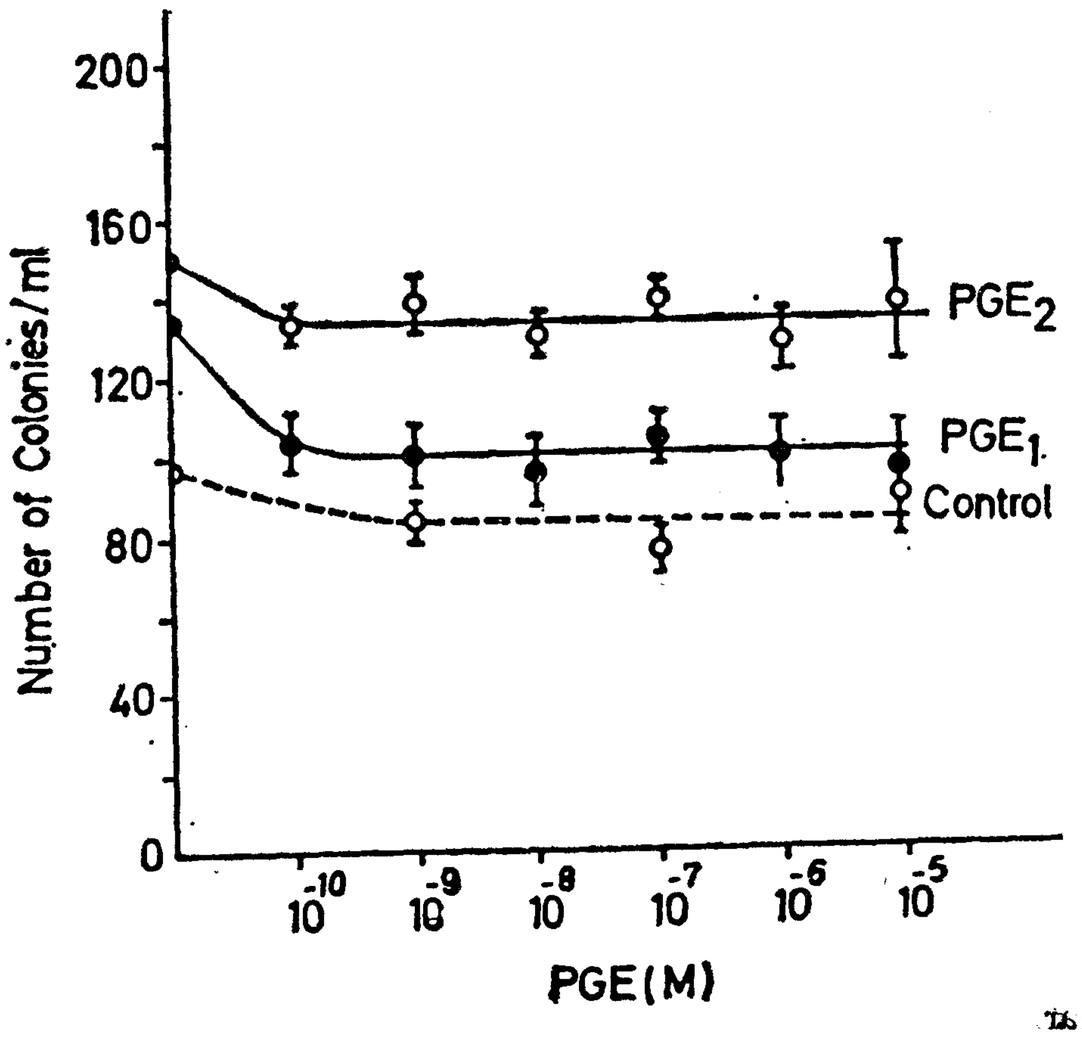


شکل ۳ـ اثر غلظت های مختلف اندومتاسین در تولید CSF توسط بافت ریه

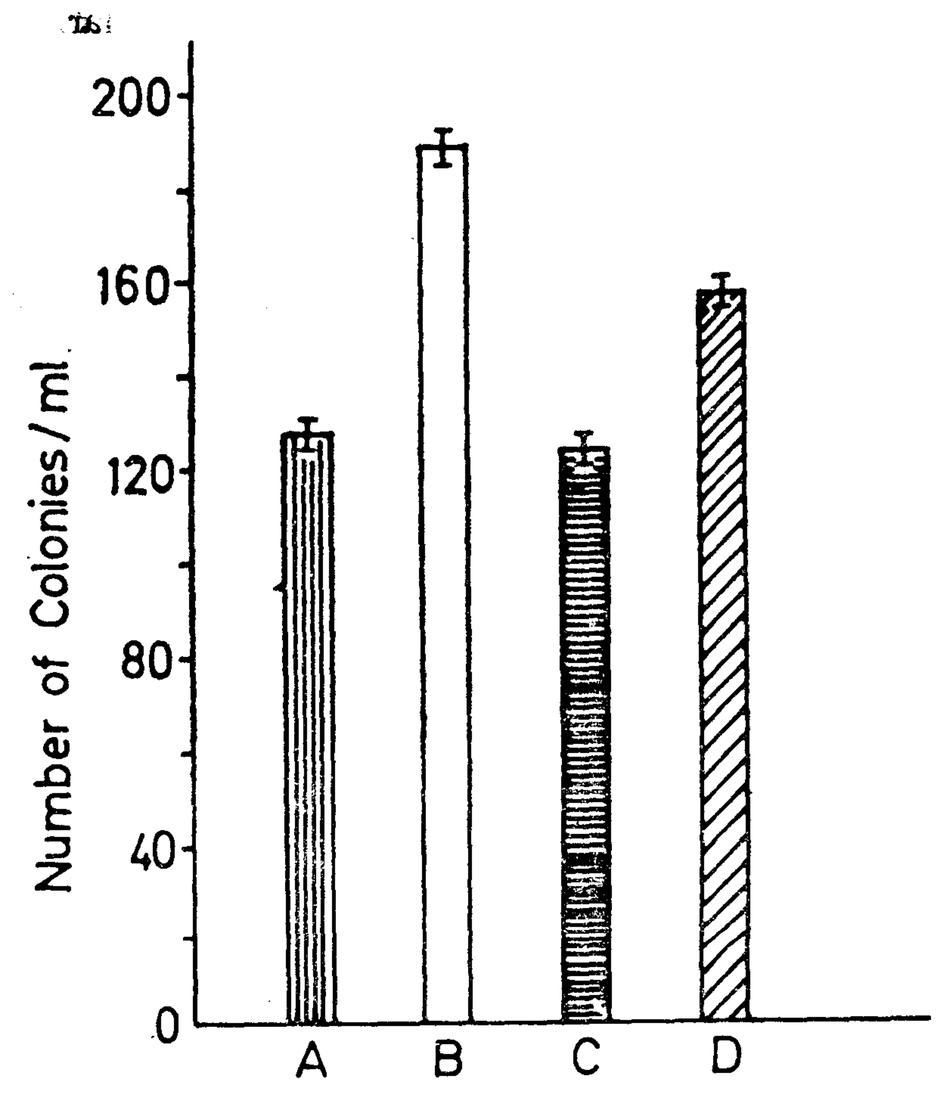
اندومتاسین در محیط کشت بافت ریه را نشان میدهد. بطوریکه ملاحظه میشود اضافه کردن اندومتاسین تعداد کلنی‌های حاصل در محیط را افزایش‌داده وموید افزایش درتولید CSF است. این افزایش در غلظت µg/ml ۱ به‌حداکزیمم میرسد وپس از آن به‌تدریج روبه کاهش میگذارد بطوریکه درmg/ml ۰/۵. کاملا تولید CSF را متوقف میسازد. نتایج حاصل نشان‌میدهد که بکار بردن اندومتاسین سیستم تولید CSF را فعال ساخته‌است. اگر چنین باشد باید افزودن پروستاگلاندین اضافی در محیط کشت بافت ریه اثر اندومتاسین را خنثی نماید.

پروستاگلاندین های E_1 وE_2 بطور مستقل و در حضور اندومتاسین روی تولید CSF ندارند در صورتیکه درحضوراندومتاسین کاملا اثر افزایش دهندگی خنثی‌شده است. پروستاگلاندین E_1 علاوه برخنثی کردن اثر اندومتاسین اثر مهارکنندگی نیز از خود نشان میدهد لیکن E_2 درحضور اندومتاسین اثر مهاری موثری از خود نشان نمیدهد.

سلولهای ماکروفاژ از سلولهای فعال در سنتز پروستاگلاندین بوده ودر شرایط فعال‌شده بوسیله اندوتوکسین (LPS) درتولید CSF نیزفعال میشوند: (Haensch et al, 1984) (Stenson et al, 1981. برداشت ماکروفاژهای ریوی‌بوسیله لاواژ ومقایسه اثر اندومتاسین در دوحالت ریه لاواژ شده و ریه طبیعی نشان میدهد (شکل ۵)



شکل ٤- اثر پروستاگلاندین های E_1 و E_2 بطور مستقل ودرحضور اندومتاسین در تولید CSF توسط بافت ریه.



شکل ٥- اثراندومتاسین درتولید CSF در ریه لاواژ شده وطبیعی

A : ریه نرمال بدون اندومتاسین

B : ریه لاواژ شده بدون اندومتاسین

C : ریه طبیعی در حضور اندومتاسین

D : ریه لاواژ شده در حضور اندومتاسین

که باوجودیکه تعداد کلنی های حاصل دردو حالت کاملا یکسان است(C, A)، برداشت ماکروفاژها (D) افزایش تعداد کلنی های نمونه اندومتاسین را ۵۰٪ کاهش میدهد. این نتایج نشان میدهد که با وجودیکه دراین مکانیسم ماکروفاژهای ریوی تاحدودی اثر دارند اثر سایر سلولهای ریوی نیز باید درنظرگرفته شود.

بحث

اندومتاسین بعنوان مهارکننده سنتزپروستاگلاندین ها دربررسی مکانیسم های متابولیکی سلول بطور وسیع مورد استفاده قرارمیگیرد. پروستاگلاندین ها نیز خود نقش مهمی در راه های متابولیکی سلول داشته واز طریق cAMP یا سایرفرآیندهاتولیدبرخی از فاکتورهای رشد را مهار میسازند بطور مثال درسلول T-Cell باعث مهارتولید IL - 2میشوند (Quill et al, 1989). هم چنین مهار تولیدمنوکاین ها وفاکتور TNF بوسیله ماکروفاژهای فعال شده نیزگزارش شده است (Kunkel et al. 1986, 1988).

Moore و همکارانش نیزنشان داده اند که پروستاگلاندین ها تولید هورمون CSF را درسلولهای فعال شده لوکوسیت مهارساخته واندومتاسین آنرا افزایش میدهد (Moore et al, 1979). نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده، موضوع افزایش تولید CSF توسط اندومتاسین را بوضوح نشان میدهد. آنچه مهم است اینست که پروستاگلاندین ها خود به تنهائی تاثیر چندانی برتولید پروتئین CSF طبیعی ندارند لیکن درحضور اندومتاسین تولید CSF اضافی رامهار

میسازند. ماکروفاژهای ریوی فعال شده بوسیله اندوتوکسین نیز CSF میسازند .هم‌چنین این سلولها یکی‌از منابع مهم در تولید پروستاگلاندین‌ها میباشند.

(Haensch et al, 1984) . لاواژ ریه تاثیر چندانی درتعداد کلنی‌های ایجاد شده در مقایسه بانمونه طبیعی نشان نمیدهد (Goliaei, Rabbani, 1989)، در صورتیکه در حضور اندومتاسین برداشت ماکروفاژهای ریوی اثر افزایش دهندگی اندومتاسین را بمیزان ۵۰٪ کاهش میدهند. لذا از مشاهدات فوق میتوان‌چنین استنباط نمود که پروستاگلاندین‌ها وماکروفاژها خود تاثیرچندانی درتولید CSF طبیعی توسط بافت‌ریه ندارند. لیکن‌حضوراندومتاسین در محیط بربرخی از فرآیندهای سلولی بافت ریه تاثیرگذارده و میزان تولید را افزایش میدهد. بخشی ازاین اثر افزایش دهندگی شاید مربوط به ماکروفاژهای ریوی باشد. از آنجاکه بافت ریه یک بافت پیچیده بوده وعلاوه برماکروفاژها شامل چندین نوع سلول دیگر مانند سلولهای اپی‌تلیال ، اندوتلیال وسلولهای بین بافتی نیز است میبایست نقش هریک ازآنها دراین مکانیسم مورد توجه و بررسی قرارگیرد.

بودجه کار تحقیقاتی فوق از طریق شورای پژوهشی دانشگاه تهران تأمین شده است.

References

Box, R.J.,Portenier, M. & Staehelin,M.(1987)Similarities in cAMP responses between murine lymphoid cell line subsets of mouse lymphocytes *J.Leukocyte Biol.* **42**, 144.

Goliaei, B. & Rabbani, A. (1989) The role of alveolar macrophages in the Colong Stimulating foctor production by the lung, *Medical J. I.* Iran, in press.

Hartree, E. F. (1972) Determination of proteins, *Anal. Biochem.* **4**, 422 - 427.

Haensch, G M., Seitz, M., Martinotti, G., Betz, M., Routerberg, E. W. & Gemsa, D. (1984) Macro - phage release arachidonic acid prostaglandin E2 and thromboxane in response to late comple - ment, *J. Immunol.* **133**, 2145 .

Kunkel, S. L., Spengler, M., May, M. A., Spengler, R., Larrick, J. & Remick, D. (1988) Prostaglandin E2 regulates macrophage derived tumor necrosis factor gene expression, *J. Biol. Chem* . **263**, 5380 - 5384.

Metcalf, D. (1984) *The hemopoietic Colony Stimulating Factors*, Elsevier.

Metcalf, D. (1986) The molecular biology and functions of the GM - CSF Blood **67**, 257 - 267.

Moore, R. N., Urbaschek, R., Wahl, L. M. & .Mergen-hagen, S. E. (1979) Prostaglandins regulation of CSF production by LPS - stimulated murine leukocytes, *Infection & Immunity* **26**, 675.

Morstyn, G. & Burgess, A.W.(1988) Hemopoietic growth factors, *Cancer* Res. **48**, 5624 - 5637 .

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison , A. P. & Lefkowitch, J. B. (1986) Arachidonic acid metabolism. *Ann, Rev. Biochem.* **55**, 69.

Quill, H., Gaur, A. & Phipps, R. P. (1989) Prostandin E2 dependent induction of CSF secretion by cloned murine Helper T - Cells *J. Immunol.* **42**, 813 - 818.

Sheridan, J. W. Stanley, E. R. (1971) Tissue sources of bone marrow CSF *J. Cell Physiol* **78**, 451 - 460.

Sieff, C. A. (1987) Hematopoietic growth factors *J. Clini. Invest.* **79**, 1549 - 1557.

Stenson, W. F., Nickels , M. W. & Ailinson, J. P. (1981) Metabolism of exogenous Arachidonic acid by murine macrophage like tumor cell line*Prostaglandin* **21**, 675 .

Vane, J. R (1987) The evolution of non - steroidal antiinflammatory drug and their mechanism of action. *Drugs* **33**, 18

Walker, C., Kristensen, F., Bettens, F. & Deweck, A.L. (1983) Lymphokine regulation of activated lymphocytes 1. prostaglandin E2 induced inhibition of IL2 production. *J. Immunol.* **130**, 1770 .