بررسی تغییرات گلایکانهای سطح سلولی ماکروفاژها در بیماریهای ریوی شغلی

دکتر ابوالفضل برخورداری[1] ، پرفسور جان مک کلور
۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی یزد

چکیده

بیماریهای ریوی شغلی یکی از مهمترین و شایعترین بیماریهای ناشی از کار محسوب می شوند تغییرات سلولهای ماکروفاژ آلوئولی از دیرباز مورد توجه بوده و مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است ولی با توجه به معطوف شدن توجه محققان به اهمیت و نقش گلایکانها در پدیده های مختلف سلولی از یکطرف و فقدان اطلاعات جامع در خصوص نحوه بیان گلایکانهای سطح سلولی در ماکروفاژها و تغییرات آنها در بیماریهای ریوی شغلی باعث شد تا مطالعه جامعه بر روی بیماران مبتلا بعمل آید.

در این مطالعه از روش لکتین هیستوشیمی با استفاده از جامع ترین پانل لکتین برروی نمونه های بیوپسی ریه ۵۱ نفر از افراد طبیعی و بیمار انجام گرفت.

نتایج مطالعه نشان می دهد که نحوه بیان گلایکانهای سطح سلولی ماکروفاژها در افراد طبیعی و بیمار کاملاً متفاوت می باشد بطوریکه این سلولها در کلیه افراد نرمال بالکتین های LTA,UEA-1,SBA,VVA,DBA,AHA و AAA منفی و در افراد بیمار کلیه لکتین های فوق مثبت بودند.

نتایج تحقیق نشان می دهد که نحوه بیان گلایکانها در سلولهای ماکروفاژ افراد بیمار با افراد طبیعی متفاوت بوده و در افراد بیمار بطور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است بطوریکه تمایز مشخصی درخصوص گلایکو تایپ های سلولهای ماکروفاژ افراد طبیعی و بیمار مشاهده می شود این تمایز عمدتاً مربوط به قندهای بتاگالاکتوز ، ان – استیل گالاکتوزامین ، ان – استیل گلوکوزامین و فیوکوز می باشد که این امر می تواند بیانگر نقش گلایکانها در ایجاد بیماریهای ریوی شغلی باشد.

کلمات کلیدی : *لکتین هیستوشیمی ، بیماریهای ریوی شغلی ، گلایکانها*

مقدمه

بیش از ۱۰۰ سال پیش سلولهای درشت خوار یا ماکروفاژها شناسایی شدند. (۱) سلولهای ماکروفاژ ریوی نه تنها نقش فاگوسیتیک ـ دارند بلکه سلولهای تنظیم کننده و ترشحی نیز می باشند (۲). اینکه منشاء سلولهای ماکروفاژ عروق ریوی ، مغز استخوان (سلولهای مونوسیت) بود. و یا از سلولهای ماکروفاژ آلوئولی یا بین بافتی مشتق شده و سپس به فضای مویرگها مهاجرت می نمایند کاملاً مشخص نمی باشد. (۳) ولی نظریه غالب این است که مونوسیتها منشاء ماکروفاژها می باشند.(۴) مع ذلک تمایز سلولهای ماکروفاژ آلوئولی نیز در مطالعات نشان داده شده است.(۵) تحت شرایط نرمال تعداد کمی از سلولهای ماکروفاژ در فضای آلوئولی و در نزدیک سلولهای این تلیوم موجود هستند این سلولها با داشتن تعدادی لیزوزوم ، والوئل و گرانول در داخل سیتوپلاسم شناخته می شوند. اندازه این سلولها از نظر قطر بین ۴۰ـ۱۲ میکرون متغیر بود و ۱۹ــ۳٪ سلولهای آلوئولی را در افراد غیر سیگاری تشکیل می دهند.(۶) اندازه و تعداد این سلولها در افراد سیگاری افزایش یافته به طوری که اندازه آنها تا ۵۰ میکرن نیز می رسد.(۷) اساساً این سلولها در قسمتهای مختلف ریه از جمله آلوئول ، مجرای آلوئولی و قسمت مرکزی آسینی (acinus) موجود بود. ولی در نهایت به قسمت برونشیولها مهاجرت و سپس به ناحیه موکوسی- مژه ای mucociliory escalator مجرای هوایی میرسند.(۸)

سلولهای ماکروفاژ نقش مهمی در دفاع از سیستم تنفسی تحتانی در مقابل میکروارگانیسمها و ذرات استنشاق شده را عهده بوده و مسئول پاکسازی ریه از این ذرات می باشند.(۹) بنابراین در بیماریهای التهابی ریه از

جمله بیماریهای شغلی ریوی، ماکروفاژها از طریق تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن، آنزیمها و مقدار زیادی از سیتوکین های متعدد احتمالا مهمترین نقش را ایفا می نماید.(۱۰) سلولهای ماکروفاژ همچنین توانایی جوش خوردن و پیوستن با یکدیگر و تشکیل سلولهای غول پیکر (giant cells) را نیز دارند که نمونه بارز آن را می توان در بیماری شغلی بریلیوزیس مشاده نمود.(۱۱)

نقش سلولهای ماکروفاژ در بیماریزایی بیماریهای ریوی شغلی در مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفته است ولی نقش گلایکانهای سطح سلولی و نقش آنها در بیماریزایی آن در ریه و ایجاد بیماریهای مزمن محدود کننده مشخص می باشد بنابراین به منظور تعیین گلایکانهای سطح سلولهای ماکروفاژ از روش لکتین هیستوشیمی (lectin Histochemistry) استفاده گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تعداد ۲۰ نمونه ریه طبیعی و ۲۰ نمونه ریه افراد مبتلا به بیماریهای شغلی ریوی موجود در قسمت آرشیو بیمارستان مورد بررسی قرار گرفتند افرادی که از نظر بافت شناسی طبیعی بوده و یا تظاهرات کلینیکی در رابطه عوارض ریوی نداشته اند و همچنین افرادی که به علت بیماریهای غیر ریوی و یا حادثه فوت نموده اند و قبلا نیز هیچگونه سابقه بیماری نداشتند به عنوان طبیعی تلقی گردیده اند.

این مطالعه با استفاده از ۲۷ لکتین (biotinylated lectins) از هفت طبقه بندی اصلی قندها بر اساس ویژگی باند شدن (specificity) آنها انتخاب گردیدند (جدول شماره ۱).

نمونه های قالبگیری شده در پارافین جامد توسط میکروتوم به ضخامت پنج میکرون مقطع گیری شده و سپس بر روی لامهای از قبل آماده شده (APES-Coated slides) قرار داده شدند. (۱۲) در این مطالعه از روش لکتین هیستوشیمی به روش استاندارد (۱۳) بشرح ذیل استفاده گردید بطوریکه پس از قرار دادن اسلایدها در اجاق ۶۰ درجه سانتیگراد و عبور دادن آنها در گزیلن (سه مرحله) پارافین زدایی شده و سپس در الکل آبگیری گردیدند. به منظور توقف فعالیت پروکسیداز داخلی نمونه ها در محلول متانول حاوی اسید کلریک و هیدروژن پراکسیداز به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند بعد از شستن مختصر اسلایدها با آب و TBS(Tris Buffered Saline) آنها را داخل محول TBS(pH ۷/۶ و ۳۷درجه سانتیگراد) حاوی کریپسین و کلرید کلسیم به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم.

سپس اسلایدها را در آب سرد قرار داده تا فعالیت آنژیمی آن متوقف شود و در ادامه داخل محلول (TBS) (سه مرحله و هر کدام ۵ دقیقه) قرار می دهیم. بعد از تمیز کردن اطراف نمونه موجود با پیپت سه قطره محلول لکتین بیوتینه روی نمونه ها با غلظت ده میکروگرم بر میلی لیتر و آنها را داخل محفظه مرطوب در حرارت معمولی اتاق قرار می دهیم. در این مرحله فقط محلول TBS روی نمونه کنترل قرار می دهیم. بعد از ۳۰ دقیقه اسلایدها را بیرون آورده و با محلول TBS و کلرید کلسیم به آرامی شسته و سپس آنها را داخل محلول TBS و کلرید کلسیم (سه مرحله و هر مرحله ۵ دقیقه) قرار می دهیم تا خوب شسته شوند و سپس بر روی هر نمونه چند قطره اویدین پروکسیداز (avidin proxidase) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر در محلول ۰/۱۲۵ مول TBS ریخته و برای مدت یکساعت در داخل محفظه مرطوب قرار می دهیم و بعد از آن اسلایدها به آرامی با TBS شسته و آنها در TBS(سه مرحله و هر مرحله ۵ دقیقه) عبور میدهیم. بعد اسلایدها را در محلول DAB (۲۸۰ میلی لیتر TBSو۲۰ میلی لیتر DAB و۴۵ میکرولیتر هیدروژن پروکسیداز) برای مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم تا رنگ مربوطه بصورت قهوه ای متمایز گردد. بعد از شستن مختصر با آب به منظور افتراق هسته سلول با سیتوپلاسم انرا داخل محلول متیل گزین (۳۰ ثانیه) قرار داده و پس از شستن با آب آنها را به منظور آبگیری داخل الکل در سه مرحله (الکل ۷۰ درجه و دو مرحله الکل مطلق) قرار می دهیم و در نهایت آنها را از محلول گزیلن عبور داده تا الکل آن شسته و

جذب گردد در نهایت مقطع رنگ شده بافت را که بر روی لام قرار دارد بوسیله ماده ای به نامه XAM پوشانده و بر روی آن لامل قرار میدهیم. اسلایدهای آماده شده با استفاده از میکروسکوپ مشاهده و شدت باند شدن لکتین بصورت ۱ (ضعیف)، ۲ (متوسط)، ۳ (قوی) و ۴ (بسیار قوی) و ۰ (منفی) رتبه بندی گردید.

نتایج

گرچه شکل، اندازه و محل سلولهای ماکروفاژ مشخص و قابل افتراق با سایر سلولهای موجود در فضای آلونویی می باشد ولی به منظور تشخیص قطعی آنها از مارکر اختصاصی CD-68 گردید. بطور کلی اندازه و تعداد سلولها در ریه افراد طبیعی کم و کوچک بودند در حالیکه در بیماران مبتلا تعداد سلولهای ماکروفاژ افزایش چشمگیری یافتند. نمونه های کنترل در هر دو روش لکتین هیستوشیمی و ایمنوهیستوشیمی در همه نمونه ها منفی بودند. به منظور افزایش اعتبار و روایی، ابتدا ده درصد از اسلایدهای مورد پژوهش به روش نمونه گیری تصادفی تعیین و روایی درونی و بیرونی آن مورد بررسی قرار گرفت در روش inter-observer ابتدا اسلایدها توسط محقق و سوپروایزر بصورت جداگانه با میکروسکوپ مشاهده و نتایج در جداول جداگانه ثبت گردیدند. نتایج حاصله نشان داد که احتمال توافق و ضریب تصحیح در سطح ۰/۰۱ بین نتایج دو مشاهده گر ۰/۹۵۱ بوده اند بالا بودن ضریب تصحیح بیانگر معنی دار بودن روایی بیرونی می باشد به منظور تعیین میزان روایی درونی اسلایدهای انتخاب شده کد گذاری و در سه زمان متفاوت و به فاصله یکماه از هم توسط پژوهشگر مشاهده و نتایج در جدول ثبت میشدند. پس از مقایسه نتایج با استفاده از تست آماری ضریب همبستگیمیزان روایی درونی بسیار بالا بود بطوریکه ضریب تصحیح بین دفعه اول و دوم برابر با ۰/۹۶۵، بین دفعه اول و سوم ۰/۹۷۴ و بین دفعه دوم و سوم ۰/۹۸۴ بودند.

نتایج حاصله از لکتین هیستوشیمی نشان دادند که نوع و میزان قند موجود بر روی سطح سلولهای مربوطه در افراد مختلف مشابه بوده و اختلاف بسیار جزئی بودند به عبارتی گلایکانهای موجود در کلیه افراد نرمال تابلوی مشابهی داشتند. از طرفی باند شدن قندهای موجود با اکثر لکتین ها بیانگر حضور طیف وسیعی از گلایکانهای سطح سلولهای ماکروفاژ می باشند بطوریکه از ۲۷ مارکر مورد استفاده ۱۷ مارکر مثبت و ۱۰ مارکر دیگر منفی بودند.

کلیه لکتین های گروه اول یعنی L-PHA, e-PHA, LCA, PSA, HHA, NPA, GNA و گروه دوم (LEA,PAA,S-WGA) گروه پنجم (SNA, MAA) مثبت بودند در حالیکه لکتین های گروه ششم (BSA-1B4, PTL-I) و گروه هفتم (LTA, UEA-I, AAA) همگی منفی بودند.

در گروه سوم AHA منفی ولی ECA مثبت بود. همچنین در گروه پنجم WFA, HPA, MPA مثبت و سایر لکتینها یعنی PTL-II, VVA,SBA, DBA منفی بودند.

بحث و نتیجه گیری

بررسی گلیکوپروتئین ها و گلایکانهای سطح سلولی و تغییرات آنها در بیماریهای فیبروز ریوی و نقش آنها در بیمایزایی بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است.اخیراً اهمیت و نقش گلایکانها در فرآیندهای مختلف از جمله تمایز سلولی ، چسبندگی سلولها به یکدیگر و ماده زمینه ای مورد توجه محققین قرار گرفته است لذا با توجه به این مهم و همچنین بیان گلایکانهای سطح سلولهای ماکروفاژ در بیماریهای شغلی ریوی از ضرورت بالایی برخوردار است. به منظور تعیین نحوه تغییر گلایکانها ی سطح سلول های ماکروفاژ در بیماریهای شغلی ، ابتدا ضروری است تا نحوه توزیع گلایکانها را در وضعیت طبیعی تعیین و مشخص نمود تا دید وسیع و جامعی از ساختار گلایکانهای ریه را در ریه طبیعی و حالت پاتولوژیک بیماری به دست آورد بنابراین در این مطالعه برای اولین بار گلایکانهای

سطح سلولی ماکروفاژها در حالت نرمال تعیین و تغییرات آنها در حالت بیماری با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت تنوع قندهای موجود در سطح سلوم می طلبد که از طیف جامع و وسیع مارکرهای مربوطه جهت شناسایی قندهای گوناگون استفاده گردد. به طور کلی با توجه به نتایج تحقیق ، سلولهای ماکروفاژ در ریه نرمال حاوی قند مانوز و قندهای انتهایی غیر کاهنده (non-reducing) بویژه آلفا ۱و ۳، ان – استیل لاکتوزامین و ان- استیل چیتوبیوز ، بتاگالاکتوز بویژه زنجیره تیپ دو (بتا ۱و ۴)، ان – استیل گالاکتوزامین و سیالیک اسید می باشد در حالی که سایر قندها از جمله تیپ یک بتا گالاکتوز (بتا ۱و ۳)، آلفا گالاکتوز ، ان – استیل گلوکوزامیی و فیوکوز غیر قابل دسترس بودند . اختلاف در شدت رنگ حاصله از باند شدن قندها با لکتین های گروه مانوز بیانگر حضور انواع مختلف ساختمان با باند ان (N-linked می باشد در ریه افراد مبتلا به بیماریهای شغلی علاوه بر تغییر در اندازه،تعداد سلولهای ماکروفاژ افزایش قابل توجهی نشان داشتند بررسی گلایکانهای سطح سلولی نیز بیانگر تغییرات قابل توجهی دراین سلولها میباشند به نحوی که بعضی از قندها در حالت پاتولوژیک کاهش و بعضاً ناپدید شده و یا غیر قابل دسترسی بودند و بلعکس بعضی از قندها در حالت بیماری ظاهر شدند بطوری که قندهای آلفا مانوز ۱و ۳ و ان – استیل لاکتوزامین کاهش ولی قند آلفا مانوز ۱و ۱۲ فزایش نشان داده اند بتا گالاکتوز از روی زنجیره تیپ یک (۱ و ۳) آلفا گالاکتوز و قندهای فیوکوز که در سلولهای افراد نرمال غیر قابل دسترس بودند در افراد بیمار به طور قوی بیان شدند بنابراین تغییر در گلیکولیز شدن سلولی ممکن است یک تغییر فتوتیپی رایج در فیبروتیک شدن بافت ریه در بیماریهای مزمن محدود کننده ریه باشند لذا مطالعه بعدی در تعیین و شناسایی ژنهای موثر در این فرایند می تواند نقش مهمی را در پیش گیری و ایجاد بیماریهای مزمن محدود کنند ریه از جمله بیماریهای شغلی ریوی ایفا نماید.

جدول ۱: گروههای لکتین مورد استفاده در این و خصوصیات باند شدن آنها با هیدروکربورها

Group	Specificity	Lectins
1	α-Mannose and complex N-glycans	GNA, NPA, HHA, ConA, PSA, LCA, lPHA, ePHA
2	Linear and branched oligomers of N-acetyllactosamine: di-N-acetyl chitobiosyl sequences	LEA, PAA, sWGA
3	β-Galactosyl termini	AHA, ECA, MPA
4	α-2-Deoxy,2-acetamido-galactose, in various linkages	HPA, PTL-II, WFA, DBA, VVA, SBA
5	α-Galactosyl	PTL-I, BSA-IB_4
6	α-N-Acetylneuraminyl (and other sialyl) termini	SNA, MAA
7	α-L-Fucosyl termini	UEA-I, LTA, AAA

جدول ۲ : اسامی لکتین های مورد استفاده در این مطالعه و منشاء وخصوصیات باند شدن آنها با هیدروکربورها

Lectin	Origin/Source	Major specificity
GNA	*Galanthus nivalis* (snowdrop)	Non-reducing terminal α-D-mannose, especially the mannosyl α1,3 mannose linkage
NPA	*Narcissus pseudonarcissus*(daffodil)	α 1,6-Mannose
HHA	*Hippeastrum* hybrid (amaryllis)	α 1,2, α 1,3 and α 1,6-Mannose
ConA	*Canavalia ensiformis* (Jackbean)	α -glucosyl, α-mannosyl residues and/or bi-antennary comlex N-glycans (bisected and non-bisected)

ادامه جدول ۲ : اسامی لکتین های مورد استفاده در این مطالعه و ....

Lectin	Origin/Source	Major specificity
PSA	*Pisum sativum* (garden pea)	α -D-Mannose in non-bisected bi/tri antennary, complex N-linked sequences with core fucosylation
LCA	*Lens culinaris* (lentil)	α -D-Mannose in non-bisected bi/tri antennary, complex N-linked sequences
ePHA	*Phaseolus vulgaris* (erythroagglutinin) (kidney bean)	Bi/tri -antennary, bisected complex N-linked sequences
lPHA	*Phaseolus vulgaris* (leukoagglutinin) (kidney bean)	Tri/tetra-antennary, non-bisected complex N-linked sequences
LEA	*Lycopersicon esculentum* (tomato)	$(\text{-4GlcNAc}\beta1\text{-})_{2\text{-}4}$ and β1,4GlcNAc oligomers
sWGA	*Triticum vulgaris* –succinylated	$(\text{Gal}\beta1,4\text{GlcNAc}\beta1,\text{-})_n$ and GalNAc
PAA	*Phytolacca americana* /pokeweed root	$(\text{-4GlcNAc}\ \beta1\text{-})_n$
AHA	*Arachis hypogaea* (peanut)	Galβ1,3GalNAcα1-> Galβ1,4GlcNAcβ1-
ECA	*Erythrina cristagalli* (coral tree)	Galβ1,4GlcNAcβ1-
MPA	*Maclura pomifera* (osage orange)	Galβ1,3GalNAcα1>GalNAcα1
WFA	*Wisteria floribunda* (wisteria)	GalNAcα1,6Galβ1-> GalNAcα1,3Galβ1-
HPA	*Helix pomatia* (roman snail)	GalNAcα1-
DBA	*Dolichos biflorus* (horse gram)	GalNAcα1,3(L-Fucα1,2)Galβ1,3/4GlcNAc β1-
SBA	*Glycine max* (soy bean)	Terminal GalNAcα-1> Galα1
VVA	*Vicia villosa* (hairy vetch)	GalNAcα1-Ser/Thr and GalNAcα1,3Galβ1-
PTL-II	*Psophocarpus tetragonolobus*	Galβ1-3GalNAcα1>GalNAcβ13GlcNAcα1>LacNa
PTL-I	*Psophocarpus tetragonolobus*	Galα1-
BSA-IB_4	*Griffonia simplicifolia*	Galα1,3Galβ1,4GlcNAcβ1-
SNA	*Sambucus nigra* (eldertree bark)	NeuNAcα2,6Gal/GalNAc
MAA	*Maackia amurensis*	NeuNAcα2,3Gal β1-
UEA-I	*Ulex europaeus* (gorse)	L-Fucα1,2Galβ1,4GlcNAc β1-
LTA	*Tetragonolobus purpureus* (lotus)	α-L-fucosyl termini (especially where clustered)
AAA	*Anguilla anguilla* (eel)	α-L-fucosyl termini and fucosylated type I chains