دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی– پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم– شماره ۹۹
تیر ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۲/۶
آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۴/۱۳
پذیرش: ۹۱/۴/۲۰

مقایسه اثر وینکریستین بر لنفوسیت‌های طبیعی در حال تکثیر موش و رده سرطانی BCL1

نویسندگان: محدثه شاه‌حسینی[۱]، سوسن کبودانیان اردستانی[۲] و رویا یارائی[۳*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. دانشیار- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. دانشیار- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: رویا یارائی E-mail: ryaraee@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: تکثیر و آپوپتوز جزو لاینفک عملکرد لنفوسیت‌ها در سیستم ایمنی است و؛ بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی ضدسرطان مانند وینکریستین سیکل سلولی را هدف‌گیری‌کرده، القاکنندهٔ آپوپتوز در سلول‌های سرطانی هستند و به‌عبارتی، سلول‌هایی که بیشتر تقسیم‌می‌شوند، مرگ سلولی بیشتری را نیز متحمل می‌شوند که ممکن است شامل حال لنفوسیت‌های نرمال در حال تکثیر و پاسخگو به بدخیمی‌ها نیز بشود؛ لذا هدف این مطالعه، بررسی مقایسه آثار سایتوتوکسیک داروی ضدسرطانی وینکریستین بر لنفوسیت‌های طبیعی در حال استراحت و در حال تکثیر در مقایسه با اثر آن بر سلول سرطانی است.

مواد و روش‌ها: رده سلولی سرطانی BCL1 کشت‌داده‌شد و سلول‌های طبیعی از طحال موش تهیه‌شده، کشت‌داده‌شدند و با استفاده از میتوژن به تکثیر وادار شدند. اثر داروی وینکریستین در غلظت‌های مختلف بر این سلول‌ها لنفوسیت‌های نرمال و در حال تکثیر طحال موش و مقایسه اثر همین دارو بر رده لنفوم BCL1 در سه زمان بررسی‌شد. درصد سایتوتوکسیسیته دارو توسط تست MTT اندازه‌گیری و IC50 زمانهای مختلف محاسبه شد. درصد سلول‌های آپوپتوتیک به روش رنگ‌آمیزی دوگانه اتیدیم برماید و آکریدین اورنج و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس به‌دست‌آمد.

نتایج: نتایج MTT نشان‌داد که غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر وینکریستین اثر سایتوتوکسیک قابل‌توجهی بر رده سلولی BCL1 دارد و غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز با گذشت زمان اثر سایتوتوکسیک خود ر ا نشان‌می‌دهد. در لنفوسیت‌های نرمال و در حال تکثیر، غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو باعث مرگ‌ومیر سلولی می‌شوند؛ ولی غلظت‌های کمتر از ۵ اثر سایتوتوکسیک چندانی بر سلول‌های در حال استراحت ندارند درحالی‌که غلظت های کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های در حال تکثیر بعد از تیمار ۷۲ ساعت اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری نشان‌دادند. درصد سلول‌های آپوپتوتیک متأثر از غلظت‌های مختلف دارو مشاهده‌شده با میکروسکوپ فلورسانس با درصد سایتوتوکسیسیته به‌دست‌آمده همان غلظت‌های دارو در تست MTT متناسب بود.

نتیجه‌گیری: به‌نظرمی‌رسد بیشترین اثر توکسیک این دارو بر سلول‌های سرطانی است و در سلول‌های طبیعی به‌شدت به زمان و فعالیت سلولی، وابسته است.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، تکثیر سلولی، BCL1 (رده سرطانی لنفوم)، وینکریستین، لنفوسیت‌های طحال موش

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سلول‌ها با میتوز متولد می‌شوند و حیاتشان با آپوپتوز به‌پایان‌می‌رسد؛ هر دو، فرایندهای فعال و فیزیولوژیک هستند. وقتی توازن میان میتوز و آپوپتوز مختل شود، یکی از پیامدها، سرطان است. به‌وسیله آپوپتوز، سلول‌های ناخواسته و غیرمفید طی رشد و فرایندهای بیولوژیک طبیعی دیگر ریشه‌کن می‌شوند(۱) ویژگی سلول‌های سرطانی، تقسیم بی‌رویه و غیرقابل‌کنترل است. سلول‌های طبیعی، هنگام تماس با سلول مجاور، تقسیم را متوقف‌می‌کنند که «مکانیسم مهار تماسی» شناخته‌می‌شود. فرایند تقسیم سلولی چه در سلول‌های طبیعی چه در سلول‌های سرطانی از طریق سیکل سلولی انجام‌می‌شود(۲). توانایی شیمی‌درمانی برای کشتن سلول‌های سرطانی وابسته به توانایی‌اش برای متوقف‌کردن تقسیم سلولی است. بیشتر داروها با آسیب‌رسانی به RNA و DNA این کار را انجام‌می‌دهند؛ بنابراین سلول‌هایی که سریع‌تر در حال تقسیم هستند بسیار محتمل‌تر است که بر اثر شیمی‌درمانی کشته‌شوند؛ این داروها همچنین آپوپتوز را القامی‌کنند(۳).

بررسی جنبه‌های مختلف تکثیر سلولی زمانی، بیشتر مهم می‌شود که به نقش این پدیده در لنفوسیت‌ها، بازوی اساسی در سیستم ایمنی توجه‌کنیم. تکثیر و مرگ سلولی، دو فرایند مهم در روند پاسخ سلول‌های سیستم ایمنی نیز هستند. لنفوسیت‌ها طی پاسخ‌دهی ایمنی تحت روند تقسیم میتوزی قرارمی‌گیرند که به‌اصطلاح «گسترش کلونال»[1] نامیده‌می‌شود. بعد از فروکش‌کردن پاسخ‌های ایمنی، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش‌می‌یابد و هموستاز برقرارمی‌شود(٤).

وینکریستین، دارویی ضدسرطانی است که برای سیکل سلول ویژگی دارد(۵). وینکریستین دارویی از خانواده وینکاالکالوییدهاست که در ترکیب با دیگر عوامل در درمان لنفوم و لوکمی استفاده‌می‌شود. وینکاالکالوییدها عوامل ضدمیکروتوبولی هستند که دراصل از طریق تداخل با عملکرد طبیعی میکروتوبول‌ها و توقف پیشرفت چرخه سلولی میان فاز G2-M اثرمی‌کنند. با توجه به مکانیسم اثر وینکریستین، این دارو به‌عنوان یک داروی اثرگذار بر مرحله میتوز سلول‌های در حال تکثیر، با هدف بررسی اثرهای احتمالی آن بر سلول‌های طبیعی در حال استراحت و طبیعی درحال تکثیر انتخاب و با تأثیرهای این دارو بر رده سلولی سرطانی از نظر میزان مرگ‌ومیر سلولی و وقوع آپوپتوز مقایسه‌شد. هدف این مطالعه، بررسی اثر وینکریستین به‌طور خاص نیست بلکه تأکید مطالعه بر اثر داروهای هدف‌گیرنده تقسیم سلولی است. از عوارض دارو اثر توکسیک بر لنفوسیت‌هاست ولی اثر آن بر لنفوسیت در حال تکثیر که سلول پاسخگو در سیستم ایمنی است نامعلوم باقی‌مانده‌است.

مواد و روش‌ها

داروی وینکریستین (ساخت شرکت ریختر آلمان) تهیه‌شد و با استفاده ازمحیط کشت RPMI1640 غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دارو فراهم‌شدند.

جداسازی سلول‌های طحال

سلول‌های طحال موش BALB/c به‌عنوان منبع سلول‌های طبیعی انتخاب‌شدند. برای به‌دست‌آوردن سلول درحال تکثیر به گروهی از سلول‌های طحال موش محرک کانکاوالین A (ConA) افزوده شد. بعد از کشتن موش با اتیل اتر با استفاده از قیچی و پنس استریل و در شرایط استریل، طحال موش جدا شد و به داخل یک پتری دیش استریل محتوی محیط RPMI 1640(Gibco) منتقل شد. با فشردن طحال با استفاده از پنس استریل سلول‌های طحال به‌صورت سوسپانسیون در محیط کشت رها شد. سلول‌های جداشده به لوله فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل شده، سانتریفیوژ سلول‌ها دردمای ۱۳ درجه سانتیگراد و ۱۵۰۰ دور در دقیقه (g × 500) به مدت ۱۰ دقیقه انجام‌شد. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی دورریخته‌شد و به سلول‌های سانتریفیوژشده بافر لیزکننده گلبول‌های قرمز افزوده شد. بافر لیزکننده از

1. Clonal expansion

Archive of SID

www.SID.ir

تریس ۰/۲۰۶٪ (وزنی – حجمی‌در آب مقطر) و کلریدآمونیوم ۰/۸۳ درصد به‌نسبت ۱ به ۱۰ (حجمی) ساخته‌شده‌بود. سلول‌های طحال به مدت ۲ دقیقه در معرض بافر لیزکننده قرارگرفتند تا گلبول‌های قرمز لیز شوند. برای جلوگیری از لیز سایر سلول‌ها که اغلب، لنفوسیت هستند بلافاصله به لوله سرم جنین گاوی (FBS[1]) افزوده شد. سانتریفیوژ برای حذف گلبول‌های قرمز لیزشده در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰۰ دور در دقیقه (معادل) به مدت ۱۰ دقیقه انجام‌شد. دو مرحله شستشو با محیط RPMI و متعاقب آن سانتریفیوژ نیز روی سلول‌ها انجام‌شد. به سلول‌های باقی‌مانده محیط کشت با ۱۰ درصد FBS افزوده شد. برای بررسی درصد سلول‌های جداشده زنده از طحال از رنگ‌آمیزی سلول با تریپان بلو و مشاهده با میکروسکوپ نوری استفاده‌شد و شمارش سلولی با لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری انجام‌گرفت و در آزمایش‌های مکرر، درصد سلول‌های زنده همیشه بالای ۹۸ درصد بود.

کشت سلول‌ها و اثر دادن دارو

از پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای به‌منظور کشت سلول‌ها استفاده‌شد. برای به‌دست‌آوردن سلول در حال تکثیر به گروهی از سلول‌های طحال موش محرک کانکاوالین ConA (A) افزوده شد. دربارهٔ سلول‌های طحال گروه‌های مختلف شامل گروه کنترل، کنترل با محرک کانکاوالین ConA (A) به غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، گروه‌های دارو (غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و درنهایت، گروه‌های دارو همراه با محرک کانکاوالین ConA (A) بود. در هر چاهک، تعداد ۲×۱۰۵ سلول و برای هر غلظت دارو یا کنترل، ۵ چاهک کشت‌داده‌شد. برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سه پلیت جدا داخل انکوباتور با ۵ درصد CO2 قرارداده‌شد.

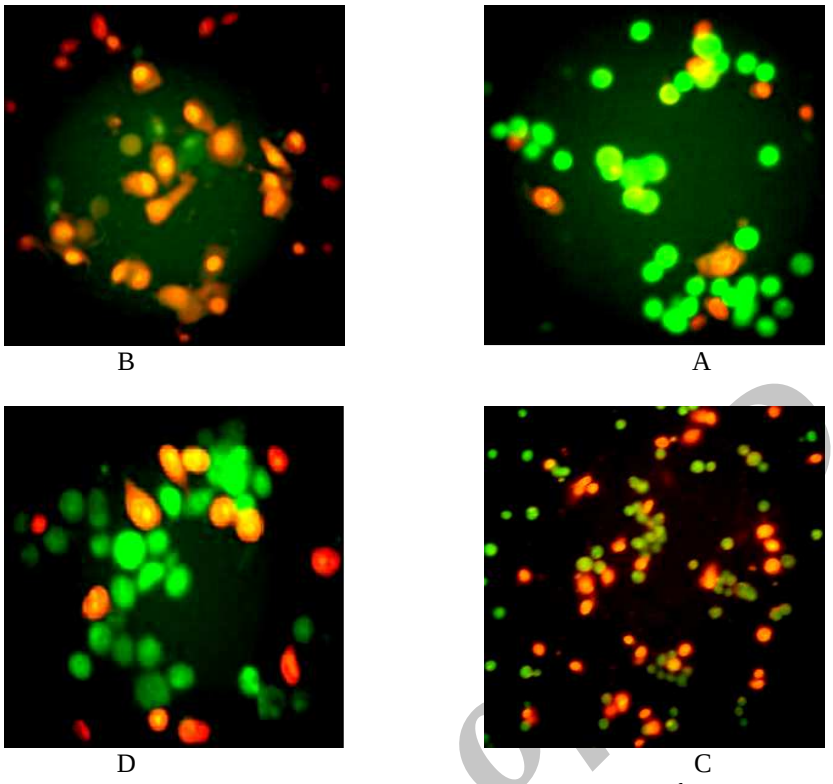
رده سلولی BCL1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (کد C551) خریداری و در محیط کشت RPMI1640 (Gibco) دارای ۱۰ درصد سرم FBS (Gibco) کشت‌داده‌شد. برای انجام تست، سلول‌ها از فلاسک کشت جداشده، بعد از شمارش (همراه با تریپان بلو) تعداد ۲×۱۰^{٤} سلول به هر چاهک پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و بعد از یک شب انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تعویض محیط مراحل افزودن غلظت‌های مختلف دارو (۵، ۲، ۱و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و سایر مواد مشابه موارد پیشین انجام‌شد.

تست MTT و محاسبه درصد توکسیسیته

بعد از گذشت زمان تیمار دارویی (۲٤، ٤٨ یا ۷۲ ساعت) پلیت را از انکوباتور خارج‌کرده، زیر هود در شرایط استریل به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (غلظت ۵ درصد در نرمال سالین) افزوده شد و دوباره داخل انکوباتور به مدت ٤ ساعت قرارگرفت ([i]). پلیت توزین شده، پلیت دیگری برای موازنه در سانتریفیوژ تهیه‌شد. سانتریفیوژ در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام‌گرفت. بعد از سانتریفیوژ محیط داخل چاهک‌ها به دقت تخلیه‌شد به‌طوری‌که کریستال‌های بنفش‌رنگ در چاهک باقی بمانند. به چاهک‌ها ایزوپروپانول اسیدی (0.04N اسید کلریدریک) اضافه شد تا کریستال‌ها حل‌شوند؛ درنهایت، جذب نور در طول موج ٤۹۲ نانومتر با دستگاه الایزا – ریدر خوانده‌شد. میزان جذب متناسب با فعالیت حیاتی است و با درنظرگرفتن میانگین جذب گروه کنترل (فاقد دارو) به‌عنوان ۱۰۰، درصد توکسیسیته محاسبه شد.

1. Fetal Bovine Serum

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر ۱. رده سلولی BCL1 متأثر از غلظت‌های مختلف داروی وینکریستین در زمان ٤٨ ساعت. سلول‌ها با ET/AO رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده‌شدند.

گروه کنترل رده سلولی BCL1 بدون افزودن دارو با بزرگنمایی x40. سلول‌های زنده با فلورسانس سبز به‌طور غالب در این گروه مشاهده‌می‌شود. B- گروه متأثر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی x40. سلولهای آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز در این گروه به‌طور غالب دیده‌می‌شود. C - گروه سلولی متأثر از غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی x20. همان‌طورکه مشاهده‌می‌شود، تعداد سلول‌های زنده با فلورسانس سبز تاحدی بیشتر از سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز است؛ ولی به‌طور کامل، غالب نیست. D- گروه سلولی متأثر از غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی x40. سلول‌های زنده با فلورسانس سبز جمعیت غالب این گروه است.

مشاهده میکروسکوپی آپوپتوز

سلول‌های گروه‌های منتخب از غلظت‌های دارو و گروه کنترل (با و بدون محرک) در پلیت کشت شش خانه‌ای کشت‌داده‌شدند. بعد از طی ٤٨ ساعت سلول‌ها با PBS[1] شستشوداده‌شدند و با ترکیب رنگ اتیدیوم برماید/آکریدین اورنج رنگ‌آمیزی‌شدند و با میکروسکوپ فلورسانس OLYMPUS مدل BX51 مشاهده‌شدند و به‌منظور تعیین نسبی تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و زنده شمارش انجام‌شد. آکریدین اورنج هم به سلول‌های مرده و هم به سلول‌های زنده نفوذمی‌کند و فلورسانس سبزرنگ انتشارمی‌دهد که نتیجه داخل‌شدن (اینترکاله) این رنگ در DNA دو رشته است بنابراین با این رنگ به‌تنهایی نمی‌توان سلول زنده را از غیرزنده تشخیص‌داد (٦). اتیدیوم برماید بعد از اتصال به DNA سلول‌هایی که تغییرهای غشایی را متحمل شده‌اند (سلول‌های آپوپتوتیک)، فلورسانس قرمز منتشر می‌کند (۷). با استفاده از رنگ‌آمیزی دوگانه ET/AO[2] می‌توان

1. Phosphate buffered saline
2. Ethidium bromide / Acridine orange

Archive of SID

www.SID.ir

افتراق میان سلول‌های زنده و آپوپتوزشده را زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده‌کرد؛ بعد از شمارش و محاسبه درصد، عکس‌ها نیز به‌صورت تصادفی از بخش‌های مختلف پلیت گرفته‌شد.

محاسبات آماری

درصد سایتوتوکسیسیته براساس جذب نور به روش T-test و ANOVA تفسیرشد. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام‌گرفت و $p<0.05$ برای معنی‌داربودن از نظر آماری درنظرگرفته‌شد.

یافته‌ها

بررسی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی

در هر گروه، تعداد ۲۰۰ سلول از سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با ET/AO به‌طور تصادفی، زیر میکروسکوپ فلورسانس شمارش‌شدند و درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های سلولی متأثر از دارو بعد از گذشت ٤٨ ساعت به‌دست‌آمد و مشخص شد که میزان آن با افزایش غلظت دارو به‌شدت افزایش‌می‌یابد؛ بدین صورت که این مقادیر در سلول‌های گروه کنترل رده سلولی (بدون دارو) ٤ درصد و در رده سلولی متأثر از غلظت‌های ۰/۵ ، ۱ ، ۲ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۱۸.۵ ، ۲٤ ، ۵۱ و ۵۲ درصد بود (جدول۱).

از پلیت‌های حاوی سلول‌ها در شرایط مختلف (از جمله کنترل و دارو) عکس‌هایی نیز به‌طور تصادفی گرفته‌شدند (تصاویر ۳-۱). همان‌طورکه دیده‌می‌شود نسبت سلول‌های در وضعیت آپوپتوتیک در حضور غلظت‌های بالاتر دارو روبه‌افزایش است.

تأثیر وینکریستین بر فعالیت حیاتی سلول‌های BCL1 در سه زمان ٢٤ ، ٤٨ و ٧٢ ساعت :

با استفاده از جذب نوری چاهک‌های با غلظت مختلف دارو، نمودار درصد فعالیت حیاتی سلول‌ها رسم‌شد (نمودار ۱). همان‌طورکه در نمودار ۱ مشاهده‌می‌شود، غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو در هر سه زمان اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری بر سلول‌های رده BCL1 نشان‌داد؛ درحالی‌که غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو بعد از تیمار ٤٨ ساعت اثر سایتوتوکسیک داشت و غلظت‌های ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر، اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری نشان‌ندادند. مقایسه هم‌زمان اثر دارو به شکل درصد در مقایسه با کنترل در سه زمان مذکور در نمودار 1D قابل‌مشاهده است.

تأثیر وینکریستین بر فعالیت حیاتی سلول‌های طحال در سه زمان ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت

با استفاده از جذب نور چاهک‌های با غلظت مختلف دارو، نمودار درصد فعالیت حیاتی سلول‌های نرمال طحال در سه زمان ٢٤ ، ٤٨ و ٧٢ ساعت، متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین رسم‌شد (نمودار ۲). همان‌طورکه در نمودار ۲ مشاهده‌می‌شود، غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ٢٤ ، ٤٨ و ٧٢ ساعت باعث مرگ‌ومیر معنی‌دار سلول‌های نرمال (در حال استراحت) طحال شدند. غلظت‌های کمتر از ۱۰ اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری را در ٢٤ ساعت نشان‌ندادند اما با گذشت زمان بعد از ٤٨ و ٧٢ ساعت اثرگذاری دارو بر سلول‌های در حال استراحت مشاهده‌شد و نشان‌داد که دارو بر سلول‌های در حال استراحت طحال، اثر سایتوتوکسیک وابسته به غلظت و زمان دارد.

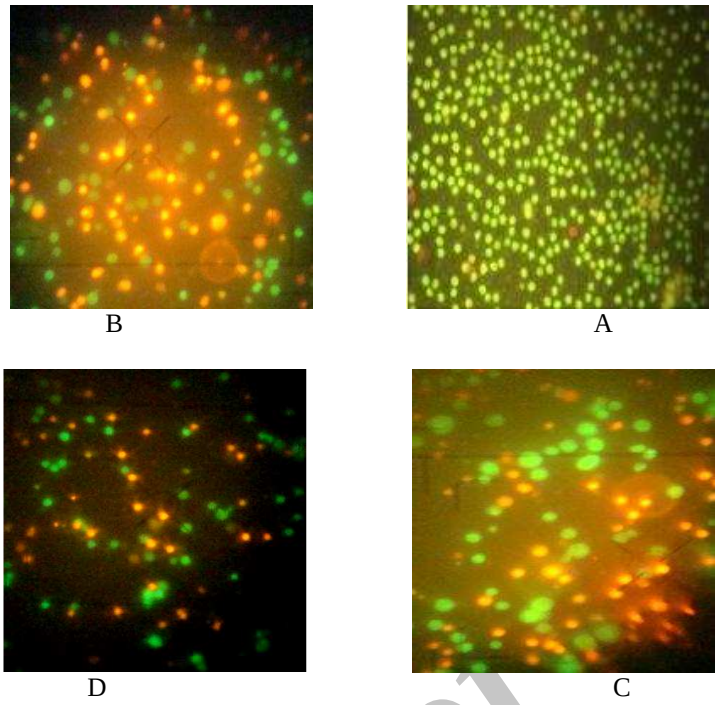
تأثیر وینکریستین بر فعالیت حیاتی سلول‌های در حال تکثیر طحال در سه زمان ٢٤ ، ٤٨ و ٧٢ ساعت

درصد فعالیت حیاتی سلول‌های در حال تکثیر طحال در ٢٤ ، ٤٨ و ٧٢ ساعت متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین نشان‌داد همه غلظت‌های مورد آزمایش، اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری بر این سلول‌ها دارند. اثرسایتوتوکسیک وابسته به غلظت در سلول‌های در حال تکثیر مشاهده‌شد به این صورت که غلظت‌های بالاتر مرگ‌ومیر بیشتری را باعث‌شدند (نمودار ۳).

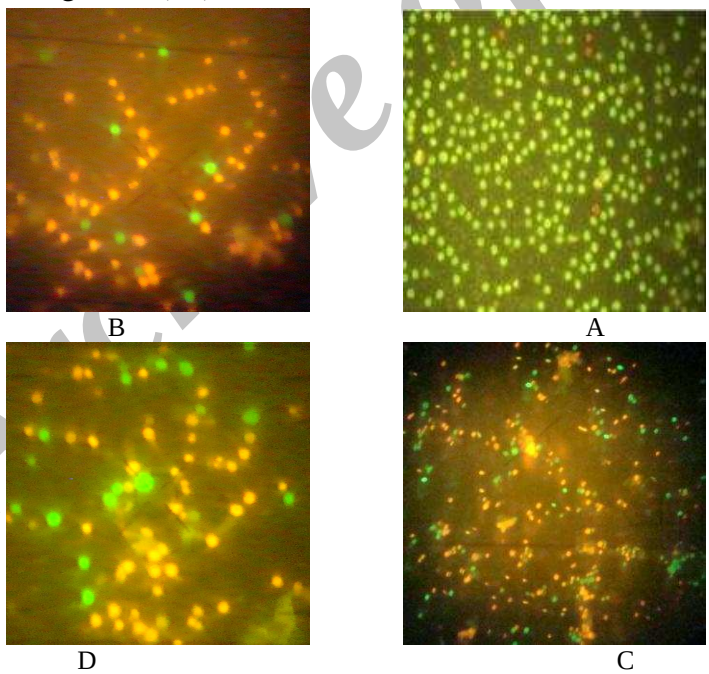
مقایسه درصد حیاتی سه گروه سلولی (طحال در حال استراحت، طحال در حال تکثیر و رده سلولی BCL1) در نمودار٤ نشان‌دادند که داروی وینکریستین در غلظت‌های یکسان به‌ترتیب بر رده سلولی، طحال در حال تکثیر و در حال استراحت، بیشترین اثر سایتوتوکسیک را داشت.

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر ۲. سلول‌های طحال طبیعی متأثر از غلظت‌های مختلف داروی وینکریستین در زمان ٤٨ ساعت.



تصویر ۳. سلول‌های طحال در حال تکثیر متأثر از غلظت‌های مختلف داروی وینکریستین در زمان ٤٨ ساعت. سلول‌ها با ET/AO رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده‌شدند.

A– گروه کنترل بدون افزودن دارو با بزرگنمایی**40x**.

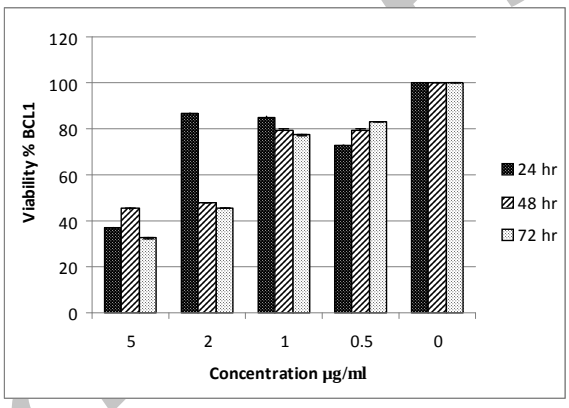
B– گروه متأثر از غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ٤٠x. سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز در این گروه به‌طور غالب دیده‌می‌شود. **C** – گروه سلولی متأثر از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۲۰x. **D** – گروه سلولی متأثر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ٤٠x.

www.SID.ir

سلول‌ها با ET/AO رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده‌شدند. A – گروه کنترل بدون افزودن دارو با بزرگنمایی x40. سلول‌های زنده با فلورسانس سبز به‌طور غالب در این گروه مشاهده‌می‌شود. B– گروه متأثر از غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی x ٤٠. سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز در این گروه به‌طور غالب دیده‌می‌شود. C – گروه سلولی متأثر از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ٤٠x. همان‌طورکه مشاهده‌می‌شود تعداد سلول‌های زنده با فلورسانس سبز نسبت‌به سلول‌های با فلورسانس قرمز بیشتر است . D – گروه سلولی متأثر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ٤٠x.

جدول ۱. درصد سلول‌های آپوپتوتیک در مشاهده میکروسکوپی

غلظت دارو (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد سلول شمارش‌شده رده سلولی	درصد سلول‌های آپوپتوتیک
۰	200	%٤
0.5	200	%۱۸.۵
1	200	%۲٤
2	200	%۵۱
5	200	%۵۲



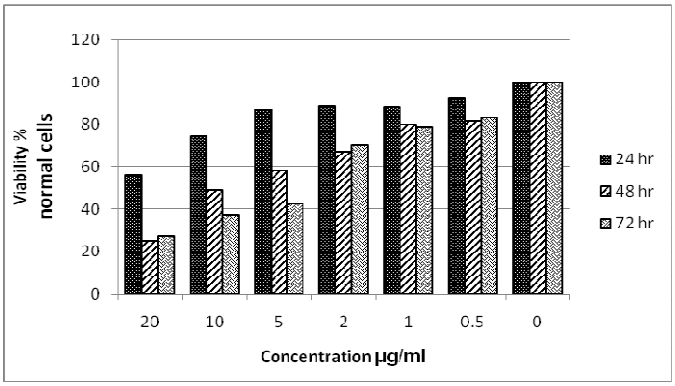
نمودار ۱. درصد فعالیت حیاتی سلول‌های رده BCL1 در سه زمان ٢٤ ، ٤٨ و ٧٢ متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین در تست MTT. سلول‌ها به تعداد 2×10^{4} در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت‌داده‌شد و در معرض دارو با غلظت‌های مختلف (محور افقی نمودار) قرارگرفتند و تست MTT بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت انجام‌شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل معادل ۱۰۰ درنظرگرفته‌شد و درصد توکسیسیته در بقیه گروه‌ها با آن مقایسه‌شد (محور عمودی)، $p<0.05$ درنظرگرفته‌شده‌است.

محاسبه IC50[1]

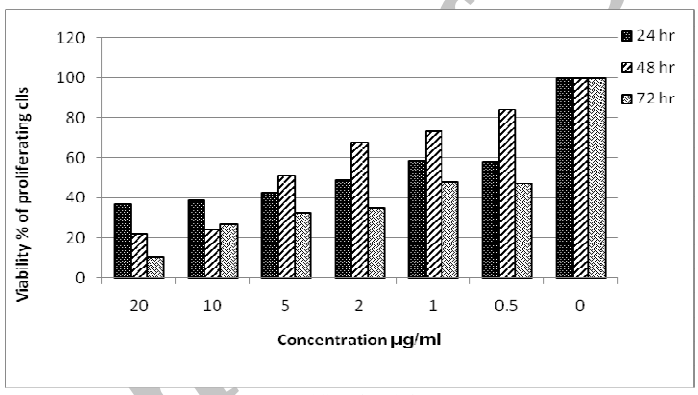
پس از تبدیل جذب به‌دست‌آمده در دستگاه الایزا-ریدر از تست MTT به درصد سایتوتوکسیسته، غلظتی از دارو که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مرگ‌ومیر سلول‌ها شود محاسبه می‌شود (۸). در جدول ۲ نتایج مربوط به IC50 دیده‌می‌شود یعنی غلظتی که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مرگ‌ومیر شود و براساس تست MTT در هر سه زمان محاسبه شده‌است. همان‌طورکه مشاهده‌می‌شود سلول‌های سرطانی، بیشترین آسیب‌پذیری را نسبت‌به دارو دارند ولی دربارهٔ سلول‌های طبیعی، میزان IC50 به‌شدت، وابسته به زمان است. برای مشاهده ۵۰ درصد آسیب سلولی ظرف ٢٤ ساعت، در سلول‌های در حال استراحت به بیش از ۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو نیازداریم درحالی‌که غلظت حدود ۹/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند همین میزان آسیب را ظرف ۷۲ ساعت ایجادکند؛ سلول‌های در حال تکثیر نیز بیشترین آسیب‌پذیری خود را در ۷۲ ساعت نشان‌می‌دهند.

1. half maximal inhibitory concentration

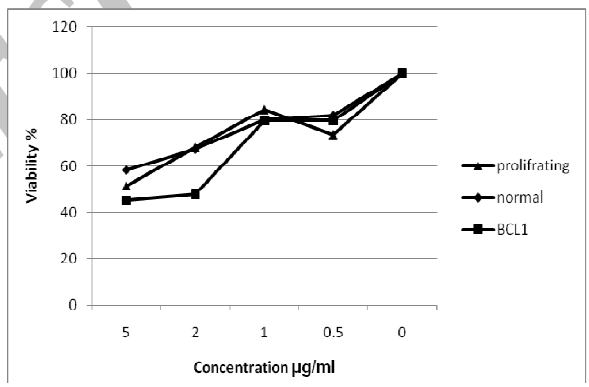
www.SID.ir



نمودار ۲. درصد فعالیت حیاتی سلول‌های نرمال طحال در سه زمان ۲٤ ، ٤۸ و ۷۲ ساعت متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین در تست MTT. سلول‌ها به تعداد ۲×۱۰^{۵} در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت‌داده‌شد و در معرض دارو با غلظت‌های مختلف (محور افقی نمودار) قرارگرفتند و تست MTT بعد از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انجام‌شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل معادل ۱۰۰ درنظرگرفته‌شد و درصد توکسیسیته در بقیه گروه‌ها با آن مقایسه‌شد (محور عمودی)، $p<0.05$ درنظرگرفته‌شده‌است.



نمودار ۳. درصد فعالیت حیاتی سلول‌های در حال تکثیر طحال در ۲٤ ، ٤۸ و ۷۲ ساعت متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین در تست MTT.



نمودار ٤. مقایسه درصد حیاتی سه گروه سلولی; طحال در حال استراحت، طحال در حال تکثیر و رده سلولی BCL1 در ٤۸ ساعت نشان‌می‌دهد داروی وینکریستین در غلظت‌های یکسان به‌ترتیب بر رده سلولی، طحال در حال تکثیر و در حال استراحت، بیشترین اثر سایتوتوکسیک را داشت.

جدول ۲. IC50 داروی وینکریستین بر رده سلولی BCL1 ، سلول‌های نرمال و در حال تکثیر طحال بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

Treatment time	Resting normal cells	Proliferating normal cells	Cancerous cell line (BCL1)
24 hr	23.15	8.18	4.19
48 hr	10.59	8.48	3.76
72 hr	9.52	2.94	3.12

www.SID.ir

سلول‌ها به تعداد ۲×۱۰^{۵} در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت‌داده‌شد و در معرض دارو با غلظت‌های مختلف (محور افقی نمودار) قرارگرفتند و تست MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام‌شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل معادل ۱۰۰ درنظرگرفته‌شد و درصد توکسیسیته در بقیه گروه‌ها با آن مقایسه‌شد (محور عمودی)، $p<0.05$ درنظرگرفته‌شده‌است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ اوزالپ[1] و *همکارانش* در سال ۲۰۱۲ اثر وینکریستین بر بافت تومور TVT و میزان آپوپتوز القاشده بررسی‌شد و نتایج نشان‌دادند که به‌کارگیری زمان‌بندی‌شده وینکریستین علاوه‌بر القای آپوپتوز، از تکثیر سلول‌های تومور نیز جلوگیری‌می‌کرد(۶) (ii)؛ در مطالعات دیگر نیز اثر وینکریستین بر رده‌های مختلف سرطانی مثل Hella،A549 و SKOV3 به‌تنهایی یا همراه با ترکیب‌های دیگر به‌منظور تعیین میزان آپوپتوز القاشده بررسی‌شد که همگی که اثر سایتوتوکسیک وابسته به زمان وینکریستین را نشان‌دادند(۹).

در سال ۱۹۹۹ Nefić و Ibrulj روی آثار ژنوتوکسیک وینکریستین بر لنفوسیت‌های خون محیطی به‌صورت in vitro مطالعه‌کردند. آنها لنفوسیت‌های خون محیطی را جداکرده، این سلول‌ها را در معرض غلظت‌های مختلف وینکریستین در شرایط in vitro قراردادند و ثابت‌کردند وقتی لنفوسیت‌های خون محیطی در معرض غلظت‌های کمتر (۰/۰۵ تا ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرارگرفتند فعالیت میتوزی‌شان تحریک‌شد؛ درحالی‌که قرارگیری در معرض غلظت‌های بالاتر (غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تکثیر لنفوسیت‌ها را به‌طور معنی‌دار کاهش‌داد؛ همچنین غلظت‌های بالا باعث پیدایش آنافاز نامنظم و توزیع کروموزومی به شکل نامنظم در سلول‌های مذکور شد(۱۰)؛ اما تاکنون مطالعه‌ای مبنی‌بر اثر این داروی شیمی‌درمانی بر سلول‌های در حال تکثیر طبیعی انجام‌نشده‌بود. در مطالعه حاضر با توجه به IC50 به‌دست‌آمده برای سلول‌های طحال می‌توان‌نتیجه‌گرفت اثر داروی وینکریستین بر سلول‌های نرمال و سلول‌های در حال استراحت طحال وابسته به زمان و غلظت است. با گذشت زمان، یعنی پس از ۷۲ ساعت بالاترین اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های نرمال و به‌خصوص در حال تکثیر طحال را می‌توان مشاهده کرد و همین‌طور غلظت‌های بالاتر دارو مانند ۲۰ و۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سایتوتوکسیک بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر دارو دارند. با توجه به IC50 به‌دست‌آمده برای رده سلولی نیز اثر وابسته به زمان و غلظت دارو را می‌توان‌مشاهده‌کرد اما این غلظت‌های سایتوتوکسیک مشابه اثرگذار بر رده سلولی نسبت‌به سلول‌های طحال پایین‌تر مثلا ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. مقایسه IC50 رده سلولی با سلول‌های در حال تکثیر پس از تیمار ۷۲ ساعته نشان‌می‌دهد که سلول‌های در حال تکثیر آسیب‌پذیرتر از رده سلولی هستند؛ درواقع با افزایش زمان تریتمنت لنفوسیت‌های در حال تکثیر بیشتر متحمل مرگ سلولی می‌شوند.

امروزه داروهای شیمی‌درمانی ضدلنفوم، مانند وینکریستین استفاده‌ای گسترده دارند؛ مهم‌ترین عملکرد این داروها القای آپوپتوز است، این دارو، اختصاصی سیکل سلولی است که به توبولین‌ها متصل شده، باعث دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها می‌شود؛ همچنین وینکریستین از پلیمریزاسیون زیرواحدهای توبولین به میکروتوبول‌ها نیز جلوگیری می‌کند از آنجا که میکروتوبول‌ها در تشکیل دوک میتوزی دخالت‌دارند به‌نظرمی‌رسد مداخله این عامل با دینامیک و پویایی میکروتوبول‌ها، تقسیم سلولی را مختل‌کرده، چرخه سلولی را متوقف‌می‌کند و القاکننده آپوپتوز است (۶)؛ از طرفی، لنفوسیت‌ها بازوی اجرایی سیستم ایمنی هستند و تکثیر، جزو لاینفک پاسخ ایمنی است (۴.) با توجه به مکانیسم عمل وینکریسین که چرخه سلولی را

1. Ozalp

Archive of SID

www.SID.ir

هدف‌می‌گیرد و سلول‌هایی بیشتر هدف قرارمی‌گیرند که بیشتر تقسیم‌می‌شوند، بررسی‌های بیشتر درخصوص اثر توکسیک این گروه از داروها بر سلول‌های فعال در حال تکثیر، مانند لنفوسیت‌های در حال تکثیر ضروری به‌نظرمی‌رسد. این مطالعات می‌توانند از طرفی در جهت روشن‌شدن تفاوت‌های میان سلول در حال تکثیر طبیعی و سلول در حال تکثیر سرطانی مفید باشند و از طرف دیگر، برخی عوارض احتمالی و ناشناخته این داروها بر سلول‌های فعال و در حال پاسخ در سیستم ایمنی را روشن‌سازند.

منابع

1. Kova E. Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. comparison of Viscum album QuFrF extract with Vincristine in an in vitro model. The Scientific World Journal . 2010 ; 10 : 311–320
2. Tait S.W.G, Green D.R . Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond . Nature Reviews. 2010 ; 11 : 621 -632
3. Magalska A, Sliwinska M, Szczepanowska J, Salvioli S, Franceschi C, Sikora E . Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe . Int. J. Cancer . 2006 ;119: 1811–1818.
4. Abbas A.K, Lichman A, PilIa S . Cells and tissues of the adaptive immune system . In : Cellular and molecular immunology . Elsevier. 2007 ; 52
5. Krishna R ,Webb M, Onge G, Mayer L . Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties . The journal of pharmacology and experimental therapeutics . 2001; 298 :1206–1212
6. Gursel O, Sari E, Altun D, Atay AA, Akin R . Vincristine induced unilateral ptosis in a child. Pediatr Neurol. 2009;41:461-463
7. Yaraee R, Ghazanfari T, Eghtedardoost M, Rajabi M, Naseri M . The effect of MS14 on innate and cellular immune responses in BALB/c mice. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2011; 33(3): 509–514
8. Babykutty S, Padikkala J, Sathiadevan P, Vijayakurup V, Abdul AzisT,Srinivas P, Gopala S . Apoptosis induction of centella asiatica on human breast cancer cells .Babykutty et al., Afr. J. Trad. CAM. 2009; 6 (1): 9 - 16
9. Bian Y, Yang H, Yang Z, Gao F, Zhang N, Xiao C. Amlodipine treatment prevents angiotensin II-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis. Archives of medical research . 2011;42:22-27
10. KosmiderB,Zynerb E, Osiecka R, Ochocki J . Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. Mutation Research . 2004 ; 583 : 61–70
11. Lewis L. N. Chemical catalysis by colloids and clusters. Chem. Rev. 1993 Dec; 93 (8): 2693–2730
12. Ozalp G, Zik B, Bastan A, Peker S, Ozdemir-Salcı E, Bastan I, Darbaz I, Salar S, Karakas K. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). Biotechnic and histochemistry 2012;in press:1-6
12. Ying-jia Zhong, et al. Crocetin induces cytotoxicity and enhances vincristine-induced cancer cell death via p53-dependent and -independent mechanisms. Acta Pharmacologica Sinica 2011; 32: 1529-1536
14. Nefić H, Ibrulj S . Genotoxic effect of the antitumor agent vincristine sulfate on human peripheral blood lymphocytes in vitro . Medicinski arhiv . 1999;53(4):185-8

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.99 June, Julay 2012

Received: 25/4/2012
Last revised: 3/7/2012
Accepted: 10/7/2012

Comparing the efffect of vincristine on proliferating normal lymphocytes and BCL1 cell line

Mohaddese Shahhosseini[1], Sussan Kabudanian Ardestani[2], Roya Yaraee[3*]

1- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2- Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran
3- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

E-mail: ryaraee@yahoo.com

Asbtract

Background and Objective: Proliferation and apoptosis of lymphocytes are essential parts of the immune system. Most anti-cancer chemotherapy drugs such as vincristine target cell cycle and induce apoptosis in cancer cells **.**In other words, dividing cells undergo more apoptosis, which may also include the normal proliferating lymphocytes responsive to malignancies as well.

Materials and Methods: In this study, the effect of different concentration of vincristine at three different time periods on resting and proliferating spleen lymphocytes were evaluated and compared with the effect of the drug on mouse lymphoma cell line BCL1. The cytotoxicity of vincristine was determined by MTT assay and IC50 was calculated for all periods. The cells were also stained with double staining acridine orange and ethidium bromide and were observed with fluorescence microscope and the percentage of apoptotic cells were determined.

Results: MTT results showed that vincristine at concentrations of 10 and 20 μg/ml caused cell death in both resting and proliferating lymphocytes, but concentrations<5 **μg/ml did not show any significant cytotoxic effect, while concentrations of 2 and 5 μg/ml** showed significant cytotoxic effect on BCL1 cells. The percentage of the apoptotic cells which were affected by different concentrations of the drug was proportional in the two methods, i.e. fluorescence microscope and MTT assay.

Conclusion: Vincristine has a strong cytotoxic effect in tumor cells and its toxic effect in normal cells is highly dependent on time and the activation of the cells.

Key words: Apoptosis, Proliferation, BCL1 (lymphoma cell line), Vincristine, Spleen

www.SID.ir