



## تأثیر داروی سورفاکتانت ریوی بر میزان بیان ژن MCP-1 در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

معصومه علی وردیلو<sup>۱</sup>، محمدرضا مخبر دزفولی<sup>۲</sup>، زهره افتخاری<sup>۳\*</sup>، مهدی پریان<sup>۳</sup>

۱- گروه ژنتیک، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- مجتمع تولیدی تحقیقاتی انسیتو پاستور ایران، کرج، ایران

\*مسئول مکاتبات: [eftekharivet@gmail.com](mailto:eftekharivet@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳۰

### چکیده

سورفاکتانت به عنوان ماده کاهش دهنده کشش سطحی در ریه نقش اساسی در درمان بیماری‌های ریوی ایفا می‌نماید. پروتئین کموتاکسیک مونوسیت ۱ (MPC1) توسط مونوسیت‌ها تولید و با القای فاگوسیتوز سبب حذف عفونت از بدن می‌شود. جهت ارزیابی اثرات درون تنی سورفاکتانت ریوی، تعداد پنج راس خرگوش انتخاب، بعد از بیهوشی سورفاکتانت تهیه شده از طریق نای با کمک کاتتر طراحی شده وارد ریه گردیده و در زمان‌های قبل از تجویز دارو، ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و روزهای ۷ و ۳۰ بعد از تجویز خون از حیوان گرفته شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی طبق پروتکل از خون هپارینه جدا و کشت داده شدند. میزان بیان ژن در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در ساعت قبل از تجویز دارو و ساعت‌های بعد دریافت با کمک روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان MCP-1 در نمونه قبل از تداخل دارویی و ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و روز ۷ تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن MCP-1 در ۲۴ ساعت بعد از مواجهه با داروی سورفاکتانت افزایش یافت و در ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو به حداکثر بیان خود رسید. در مجموع افزایش مونوسیت‌ها و MCP-1 همزمان با هم احتمالاً بیانگر نقش هدایتی در سیستم ایمنی بدن توسط داروی سورفاکتانت و متعاقباً اثرات دفاعی MCP-1 در بافت ریه است.

کلمات کلیدی: سورفاکتانت ریوی، MCP-1، بیان ژن، خرگوش.

### مقدمه

سورفاکتانت حاوی شش نوع فسفولیپید و چهار نوع آپوپروتئین می‌باشد که در حدود ۸۶-۸۰ درصد حاوی فسفولیپیدها، ۸ درصد لیپید خنثی و ۱۲-۶ درصد پروتئین می‌باشد (۱، ۲). سندرم زجر تنفسی، به نارسایی تنفسی در نوزادان اطلاق می‌شود که بلافاصله بعد از تولد شروع شده و در ۲ روز اول زندگی وخیم‌تر می‌شود که در صورت عدم درمان،

سورفاکتانت یک ترکیب فسفولیپیدی - پروتئینی می‌باشد که توسط پنوموسیت‌های نوع ۲ در ریه تولید و ترشح می‌شود. ترکیبات فسفولیپیدی و برخی پروتئین‌های سورفاکتانت باعث کاهش کشش سطحی مجاری هوایی به ویژه آلوئول‌ها می‌شود. سورفاکتانت نقش بسیار مهمی در سیستم دفاعی بدن و بهبود قدرت پاکسازی موکوسیلیاری ریه‌ها دارد (۱۲، ۱۷، ۱۸).

دارو در سندرم زجر تنفسی نوزادان و افراد مبتلا به آسم، برونشیت مزمن و پنومونی‌ها احتمالاً علاوه بر کاهش کشش سطحی توسط این ماده و افزایش عملکرد ریوی، این ماده نقش مهمی در سیستم دفاعی ایفا می‌کند. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که محتوای لیپیدی سورفاکتانت در بیماران مبتلا به HIV کاهش می‌یابد و این افراد مستعد ابتلا به سندرم زجر تنفسی هستند به همین دلیل بررسی اثرات سورفاکتانت طبیعی بر روی سیستم ایمنی می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای در درمان بیماران ایفا کند (۱۳).

MCP1 (Monocyte chemotactic protein-1) یا CCL2 که به آن فاکتور ۱ جاذب شیمیایی مونوسیت‌ها نیز می‌گویند توسط مونوسیت‌ها، سلول‌های آندوتلیال، فیروبلاست‌ها و سلول‌های T تولید می‌شود و باعث افزایش مهاجرت مونوسیت‌ها از جریان خون به بافت و تبدیل آنها به ماکروفاژ می‌گردد و با القای فاگوسیتوز باعث حذف عفونت از بدن می‌شود (۱۶، ۱۹). CCL2 از خانواده سایتوکین‌ها محسوب می‌شود و نقش مهمی در ترشح و آزادی و عملکرد مونوسیت، ماکروفاژ، نوتروفیل و لنفوسیت‌ها دارد. در پاسخ ایمنی به دنبال عفونت و التهاب نقش دارد. اثرات ضد توکسیک به دنبال تجویز داروها دارد. بسته به ارگان هدف، دوز دارو، نقش سایر سیتوکین‌ها و نحوه تجویز دارو عملکرد متفاوت دارد. در ریه از تحریک‌کننده‌های MCP و در کلیه از بلوکه‌کننده‌های MCP استفاده می‌شود.

به دلیل نقش CCL2ها در روند ایمنی‌زایی به دنبال تجویز دارو و به دلیل اثرات بر روی تولید و ترشح ماکروفاژها و مونوسیت‌ها و اثرات متقابل فسفولیپیدها و MCP، بررسی اثرات سورفاکتانت طبیعی تهیه شده بر روی سیستم ایمنی بدن می‌تواند نقش مهمی در تعیین سیستم ایمنی بدن بعد از اخذ سورفاکتانت داشته باشد (۱۱، ۲۲).

هیپوکسی شدید و عدم کارایی تنفسی و در نهایت مرگ رخ می‌دهد (۳، ۷، ۸، ۱۰).

علت اصلی این بیماری کمبود سورفاکتانت و افزایش کشش سطحی آلوئول‌های ریه نوزادان نارس می‌باشد. نقش کلیدی سورفاکتانت در پاتوفیزیولوژی سندرم زجر تنفسی توسط Avery و Mead در ۱۹۵۹ شناسایی شد تا محققان به فکر تجویز آئروسول سورفاکتانت برای نوزادان نارس مبتلا به سندرم زجر تنفسی بیفتند (۱، ۲، ۸).

در اوایل دهه ۸۰ میلادی Fujiwara و همکاران مخلوطی از سورفاکتانت طبیعی تهیه شده از ریه گوساله را برای درمان نوزادان نارس مبتلا به سندرم زجر تنفسی تجویز کردند و متوجه کاهش در اکسیژن مصرفی شدند. در سال ۱۹۹۷ نیز اثرات ضدالتهابی لیپیدهای سورفاکتانت گزارش شد (۲، ۲۱).

امروزه نقش پروتئین‌های هیدروفیل سورفاکتانت در ایمنی ذاتی در افراد مبتلا به آسم به ویژه عملکرد ماکروفاژها، تولید Thelper2 و در نهایت آزادی IL-8 و لکوترین‌ها ثابت شده است (۲۲).

نقش پروتئین‌های هیدروفیل در ایمنی ذاتی تایید شده است و بر اساس مقالات مورد بررسی در افراد مبتلا به آسم نقش این پروتئین‌ها در لنفوسیت‌های T، ائوزینوفیل‌ها و ماست سل‌ها و تولید سیتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی تایید شده است. اما بر اساس مطالعات در شرایط مختلف مواجهه عملکرد متقابل پروتئین‌ها و لیپیدهای سورفاکتانتی با فاکتورهای پیش‌التهابی متفاوت می‌باشد. همچنین نقش پروتئین‌های هیدروفوب در تولید IL-5,4 و به طور غیرمستقیم در تنظیم ایمنوگلوبولین‌ها در برخی منابع ذکر شده است (۱۶، ۱۹، ۲۴، ۲۵).

نقش پروتئین‌های هیدروفوب و اجزای لیپیدی سورفاکتانت طبیعی در سیستم ایمنی بدن چندان مورد بررسی قرار نگرفته است و به دلیل اهمیت کاربرد این



هدف از این تحقیق ارزیابی و شناخت هر چه بیشتر اثرات درمانی سورفاکتانت ریوی به عنوان داروی موثر در درمان سندرم زجر تنفسی نوزادان بر روی سیستم ایمنی بدن در سلول‌های PBMC جدا شده از مدل حیوانی خرگوش و هم چنین ارتباط آن با سیتوکین‌های مرتبط با بافت ریه می‌باشد.

#### مواد و روش کار

انتخاب ریه جهت اخذ ماده اولیه دارویی: پس از مراجعه به کشتارگاه، تعدادی ریه سالم گوساله انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد. متعاقباً لاوز توسط محلول نمکی صورت گرفت. مایعات کدر و کف‌آلود لاوز شده وارد لوله فالكون‌های کدگذاری و استریل گردید. نمونه‌های اخذ شده بعد از سانتریفوژ و فیلتراسیون، با کمک روش استخراج لیپید (Bligh and Dyer) استخراج شدند. لایه کلروفرمی تغلیظ و سپس توسط استون سرد آبیگری شد. نمونه به دست آمده خشک و در نهایت فرموله گردید.

ارزیابی داروی سورفاکتانت ریوی در محیط کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی: این مطالعه به شکل تجربی بر روی ۵ سر خرگوش سفید نیوزلندی (New Zealand Rabbit) با وزن ۱/۸-۱/۵ کیلوگرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، انجام شد. خرگوش‌های مورد نظر به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از معاینات بالینی اولیه و انجام آزمایشات کامل و اطمینان از سلامتی، آرام‌بخشی حیوان با دو دارو، شامل زایلازین (Holland Interchemic) با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کتامین (Trittau Co, German) با دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل عضلانی انجام شد. بعد از بیهوشی خرگوش، حیوان در حالت جانبی قرار داده شده و لوله نای به روش کور وارد محل دو شاخه شدن نای گردید. سپس کاتتر ریوی از طریق لوله نای وار ریه گردیده

خرگوش نسبت به سایر مهره‌داران دارای بیشترین شباهت پاتوبیولوژیکی به انسان است. ساختار آناتومیکی - فیزیولوژیکی و شباهت‌های زیستی میان خرگوش و انسان نسبت به سایر مهره‌داران بیشتر می‌باشد به همین سبب این مدل در مطالعات مخاطی - عروقی و تنفسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۶).

به عنوان یک مدل حیوانی تجربی، خرگوش جهت آزمایشات بررسی برخی داروها مانند تولید ضد پادتن و تولید پروتئین‌های درمانی به کار می‌رود. شبیه‌سازی شرایط انسانی در مدل حیوانی جهت کسب نتایج کامل و صحیح امری قطعی و دقیق است. از این رو انتخاب سیستم صحیح حیوانی امری چالش برانگیز است یکی از مهم‌ترین جنبه‌های این مساله انتخاب مدل انسانی است که دارای ساختار آناتومی مناسب باشد که این مشخصه‌های آناتومی مشترک میان خرگوش و انسان، توانایی مدل حیوانی خرگوش جهت ایجاد مجدد بیماری ریه انسانی را بیان می‌کند (۲۰، ۹).

علی‌رغم بررسی نقش سورفاکتانت در سیستم ایمنی بدن در شرایط درون تنی و برون تنی، نقش داروی تجویزی در میزان تحریک سیستم ایمنی و میزان بیان ژن سیتوکین‌ها و ایمنوگلوبولین‌ها به طور کامل بررسی نشده است و به دلیل ترشح MCP1 توسط ماکروفاژها و مونوسیت‌ها و نقش این پروتئین در آزادی IgE و Th و نقش مهم در دفاع از اثرات توکسیک داروها، بررسی میزان بیان ژن پروتئین مذکور به دنبال تجویز داروی سورفاکتانت می‌تواند در شناسایی اثرات احتمالی دارو بر روی سیستم ایمنی بدن کمک کننده باشد.

ایمنوگلوبولین E با پیوند به آلرژن باعث آزاد شدن هیستامین از ماست سل و بازوفیل می‌شود و علائم آلرژی پدید می‌آید. در کنار آن وظیفه حفاظت در مقابل برخی کرم‌های انگلی را به عهده دارد.



۲۶۰/۲۸۰ نانومتر و ۲۳۰/۲۶۰ نانومتر در اسپکتوفتومتری قرائت شد (Nanodrop 2000). سپس cDNA سازی (توسط کیت سینا کلون) صورت گرفت که براین اساس ۹ میکرولیتر از RNA را به همراه ۴ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر رندوم هگزامر به میکروتویوپ اضافه شد و برای مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. باید توجه داشت که همه مراحل در کنار یخ انجام شود. سپس ۲ میکرولیتر DNTP و بافر ۲،۱۰X میکرولیتر و آنزیم به مقدار ۲ میکرولیتر اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه و بعد به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه تا کار آنزیم توقف شود. برای بررسی میزان بیان ژن CCL2 با کمک روش Real Time PCR پرایمرها را با استفاده از نرم افزار ALLELE ID طراحی شد (جدول ۱). RNA با استفاده از محلول جداسازی استخراج و تحت واکنش رونویسی معکوس به cDNA تبدیل شده و جهت بررسی سطح بیان ژن Real Time PCR کمی مورد استفاده قرار گرفت. دماها و زمان-های واکنش برای Real Time PCR مطابق دستورالعمل کیت تنظیم گردیده که در جدول ۲ ذکر گردیده است. برای تایید تکثیر قطعات اختصاصی ژن و عدم حضور محصول غیراختصاصی از منحنی ذوب و تشکیل تک پیک استفاده شد. **بررسی آماری:** جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS مدل ۱۸/۰ استفاده گردید. بررسی تغییرات MCP-1 و IgE در طی زمان مطالعه با کمک آزمون Repeated Measure ANOVA انجام شد و مقایسه قبل از تزریق و بعد تزریق دارو نتایج با کمک Paired t-test و همچنین آزمون تعقیبی LSD انجام شد. در همه آزمون‌های آماری انجام گرفته، ارزش p-value، کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

و داروی سورفاکتانت که بر اساس وزن بدن محاسبه شده بود تزریق شد. قبل از تجویز دارو، بعد از ۴، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و روز ۷ و ۳۰ بعد از تجویز ۵ میلی-لیتر خون از ورید گوشی اخذ گردیده و در لوله‌های هپارینه ریخته شد. میزان سرمی MCP-1 با کمک کیت الیزا م.س.م به Bioassay Technology Laboratory Rabbit MCP Elisa kit (cat no#E0202rb) بر روی نمونه‌های سرمی اخذ شده مورد بررسی قرار گرفت. سپس سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) توسط محلول lymphopred/محللول فایکول که یک محلول استاندارد و بی‌رنگ، استریل برای جداسازی لنفوسیت‌ها بکار می‌رود که خون را به آرامی بر روی آن ریخته بطوری که باهم مخلوط نشوند که به صورت دو فاز درآیند، جداسازی شد. شمارش سلول‌ها با کمک رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/۰۲۵ درصد انجام شد. جهت کشت سلول‌های جدا شده در یک پلیت ۲۴ خانه‌ای نمونه کنترل ریخته شد که شامل سلول (۱۰<sup>۶</sup> سلول بر میلی‌لیتر) و ۲۰۰ میکرولیتر FBS و ۱۰ میکرولیتر پن استرپ که با RPMI به حجم رسانده شد، بود. پلیت‌ها داخل انکوباتور CO<sub>2</sub>، رطوبت دار و ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مایعات داخل پلیت را خارج کرده و به میکروتویوپ منتقل گردید. سپس در دور به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی را به میکروتویوپ دیگر منتقل کرده و برای سنجش سایتوکین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها به فریزر -۷۰ انتقال داده شد و رسوب سلولی جهت استخراج RNA (توسط کیت سیناژن Cat. NO: RN7713C) بر طبق پروتکل استفاده شد. در انتها نمونه‌ها در طول موج



مقایسه میانگین بیان ژن‌ها به روش t-test در سطح احتمال پنج درصد بین دو رقم در هر زمان انجام شد. تجزیه داده‌ها بر اساس داده‌های چرخه آستانه (Ct) حاصل از دستگاه و نرم‌افزار REST 2009 انجام شد. جهت نرمال سازی داده‌ها نیز از ژن خانه‌دار  $\beta$ -Actin استفاده شد. مقایسه میانگین بیان ژن‌ها به روش t-test در سطح احتمال پنج درصد بین دو رقم در هر زمان انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمر طراحی شده با کمک نرم افزار ALLELE ID

MCP-1	Forward Primer : CTGCTTGCTGCCATTCTC Reverse Primer : CACACCTGCCTTTACACC
$\beta$ -Actin	Forward Primer : CCTCGCTCTCCACCTTCC Reverse Primer: TGCCAATCTCGTCTCGTTTC

جدول ۲- زمان و دمای سیکل واکنش Real Time PCR

تعداد سیکل	دما	زمان	مراحل
۱	۵۰ سانتی گراد	۲ دقیقه	اختیاری: قبل از درمان UNG
۱	۹۵ سانتی گراد	۱۰ دقیقه	آغاز دناتوراسیون (واسرشت سازی)
۳۴-۳۵	۹۴ سانتی گراد	۱۵ ثانیه	واسرشت سازی
	۶۰-۵۰ سانتی گراد	۳۰ ثانیه	هیبریداسیون
	۷۲ سانتی گراد	۳۰ ثانیه	بسط یا سنتز
	X سانتی گراد	۱۵ ثانیه	Optional Date Acquisition
۱	۴ سانتی گراد	نامعین	خنک سازی

## نتایج

ارزیابی محتوای سیتوکین‌ها در مایعات رویی حاصل از کشت سلول‌های PBMC: میزان MCP-1 بر حسب نانوگرم بر لیتر در ساعت صفر  $(\pm ۸/۴)$  ۱۸۸/۱۶، ساعت ۲۴  $(\pm ۳۴/۱۳)$  ۳۸۴/۳۲، ساعت ۴۸  $(\pm ۳۲/۹۶)$  ۴۵۰/۴۳، ساعت ۷۲  $(\pm ۳۵/۵)$  ۴۰۰/۶۴، روز ۷  $(\pm ۳۵/۵)$  ۴۳۲/۴ و روز ۳۰  $(\pm ۸/۷)$  ۲۰۴/۴۵ Repeated Measure ANOVA میانگین CCL-2 در طی زمان مورد مطالعه تغییرات معنی‌داری نشان می‌دهد  $(p < ۰/۰۰۱)$ . سپس میزان CCL-2 در ساعت‌های مختلف با آزمون تعقیبی LSD و Paired t-test مورد مقایسه قرار گرفتند.

ارزیابی هماتولوژی: میزان لوکوسیت‌ها در ساعت-های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در مقایسه با ساعت صفر (قبل از مطالعه) افزایش معنی‌داری را نشان داد  $(p < ۰/۰۵)$  اما در روزهای ۷ و ۳۰ میزان لوکوسیت‌ها به میزان عادی برگشت.

تعداد مونوسیت‌ها نیز در طی زمان مطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان می‌دهد و این تغییرات در ساعت-های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و حتی روز ۷ نسبت به زمان شروع مطالعه از لحاظ آماری معنی‌دار بود. همچنین تغییرات سلول‌های هتروفیل در طی زمان از لحاظ آماری معنی‌دار بود و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری در مقایسه با ساعت صفر مطالعه نشان داد.

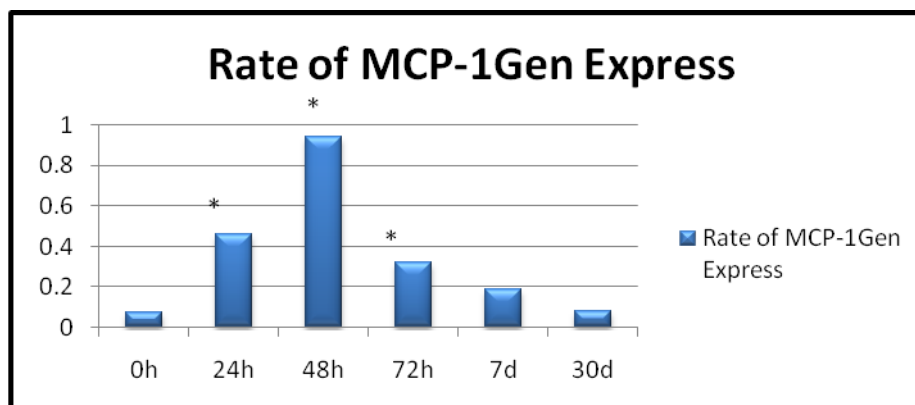
روز ۷ ( $23/5 \pm 62/4$ ) و روز ۳۰ ( $15/6 \pm 35/45$ ) اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی میزان بیان ژن MCP-1 در مایعات رویی حاصل از کشت سلول‌های PBMC: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن MCP-1 در ساعت ۲۴ ( $0/04 \pm 0/46$ ) بعد از مواجهه با داروی سورفاکتانت افزایش یافت ( $0/01 \pm 0/072$ ) و در ساعت ۴۸ بعد از تزریق دارو به حداکثر بیان خود رسید ( $0/12 \pm 0/94$ )، سپس میزان بیان آن کاهش یافت. آزمون مقایسه t-test اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نشان داد (شکل ۱).

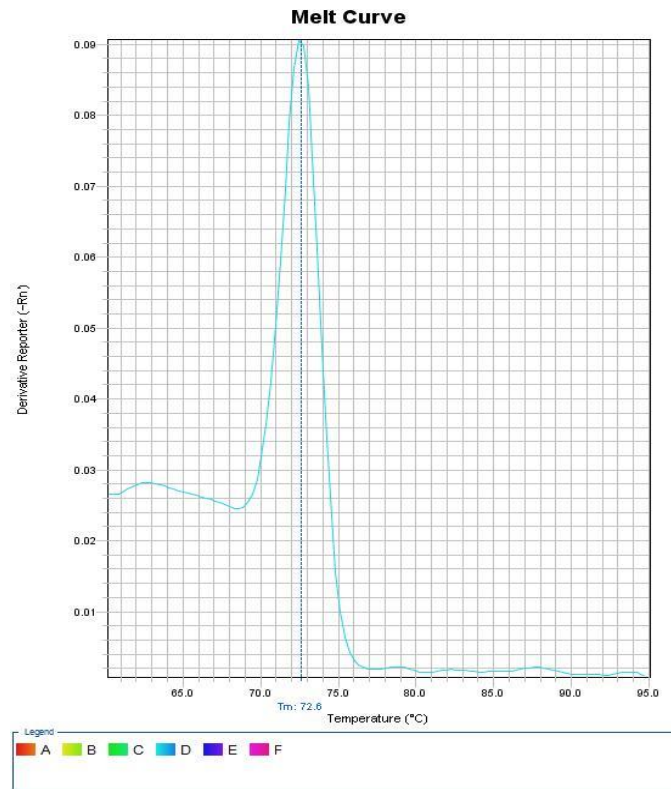
ارزیابی منحنی‌های ذوب: نتایج اختصاصی بودن پرایمرهای MCP-1 و  $\beta$ -actin را نشان می‌دهد که به صورت تک پیک نمایان می‌شود (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج حاکی از آن است که بین میزان MCP-1 در مقایسه قبل از تداخل دارویی و در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و روز ۷ بررسی اثرات دارویی تفاوت آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0/002$ ). میزان MCP-1 در ساعت ۴۸ بعد از تزریق دارو بیشترین افزایش را نشان داد.

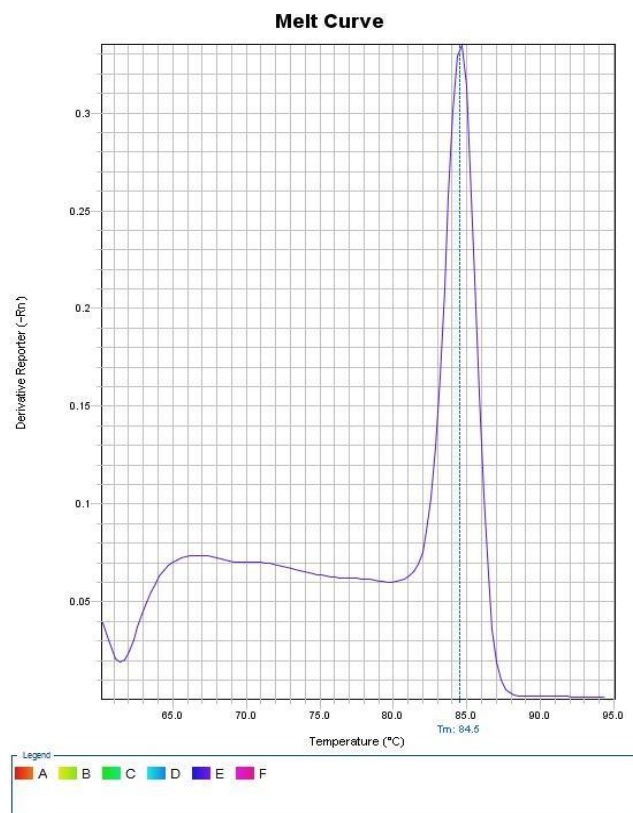
ارزیابی محتوای ایمنوگلوبولین E در سرم: بر اساس آزمون‌آماره Repeated Measure ANOVA میانگین IgE علیرغم افزایش نسبی در ساعت در طی زمان تغییرات معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0/05$ ). بر این اساس میزان ایمنوگلوبولین E بر حسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر در ساعت صفر (شروع مطالعه)، ( $18/4 \pm 440/36$ )، ساعت ۲۴ ( $44/23 \pm 484/12$ )، ساعت ۴۸ ( $62/16 \pm 490/43$ )، ساعت ۷۲ ( $15/2 \pm 500/64$ ).



شکل ۱- بیان ژن MCP-1 در PBMC خرگوش در پاسخ به سورفاکتانت ریوی. اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون t-test انجام شد. اختلاف معنی‌دار در سطح  $0/05$  با \* مشخص شده است.



شکل ۲- منحنی ذوب MCP-1



شکل ۳- منحنی ذوب  $\beta$ -actin

## بحث

می‌نمایند. افزایش مونوسیت و CCL2 همزمان با هم احتمالاً بیانگر نقش هدایتی در سیستم ایمنی بدن توسط داروی سورفاکتانت و متعاقباً اثرات دفاعی MCP-1 در بافت ریه است. تاثیر اجزای سورفاکتانتی بر روی سیتوکین‌های پیش التهابی و سلول‌های دفاعی بدن در شرایط مختلف متفاوت می‌باشد به طوری که در برخی مطالعات Sp-A نقش مهاری در آزادی سیتوکین‌های پیش التهابی به دنبال LPS کاندیدا در PBMC داشته است (۴).

یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعات قبلی همخوانی دارد به طوری که مطالعات El-Hage و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Park در سال ۲۰۰۱ و Eugenin در سال ۲۰۰۳ نشان دهنده آزادی CCL2 از سلول‌های آندوتلیوم عروقی ریه انسان (HMVEC Ls-) به دنبال تجویز داروی داروی ضد ایدز HIV-1 Tat protein می‌باشد که بر این اساس نقش حفاظتی CCL2 در مقابل اثرات توکسیک داروی گلو تامات و Tat را نشان می‌دهد (۴، ۵، ۱۵).

به طور کلی این پروتئین نقش مهمی در پاسخ بدن به دنبال التهاب ایفا می‌کند و در شنایابی اثرات توکسیک دارو در بدن می‌تواند کمک کننده باشد.

مطالعه Lin در سال ۲۰۰۶ نشان داد که دنبال تجویز لیزوفسفولیپیدها میزان بیان ژن CCL2 افزایش پیدا کرده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد، اما در مطالعه Takaishi و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان بیان ژن و محتوای CCL2 به دنبال تجویز FR ۱۶۷۶۵۳ کاهش یافته است (۱۱، ۲۲).

بر اساس مطالعه Goodyear و همکاران در سال ۲۰۱۰، سیتوکین پیش التهابی MCP-1 و مونوسیت‌های التهابی نقش مهمی در کنترل بیماری‌های عفونی باکتریایی ایفا می‌کنند (۶).

پروتئین CCL2 توسط انواع مختلفی از سلول‌ها شامل آندوتلیال، فیبروبلاست، اندوتلیال، ماهیچه نرم، مزانژیال، آستروسیت، مونوسیت و سلول‌های خونی تولید می‌شود اما مونوسیت‌ها و ماکروفاژها منبع اصلی تولید CCL2 هستند. این سلول‌ها برای واکنش ایمنی در گردش خون و بافت‌هایی مانند ریه مهم است. به دلیل نقش CCL2 در روند ایمنی‌زایی به دنبال تجویز دارو، اثرات آن بر روی تولید و ترشح ماکروفاژها و مونوسیت‌ها و اثرات متقابل فسفولیپیدها و MCP، بررسی اثرات سورفاکتانت طبیعی تهیه شده بر روی سیستم ایمنی بدن می‌تواند نقش مهمی در تعیین سیستم ایمنی بدن بعد از اخذ سورفاکتانت داشته باشد (۲۲، ۱۱).

از سوی دیگر مونوسیت‌ها که بزرگترین سلول در جریان خون محسوب می‌شوند، پروتازها را از لیروزوم‌ها آزاد می‌کنند و در تولید رادیکال اکسیژن و اکسید نیترژن که عوامل عفونی‌زا را از بین می‌برند، نقش مهمی دارند. مونوسیت‌ها همچنین سیتوکین‌هایی مانند اینترلوکین ۸ و MCP1 را تولید می‌کنند که لنفوسیت‌ها را فعال و روند التهاب را در جهت بهبود تحریک می‌کند (۲۲).

افزایش تعداد سلول‌های مونوسیت و لنفوسیت به دنبال تجویز دارو بیانگر افزایش قدرت سیستم دفاعی بدن در مقابله با تجویز دارو می‌باشد و به دنبال آن افزایش میزان MCP-1 در مایعات رویی حاصل از کشت سلول‌های PBMC و همچنین افزایش بیان ژن این سیتوکین بیانگر تاثیر داروی سورفاکتانت بر روی تولید این سیتوکین التهابی در جهت بهبود عملکرد دارو در بدن می‌باشد.

ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و سلول‌های ترشح کننده سیتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۸ و MCP1 نقش مهمی در تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی در بدن ایفا





وابسته به دوز باکتری و دوز دارو، نوع عامل پاتوژن و نحوه ورود عامل بیماری زا به بدن می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

شناخت سیتوکین MCP-1 و اثبات عملکرد آن به عنوان یک عامل مهم در سیستم دفاعی ریه در ارتباط با سلول‌های دفاعی ریه به دنبال درمان با سورفاکتانت می‌تواند چشم اندازی برای شناسایی مکانیسم اثر دقیق سورفاکتانت طبیعی در ریه در آینده باشد و استفاده از فرآورده‌هایی که خاصیت القاء‌کنندگی سیتوکین‌های دفاعی در ریه را داشته باشد، می‌تواند در بهبود شرایط بیماری کمک کننده باشد.

### منابع

1. Ainsworth S., Milligan D., 2002. Surfactant therapy for respiratory distress syndrome in premature neonates. *Respiration Journal*, 1(6): 417- 433.
2. Avery M., Mead J., 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *American Journal of Diseases of Children*, 97: 517-523.
3. Atalay C., Dogan N., Aykan S., Gundogdu C., Keles M.S., 2010. The efficacy of spironolactone in the treatment of acute respiratory distress syndrome-induced rats. *Singapore Medical Journal*, 51(6): 501.
4. El-Hage N., Gurwell J., Singh I., Knapp P., Nath A., Hauser K., 2005. Synergistic increases in intracellular Ca<sup>2+</sup>, and the release of MCP-1, RANTES, and IL-6 by astrocytes treated with opiates and HIV-1 Tat. *Glia*, 50: 91-106.
5. Eugenin E., Aversa T., Lopez L., Calderon T., Berman J., 2003. MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 85: 1299-1311.

بر این اساس اثرات ضدباکتریایی این پروتئین از طریق تنظیم ترشح اینترفرون گاما، مونوسیت‌ها و سلول‌های دندریتیک در مجاری هوایی می‌باشد. بر اساس مطالعه حاضر افزایش دوز درمانی سورفاکتانت در شرایط برون‌تنی می‌تواند سبب افزایش میزان تولید MCP-1 شود (۶).

بر اساس مطالعات اندرو و همکاران در دوز بالای باکتری بورخوردلیا مالئی در رت MCP-1 افزایش معنی‌داری را بعد از ۴۸ ساعت نشان داد و این افزایش مدت طولانی‌تری باقی ماند در حالی که در دوز پایین باکتری افزایش سیتوکین معنی‌دار نبود و بلافاصله بعد از چند ساعت کاهش یافت (۶).

به دلیل نقش CCL2 در روند ایمنی‌زایی داروهای ریوی و به دلیل اثرات فسفولیپیدها بر روی میزان آزاد سازی این ماده، بررسی اثرات سورفاکتانت طبیعی تهیه شده بر روی محتوای پروتئین می‌تواند نقش مهمی در تعیین سیستم ایمنی بدن بعد از اخذ سورفاکتانت داشته باشد.

در مطالعه تراینور و همکاران مشاهده شد که در موش‌هایی که ژن CCL2 در آنها حذف شده است میزان بروز عفونت ریوی افزایش یافته است که این افزایش همراه با کاهش اینترفرون گاما و افزایش IgE و Th2 همراه بوده است. به دلیل آزادی این پروتئین از ماکروفاژهای فعال شده و هدایت پاسخ ایمنی به سمت Th نقش مهمی در ایمنی ایفا می‌کند (۲۳).

در مطالعه حاضر میزان MCP-1 در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ بعد از تجویز دارو افزایش یافت که این افزایش با افزایش مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها همراه بود که این نتایج با مطالعات قبلی انجام شده بر روی سورفاکتانت‌های درمانی همخوانی دارد.

بر این اساس اثرات درمانی MCP-1 با تحریک مونوسیت و ماکروفاژ در بیماری‌های باکتریایی در شرایط خاصی ثابت شده است به طوری که این نقش



- monocyte chemotactin peptid-1 production. *European Respiration Journal*, 19: 1128-1135.
15. Park I., Wang J., Groopman J., 2001. HIV-1 Tat promotes monocyte chemoattractant protein-1 secretion followed by transmigration of monocytes. *Blood*, 97: 352-358.
  16. Quinones M.P., Estrada C.A., Jimenez F., Martinez H., Willmon O., Kuziel W.A., 2007. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. *Parasite Immunology*, 29(4): 211-217.
  17. Robin B., Cheryl A.C., 2006. Surfactant. *Newborn and Infant Nursing Review*, 6(2): 87-93.
  18. Rossi G., 1986. Bronchoalveolar lavage in the investigation of disorders in the lower respiratory tract. *European Journal of Respiratory Diseases*, 69: 293-315.
  19. Ritter U., Korner H., 2002. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 24(6): 295-301.
  20. Shin Y.S., Takeda K.W., Gelfand E.W., 2009. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 1(1): 10-18.
  21. Taeusch H.W., 2000. Treatment of acute (adult) respiratory distress syndrome. The Holy Grail of Surfactant Therapy. *Biology of the Neonate*, 77(1): 2-8.
  22. Takaishi H., Taniguchi T., Takahashi A., Ishikawa Y., Yokoyama M., 2003. High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, 305: 122-128.
  23. Traynor T., Kuziel W., Toews G., Huffnagle G., 2000. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal Immunology*, 164(4): 2021-2027.
  6. Goodyear A., Jones A., Troyer R., Bielefeldt-Ohmann H., Dow S., 2010. Critical protective role for MCP-1 in pneumonic *Burkholderia mallei* infection. *Journal of Immunology*, 184(3): 1445-1454.
  7. Gunther A., Schmidt R., Harodt J., Schmehl T., Walmrath D., Ruppert C., Grimminger F., Seeger W., 2002. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on biophysical and biochemical surfactant properties. *European Respiratory Journal*, 19: 797-804.
  8. Jeffrey A. W.H., Timothy E.W., 2002. Hydrophobic Surfactant Proteins lung function and Disease. *New England Journal of Medicine*, 347(26): 2141 -2148.
  9. Karol M., 1994. Animal models of occupational asthma. *European Respiratory Journal*, 3(7): 555-568.
  10. Keith C., Anuja S., Raymond B., Mark W., Fernando R., June L., Jerry J., 2000. Function and Composition of Pulmonary Surfactant and Surfactant-Derived Fatty Acid Profiles Are Altered in Young Adults With Cystic Fibrosis. *Laboratory and Animal Investigations*, 118(1): 174-184.
  11. Lin C., Chen C., Chen J., Lee H., 2006. Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism. *Journal of Cell Biochemistry*, 99: 1216-1232.
  12. Morton N., 1990. Exogenous surfactant treatment for the adult respiratory distress syndrome. *A Historical Perspective*, 45: 825-830.
  13. Griese M., 1999. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *European Respiration Journal*, 13: 1455-1476.
  14. Meloni F., Alberti A., Bulgheron A., Lupi A., Paschetto E., Marone B., Rodi G., Fietta A., Luisetti M., Baritussio A., 2002. Surfactant apoprotein A modulates IL-8 and



*Journal of Clinical Investigation*, 111: 1453-1455.

26. Wright J., Cosio M., Churg A., 2008. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology*, 295: L1-L15.

24. Veit J.E., Norbert K., Jens M. H., 2009. Therapeutic use of surfactant components in allergic asthma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology*, 379: 217-224.

25. Wright J.R., 2003. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense.

