

## اثر هم افزایی سیتوکین‌ها و اینترفرون گاما و ویتامین D3 بر تمایز سلولهای لوسمیک تحت درمان با داروهای سیتوتوکسیک

فرهاد ذاکر\* Ph.D.، جعفر صالحیان عمران\*\* M.Sc.، مسعود سلیمانی\*\*\* Ph.D.

### چکیده

**هدف:** اثر هم افزایی سیتوکین‌ها و اینترفرون گاما و ویتامین D3 بر تمایز سلولهای لوسمیک تحت درمان با داروهای سیتوتوکسیک.

**روش بررسی:** سلولهای رده HL<sub>60</sub> به عنوان مدل لوسمی حاد پرومیلوسیتی به مدت ۵ روز در معرض غلظت‌های مشخص از داروها و سیتوکین‌ها شامل فاکتور رشد گرانولوسیتی مونوسیتی (GM-CSF) و اینترفرون گاما (INF- $\gamma$ )، ویتامین D3 (Vit-D3) و داروهای سیتوتوکسیک سیتوزین آرابینوزاید (Ara-c) و وین کریستین (VIN) به صورت تنها و ترکیبی قرار گرفتند. جهت بررسی تکثیر و تمایز سلولی از شمارش سلولی، رنگ‌آمیزی رایت و پراکسیداز و آزمون احیای NBT استفاده شد. بروز آنتی ژنهای CD<sub>14</sub>، CD<sub>11b</sub> و CD<sub>45</sub> با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال به روش فلوسیتومتری انجام شد.

**یافته‌ها:** در غلظت‌های توکسیک، کاهش تکثیر سلولی در تمامی داروها به تنهایی و در ترکیب با Vit-D3 مشاهده شد. بیشترین کاهش در ترکیب Vit-D3 توأم با سیتوکین‌ها و داروهای سیتوتوکسیک مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). تمامی داروها به صورت تنها و ترکیبی با Vit-D3 اثر تمایزی روی سلولها داشتند ( $P < 0.05$ ) به جز وین کریستین که بصورت تنها اثر تمایزی نداشت. حداکثر تمایز سلولی در سلولهای تحت درمان با Vit-D3 و سیتوکین‌ها با یا بدون استفاده از داروهای سیتوتوکسیک از نظر مرفولوژی، درصد NBT و بروز آنتی ژن CD<sub>11b</sub> به سمت رده نوتروفیلی مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** مشاهدات نشان داد که ترکیب سیتوکین‌ها به همراه Vit-D3 در افزایش تمایز سلولهای لوسمیک موثر بوده است. ضمناً ترکیب داروهای سیتوتوکسیک در غلظت مطلوب با سیتوکین‌ها و Vit-D3 نه تنها از شدت تمایز نمی‌کاهد بلکه کاهش پرولیفراسیون سلولی را تشدید می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** لوسمی حاد پرومیلوسیتی، تمایز درمانی، ویتامین D3، سیتوکین‌ها، داروهای سیتوتوکسیک.

دریافت مقاله: ۸۳/۵/۴، اصلاح مقاله: ۸۵/۴/۶، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۲۳

کچ استادیار گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

\* مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

\*\* آزمایشگاه بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

آدرس پست الکترونیکی: Soleim\_m@modares.ac.ir

## مقدمه

لوسمی حاد از جمله نوع پرومیلوسیتی جزء بیماری‌های بدخیم خونی می‌باشد. در این بیماری ابتدا اختلال در سلول‌های پیش‌ساز خونی به وجود می‌آید و باعث ناهنجاری در عملکرد سایر اعضای بدن نیز می‌گردد و در نهایت عوارض بسیار وخیمی در بیمار ایجاد می‌نماید. تکثیر زیاد و غیر قابل کنترل سلول‌های خونساز اولیه در مغز استخوان همراه با عدم تمایز این سلول‌ها به رده بالغ، باعث تجمع فراوان سلول‌های بلاست بدخیم در مغز استخوان و در نهایت خون می‌شود. (۱)

از برنامه‌های درمانی که تا به امروز مورد استفاده قرار گرفته است، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌باشند. از داروهای سیتوتوکسیک به منظور از بین بردن سلول‌های بدخیم در طیف وسیعی استفاده می‌شود، اما مهمترین نقص این روش از بین رفتن درصد زیادی از سلول‌های سالم خونساز به همراه سلول‌های بدخیم می‌باشد. همچنین اثرات جانبی این داروها بر روی بافت‌های مختلف دیگر نیز مطرح می‌باشد؛ ضمن اینکه پس از بهبودی بیمار، به جهت حضور مخفی کلون بدخیم، عود مجدد بیماری مطرح است و سلول‌های بدخیم باقیمانده مجدداً تکثیر می‌یابند. (۲،۳) در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای جهت یافتن داروهایی که بتوانند به جای از بین بردن سلول‌های بدخیم، باعث تکثیر و تمایز آنها به سمت رده بالغ بشوند، انجام شده است. روش دیفرانسیاسیون تراپی یا تمایز درمانی در دهه اخیر مورد توجه و استفاده فراوانی قرار گرفته است. از جمله مواد مورد استفاده در این روش، می‌توان به مشتقات ویتامین A و ویتامین D و همچنین سیتوکین‌ها همانند اینترلوکین‌ها، اینترفرون‌ها، فاکتورهای رشد و غیره همراه با داروهای سیتوتوکسیک و با استفاده از اشعه درمانی که به صورت ترکیب درمانی مورد استفاده قرار گرفته اند (۴-۶) اشاره کرد در حال حاضر درمان موفقیت‌آمیز لوسمی حاد پرومیلوسیتی و دیگر انواع لوسمی حاد با استفاده از عوامل تمایزدهنده و داروهای ایجاد کننده مرگ سلولی یا Apoptosis، مسیرهای نوینی را در تحقیقات بیولوژیک و مولکولی در شناخت و درمان لوسمی‌ها گشوده است. (۷-۱۰)

در دهه‌های اخیر با تهیه رده‌های سلولی مختلف لوسمیک، استفاده

از کشت سلول در محیط خارج بدن، مشاهده تأثیر انواع داروها و بررسی سلول‌ها از لحاظ تغییرات در ساختار سلولی و مولکولی آنها، مطالعات در زمینه لوسمی‌ها رو به افزایش است. در این تحقیق نیز با استفاده از رده سلولی HL60 به عنوان مدل لوسمی حاد پرومیلوسیتی، تأثیر داروها و ویتامین D3 و سیتوکین‌های اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) و فاکتور رشد گرانولوسیتی-مونوسیتی (GM-CSF) و داروهای سیتوتوکسیک شامل وین کریستین و سیتوزین آرابینوزید به تنهایی و به صورت ترکیب مورد بررسی قرار گرفته و شاخص‌های تکثیر و تمایز سلولی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## روش بررسی

**کشت سلولی و اثر داروهای مختلف.** رده سلولی HL60 توسط دکتر ذاکر هدیه شد و در فلاسک کشت سلول با حجم ۲۵ میلی لیتر در محیط کشت RPMI (Sigma) حاوی ۱۰٪ سرم گوساله جنینی (FBS, Gibco) به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Sigma) در فشار ۵٪ CO2 کشت داده شد. داروهای مورد نظر در رقت‌های مختلف تهیه شد و سپس در چاهک‌های پلیت کشت سلول حاوی سوسپانسیون سلولی که در هر میلی لیتر از محیط کشت شامل  $10^5$  سلول بودند، به تنهایی و به صورت ترکیب همراه با گروه کنترل بدون دارو، در غلظت‌های مشخص به مدت ۵ روز اثر داده شدند. غلظت داروها پس از آزمایشات مختلف و بهینه کردن شرایط کشت به دست آمد:

(Novartis) نانوگرم در میلی لیتر  $100 = \text{GM-CSF}$  و  $10^{-7} = \text{Vit-D3}$  (Sigma) مول

(Richter) میکروگرم در لیتر  $0.02 = \text{Vincristin(VIN)}$  و  $1000 = \text{IFN-}\gamma$  واحد در میلی لیتر (Imukin)

(Pharmacia)  $0.0001 =$  میکروگرم در میلی لیتر  $= \text{Cytosine Arabinoside(Ara-C)}$

شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار انجام گردید و همچنین درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ تریپان بلو (Merck) تعیین شد. از غلظت‌های غیر سیتوتوکسیک داروها در آزمون‌ها استفاده شد.

**بررسی مرفولوژی و رنگ آمیزی سلول‌ها.** پس از اثر داروها به مدت ۵ روز، از سوسپانسیون سلولی گروه کنترل و سایر چاهک‌های حاوی سلول که در آن دارو تأثیر داده شده بود، نمونه‌برداری شد و توسط دستگاه سیتو اسپین (Shandon) از آنها

**محاسبات آماری** . داده‌ها پس از جمع‌آوری و دسته‌بندی توسط نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. در این تحقیق اعداد p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

**اثرات داروها به تنهایی از نظر تکثیر و تمایز**. در تأثیر داروها به تنهایی با توجه به جدول ۱ بیشترین تغییرات مرفولوژیک، در سلول پراکسیداز مثبت و سلول NBT مثبت مربوط به ویتامین D3 می‌باشد که به سمت بلوغ نوتروفیلی است. از سیتوکین‌ها GM-CSF و از داروهای سیتوتوکسیک، سیتوزین آرابینوزید بیشترین تمایز را نشان دادند که در مقایسه با کنترل معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). وین کریستین فاقد تمایز بود و سلولهای تحت تأثیر اینترفرون گاما تمایز مونوسیتی را نشان دادند. تمام داروها باعث کاهش تکثیر سلولی نسبت به گروه کنترل شدند که شدت این کاهش در ویتامین D3 بیشتر بود ( $P < 0/05$ ) و درصد سلولهای زنده خوب بود.

**اثرات داروها به صورت ترکیبی از نظر تکثیر و تمایز**. در تأثیر داروها به صورت ترکیبی با توجه به جدول ۲ بیشترین تغییرات مرفولوژیک در سلول پراکسیداز و سلول NBT مثبت مربوط به ترکیب سه داروی GM-SF، IFN- $\gamma$ ، Vit-D3 بود که نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان داد. ( $P < 0/05$ ) ترکیب سه داروی فوق به همراه داروهای سیتوتوکسیک با تمایز نیز همراه بود. در ترکیب داروها همچنان کاهش تکثیر سلولی نسبت به کنترل مشاهده گردید که بیشترین کاهش در مورد ترکیبات چهار دارویی یعنی همراه با داروهای سیتوتوکسیک بود. ( $P < 0/05$ ) در بررسی دقیق مرفولوژیکی با توجه به جدول ۳ بیشترین اثر تمایزی در ترکیب سه دارویی IFN- $\gamma$ ، Vit-D3 و GM-CSF مشاهده گردید که انواع سلولهای تمایز یافته به تفکیک ذکر شده است. ترکیب داروهای فوق با داروهای سیتوتوکسیک نتایج یکسان داشت. تغییرات مرفولوژیک، بلوغ سلولها را به سمت رده نوتروفیلی نشان داد که بیشترین سلولهای بالغ به ترتیب سلولهای نوتروفیلی باند، متامیلوسیت و میلوسیت بودند.

گستره سلولی تهیه شد. سپس لامها با استفاده از رنگ راییت گیمسا (Merck) و رنگ پراکسیداز (Sigma) رنگ‌آمیزی شدند تا تغییرات مرفولوژی سلولها به سمت سلولهای بالغ نوتروفیل یا مونوسیتی و اثر تمایزی داروها بررسی گردد. سلولهای HL<sub>60</sub> در محیط کشت بدون تأثیر دارو عمدتاً از پرومیلوسیت و تعداد کمی میلوبلاست تشکیل شده است.

### آزمایش احیای NBT: Nitro blue tetrazolium .

به منظور سنجش تمایز سلولهای مجاور شده با ترکیبات دارویی و ارزیابی مرحله‌ای فاگوسیتوز، از آزمایش فوق استفاده شد. پس از تأثیر دارو به مدت ۵ روز، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در لوله آزمایش ریخته شد و هم حجم آن محلول تازه (Sigma) NBT ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به لوله اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در این مدت سلولهای تمایز یافته، پس از شروع مسیر متابولیکی شده زرد رنگ هگزوز منو فسفات می‌توانند NBT بلع و شفاف را به ماده‌ای آبی رنگ به نام فورمازان تبدیل نمایند. سپس تعداد سلولهای رنگ گرفته شمرده شده، درصد آنها گزارش می‌شود.

### بررسی شاخص‌های سلولی . با استفاده از دستگاه

فلوسیتومتری (Becton Dickinson) و آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر علیه شاخص‌های سلولی CD<sub>45</sub> (DAKO)، CD<sub>14</sub>، CD<sub>11b</sub> جمعیت سلولی از لحاظ دارا بودن این شاخص‌های تمایزی پس از تأثیر داروها در ۵ روز، در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. بروز CD<sub>11b</sub> شاخص تمایز نوتروفیلی، CD<sub>14</sub> شاخص تمایز مونوسیتی و CD<sub>45</sub> شاخص تمایز لکوسیتی است. ابتدا لوله‌های حاوی یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی که در مجاورت داروهای مورد نظر قرار گرفته بودند را سانتریفوژ کرده، پس از دور ریختن محلول رویی دو بار شستشو با بفر فسفات انجام گردید. در انتها به رسوب سلولی ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال بر علیه شاخص‌های فوق اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، دو بار شستشو با بفر فسفات انجام شد و در پایان یک میلی‌لیتر بافر به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد تا سوسپانسیون یکنواخت سلولی ایجاد شود. نمونه آماده به دستگاه داده شد و شدت فلورسانت اندازه‌گیری گردید.

جدول ۱: مقایسه شمارش سلولی، تغییرات مرفولوژیک، پراکسیداز و NBT مثبت داروها به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل پس از ۵ روز در سلولهای HL<sub>60</sub>.

دارو	تعداد سلول در هر میلی لیتر	تغییرات مرفولوژیک	سلول NBT مثبت	سلول پراکسیداز مثبت
کنترل	۱۶۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۴	۱	۳
ویتامین D3	۱۱۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۱۵	۹	۱۰
گاما اینترفرون	۱۲۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۸	۴	۶
فاکتور رشد گرانولوسیتی-مونوسیتی	۹۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۳۰	۱۴	۴
سیتوزین آرابینوزید	۱۱۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۳۵	۲۷	۲۳
وین کریستین	۸۵×۱۰ <sup>۴</sup>	۸۷	۴۰	۵۵

جدول ۲: مقایسه شمارش سلولی، تغییرات مرفولوژیک، پراکسیداز و NBT مثبت داروها به صورت ترکیبی با گروه کنترل پس از ۵ روز در سلولهای HL<sub>60</sub>.

دارو	تعداد سلول در میلی لیتر	تغییرات مرفولوژیک تعداد ۱۰۰ سلول	سلول NBT مثبت	سلول پراکسیداز مثبت
Control	۱۶۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۴	۱	۳
IFN-γ, Vit-D3	۸۵×۱۰ <sup>۴</sup>	۸۵	۴۷	۵۸
Vit-D3 + GM-CSF	۱۱۵×۱۰ <sup>۴</sup>	۹۳	۵۰	۶۳
GM-CSF و IFN-γ, Vit-D3	۱۲۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۹۸	۹۲	۹۵
Ara-C, Vit-D3, GM-CSF و IFN-γ	۱۰۵×۱۰ <sup>۴</sup>	۹۴	۸۶	۸۹
Vin و IFN-γ, Vit-D3, GM-CSF	۱۰۰×۱۰ <sup>۴</sup>	۹۳	۸۳	۸۷

جدول ۳: مقایسه تمایز مرفولوژیک سلولهای درمان شده با دارو به صورت تنها و ترکیبی با گروه کنترل پس از ۵ روز در سلولهای HL<sub>60</sub>.

دارو	میلوبلاست	پرومیلوسیت	میلوسیت	متامیلوسیت	باند سل	نوتروفیل
Control	۵	۹۳	۲	-	-	-
Vit-D3	۳	۱۱	۱۶	۴۰	۲۴	۶
IFN-γ, Vit-D3	۲	۲	۱۵	۴۲	۳۰	۹
Vit-D3, GM-CSF	۲	۲	۱۲	۳۲	۳۷	۱۵
IFN-γ, Vit-D3, GM-CSF	۱	۱	۳	۱۷	۳۰	۴۸
IFN-γ و Vit-D3, Ara-c, GM-CSF	۱	۲	۴	۱۷	۲۹	۴۷
IFN-γ, Vit-D3, GM-CSF	۱	۳	۷	۱۸	۲۶	۴۵

مشاهده شد، با استفاده از فلوسیتومتری که روش کمی می‌باشد، میران بروز شاخص‌های CD<sub>14</sub> و CD<sub>11b</sub> و CD<sub>45</sub> بررسی شد.

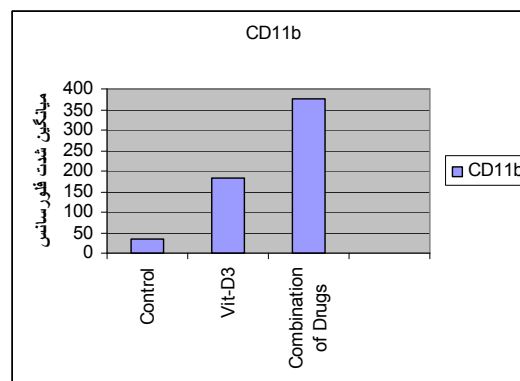
اثرات داروها از نظر شاخص‌های سلولی. از آن جایی که بیشترین تمایز سلول در ترکیب IFN-γ, Vit-D3, GM-CSF

ایمنی تراپی و ژن درمانی برنامه‌های جدید در درمان لوسمی حاد می‌باشند. (۱-۳)

در این تحقیق ویتامین D3 بیشترین تمایز سلولی را در سلولهای لوسمیک HL60 به سمت رده بالغ نترفیلی نشان داد. مکانیسم اثر آن از طریق کاهش پروتئین (PML/RAR) در سلولهای سرطانی است. اخیراً از ترکیبات ارسنیک با مکانیسم توقف رشد و القاء آپتوز در سلولهای بدخیم بیماران لوسمی‌های پرومیلوسیتی استفاده می‌شود که یکی از مکانیسم اثر آن مشابه اثر ویتامین D3 و ATRA می‌باشد. (۸، ۱۱-۱۳)

سیتوکینها از تنظیم کننده‌های بیولوژیک هستند و GM-CSF تمایز نترفیلی و اینترفرون گاما تمایز مونوسیتی از خود نشان داد. این نتایج با آنچه قبلاً مستقیماً روی سلولهای بلاست لوسمیک بیماران گزارش شده است انطباق دارد. (۱۴،۲۰) از داروهای سیتوتوکسیک فقط سیتوزین آرابینوزاید تمایز نترفیلی نشان داد و وینکریسین اثری از خود نشان نداد. مکانیسم احتمالی سیتوزین آرابینوزید روی سلولهای بدخیم بصورت بازدارنده سنتز DNA است و سلولهای فاز S را از میان می‌برد و وین کریستین در عدم تشکیل دوک متیوتیک شرکت دارد. در گزارش قبلی سیتوزین آرابینوزید در تمایز سلولهای لوسمیک میلومونوسیتی به سمت رده مونوسیت موثر بوده است که مبین اثرات متفاوت این ماده برحسب نوع سلولهای لوسمیک است. (۱۷،۱۸) ترکیب ویتامین D3 و سیتوکینها بیشترین تمایز سلولی را به سمت رده نترفیلی شامل سلولهای نترفیل و باند و افزایش NBT و مبلوپراکسیداز نشان داد و این نتیجه مبین آن است که تاثیر آن بر اینترفرون گاما غالب بوده است و از تمایز مونوسیتی جلوگیری به عمل آورده است. در مطالعات قبلی تاثیر تقویتی سیتوکینها و اینترفرون بطور مجزا همراه ویتامین D3 و اسید رتینوئیک در ایجاد تمایز سلولهای سرطانی مختلف مانند U937 و HI60 به اثبات رسیده است (۱۴،۲۰) که مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. در بررسی شاخص‌های سطح سلولی با فلوسیتومتری ترکیب ویتامین D3 و سیتوکینها با بروز زیادی از شاخص CD11b در تمایز سلولهای HI60 همراه بود. این رده سلولی در اثر تمایز شاخص سلولی CD13 را تا حد زیادی از دست می‌دهد و برحسب نوع ماده

میانگین فلورسانت CD11b در سلولها با استفاده از Vit-D3 به تنهایی ۱۸۱/۵ بود، اما میانگین فلورسانت سلولها بدون تأثیر داروها از نظر CD45، CD14، و CD11b به ترتیب ۳۳، ۳۱، ۱۳۱ بود. میانگین فلورسانت در سلولها در ترکیب داروهای فوق افزایش CD11b را تا حدود ۳۷۶ نشان داد که مبین بروز بیش از ۱۰ برابر شاخص رده گرانولوسیتی (نترفیلی) نسبت به کنترل می‌باشد و با تغییرات مرفولوژیک تطابق داشت. میزان فلورسانت CD14 تغییرات جزئی از خود نشان داد که مبین عدم تمایز مونوسیتی است (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه میانگین شدت فلورسانس CD11b در سلولهای درمان شده با ویتامین D3 به تنهایی و در ترکیب با داروهای IFN- $\gamma$  و GM-CSF

## بحث

در لوسمی حاد تکثیر و بلوغ سلولی دچار اختلال شده که مرتبط با تغییرات ژنتیکی تنظیم کننده رشد و تکامل سلولی می‌باشد. استفاده از شیمی‌درمانی گرچه میزان بهبودی را افزایش داده است، اما اثرات جانبی کلینیکی به خصوص در بیماران مسن‌تر را باعث شده است. در اکثر موارد سلولهای مقاوم به درمان ایجاد شده و عود بیماری را سبب می‌شود. بنابراین درمانهای جدید بر اساس پاتوژنز بدخیمی و مولکولهای هدف که موثر در تکثیر و تمایز سلولی هستند مورد توجه در سالهای اخیر قرار گرفته است. تمایز درمانی روشی جدید در جهت القاء تمایز در سلولهای بلاست بدخیم می‌باشد. نقش دیگر تمایز درمانی، کاربرد وسیع آن در ترکیب درمانی می‌باشد. تمایز درمانی همراه با شیمی درمانی،

Strategies. Blood 2002; 99: 759-779.

2. Waxman S. Differentiation therapy in AML. Leukemia 2000; 14(3): 491-496.

3. James SY, William MA, Newland AC, Colston KW. Leukemia Cell differentiation. Gen Pharmacol 1999; 32(1): 143-154.

4. Neildez-Ngnyen T, Chapel A, Arock M, Vetillard J, Thierry D. Gamma –irradiation does not impair ATRA-induced maturation of myeloid leukemia cells: implication for combined radiation and differentiation therapy. Br J Haematol 1998; 103(1): 79-86.

5. Advani SH, Nair R, Bapna A, Gladstone B, Kadam P. Acute Promyelocytic Leukemia: all-trans retinoid acid (ATRA) along with chemotherapy is superior to ATRA alone. Am J Hematol 1999; 60: 87-93.

6. Muto A, Kizaki M, Kawamura C. A novel differentiation therapy for APL with a combination of arsenic trioxide and GM-CSF. Leukemia 2001; 15: 1176-1184.

7. Dover D. New advances in the treatment of APL. Int J Hem 2002; 76(supp2): 179-186.

8. Verstuy FA, Mathieu C, Verlinden L, Waer M, Ton BK. Differentiation induction of human leukemia cells (HL60) by a combination of 1,25 – dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid (All trans or 9-cis). J Steroid Biochem Mol Biol 1995; 53: 431-441.

9. Wallington LA, Durham J, Bunce CM, Brown G. Growth HL60 in liquid culture: Analysis of the influences of differentiative agents. Leukemia Res

تمایز دهنده شاخص‌های جدیدی را بدست می‌آورد. مثلاً اینترفرون گاما باعث تمایز مونوسیتی و افزایش CD14 می‌شود. (۸،۱۵) ترکیب داروهای سیتوتوکسیک با داروهای فوق اثر منفی تمایز نداشته و نتایج مشابهی را از نظر تمایز ایجاد نمودند و حتی تکثیر سلولی را کاهش بیشتری داد، بطور کلی کاهش تکثیر سلولی یکی از عوامل مورد نیاز جهت تمایز سلولی می‌باشد، اما به تنهایی کافی نیست چنانکه در وینکریستین تمایز سلولی مشاهده نشد اما از تکثیر سلولی کاسته شده بود. البته در بعضی از رده‌های سلولی مانند سلولهای اریترولوسمیک Friend تکثیر سلولی با تمایز همراه است. پس علاوه بر ژنهای مرتبط با تکثیر سلولی عوامل ژنتیکی دیگری در ارتباط با تمایز سلولی اهمیت دارند. (۱۶) در مطالعات دیگری همراهی ATRA و شیمی درمانی نسبت به ATRA به تنهایی سودمند بوده است. (۵،۱۷،۱۸) همچنین استفاده از داروهای ضدسرطان و سیتوکین‌های مانند اینترفرون در تمایز سلولهای HL60 مفید واقع شده است. (۱۹،۲۰)

بطور کلی پروسه این مدل سلولی به سمت تمایز همراه با کاهش تکثیر سلولی و آشکارشدن شاخصهای تمایز میلوئیدی می‌باشد که در سطح مولکولی احتمالاً با تغییراتی در سطح فاکتورهای نسخه‌برداری و ژنهای مرتبط با سیکل سلولی همراه است. (مانند Myb, Myc, ...) چنانکه در مورد ATRA و ماده تمایزدهنده دیگر بنام HMBA به اثبات رسیده است. (۲۱،۲۲) در مطالعه حاضر ترکیب ویتامین D3، سیتوکینها داروهای سیتوتوکسیک در غلظت غیرکشنده با اثرات هم‌افزایی حداکثر تمایز سلولی را با کاهش تکثیر سلولی نشان دادند این نتایج گواه بر آن است که ترکیب درمانی از روشهای مؤثر در درمان لوسمی‌ها می‌باشد که نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

**تقدیر و تشکر.** از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران و دانشگاه تربیت مدرس جهت همکاری لازم تشکر می‌شود.

## References

1. Tallman MS, Nabhan Feusner JH, Row JM. Acute Promyelocytic leukemia, evolving therapeutic

1996; 20(10): 821-829.

**10.** Slack J, Waxman S, Ticot G, Tall-man MS, Bloom-field CD. Advances in the management of APL and other hematologic malignancies with arsenic trioxide *Oncologist* 2001; (sipp1): 1-13.

**11.** Zhu J, Lallemand V, de The H. Pathways of RA or Arsenic trioxide-induced PML/RAR catabolism. *Oncogene* 2001; 20(49): 7257-65.

**12.** Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanism of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3893-8.

**13.** Wang ZG, Rivi R, Delva L, Konig A, Scheinberg DA. Arsenic and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RAR $\alpha$  independent manner. *Blood* 1998; 92(5):1497-1504.

**14.** Elias L, Van Epps DE. Early effect of G-CSF and GM-CSF upon proliferation and differentiation. *Leukaemia* 1998; 2(11): 763-765.

**15.** Razak K, Allen PD, Kelesy SM, Gutteridge CN, Newland AD. Modulation of CD13 during retinoic acid induced differentiation of HL60 cells. *Leukemia Res* 1994; 18(8): 626-639.

**16.** Louaine L, Steren M, Tetra JR. Proliferation is

required for induction of differentiation of Friend's cell. *Biochem cell Biol* 1992. 70: 555-546.

**17.** Hassan HT, Rees KH. Retinoic acid in combination with cytosine arabinoside induces differentiation of human myelomonocytic and monocytic leukemic cells. *Hemato Onco* 1998; 6: 39-45.

**18.** Leung MF, Wong KF. The differentiating effect of retinoic acid and vincristine on AML. *J Hematother* 1999; 8(3): 275-279.

**19.** Kafka M, Dvilansky A, Nathan I. Mechanism of interaction between Interferon- $\gamma$  and antineoplastic agent on the differentiation of HL60 Promyelocytic cells. *Exp Hematol* 1990; 18(3): 153-158.

**20.** Chelbi MK, Pelicano L. Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA-resistant APL cells. *Leukemia* 1999; 13(8): 1167-74.

**21.** Milis KJ, Walsh V, Gilkes AF, Woodgate LJ. Identification of transcription factors during ATRA-induced neutrophil differentiation of HL60 cells. *Br J Haematol* 1998; 103(1): 87-92.

**22.** Zaker F, May A and Burnet AK. Key regulatory gene expression in erythroleukemia differentiation. *Iranian Biomed J* 2002; 6(4): 97-103