Archive of SID

# اثرات گیاه اسپند و آلکالوییدهای مشتق از آن بر رده‌ی سلولی لوسمیک حاد پرومیلوسیتی

دکتر فرهاد ذاکر[۱]، آرزو اودی[۲]، دکتر محمود محمودیان شوشتری[۳]، مسعود سلیمانی[٤]

**خلاصه**

***سابقه و هدف:*** *گیاه اسپند در طب قدیم به عنوان یک داروی خواب آور، ضد عفونی کننده، معرق و ضد تومورهای جلدی مصرف داشته و هنوز هم کم و بیش در میان عوام کاربرد دارد. از این رو مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی تاثیر عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند و مشتقات بتا کاربولینی آن (هارمین و هارمالین)، بر روی مدل سلولی لوسمیک پرومیلوسیتی حاد در سال ۱۳۸۱ انجام شد.*

***مواد و روش‌ها:*** *در این مطالعه‌ی تجربی در محیط آزمایشگاهی، سلول‌های لوسمیک در محیط سیگما کشت داده شده و سپس به مدت، ۵ روز تحت تاثیر عصاره‌ی اتانلی اسپند، هارمین و هارمالین قرار گرفتند. در روزهای مختلف درصد زنده بودن سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو و روش نور سنجی دی اتیل تیازول ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید بررسی و سیکل سلولی نیز با روش فلوسیتومتری بررسی شد. تاثیر داروها در ایجاد تمایز سلول‌های لوسمیک از طریق تغییرات مورفولوژیک ، آزمایش نیتروبلوتترازولیوم و بروز شاخص‌های سطحی سلولی سی ـ دی ۱۱ بی و سی ـ دی ۱٤ از طریق فلوسیتومتری بررسی شد.*

***یافته‌ها:*** *اثرات سمی داروها بر روی سلول به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان بود و میزان مرگ و میر سلول‌ها پس از ٤۸ ساعت به ترتیب با غلظت‌های ۳۰، ۱۲/۸ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر هارمین، هارمالین و عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند به ۱۰۰ درصد رسید. در اثر درمان سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های غیر سمی این داروها، تکثیر سلولی نسبت به کنترل کاهش نشان داد. زمینه‌ی بررسی چرخه‌ی سلولی، تجمع نسبی سلول‌ها را در فاز اس نشان داد. در تاثیر تمایز دهنده‌ی داروها در غلظت‌های غیر سمی مشاهده شدکه تنها هارمالین، نشانه‌هایی از القای تمایز منوسیتی را با ۲۸ درصد ان بی تی مثبت و٦٤ درصد بروز دو شاخص سی ـ دی ۱۱ بی و سی ـ دی ۱٤ در رده‌ی سلولی فوق ایجاد می‌کند.*

***نتیجه‌گیری و توصیه‌ها:*** *داروهای گیاهی فوق در غلظت‌های غیر سمی باعث کاهش تکثیر سلولی می‌شوند و فقط هارمالین درغلظت مطلوب، تمایز نسبی به سمت سلول‌های بالغ منوسیتی را ایجاد می‌کند.*

***واژگان کلیدی :اسپند، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، سیتوتوکسیسیته، آلکالوییدهای اسپند***

## مقدمه

لوسمی‌های حاد به علت استحاله‌ی بدخیمی در یکی از پیش سازهای خونی به وجود می‌آیند. در حال حاضر روش‌های مختلفی برای درمان انواع سرطان‌ها و لوسمی‌ها شناخته شده است، که شامل استفاده از داروهای کشنده‌ی سلول، عوامل تمایز دهنده‌ی سلولی مانند آل ترانس رتینوییک اسید (آتی آر آ)[۱]، ویتامین دی ۳ و یا ترکیبی از این‌ها می‌باشد (۱،۲). در لوسمی حاد پرومیلوسیتی[۲] در سال‌های اخیر تحقیقات زیاد و قابل توجهی در مورد اثر عوامل تمایز دهنده، کشنده‌ی سلول و آپوپتوتیک انجام شده است. درمان موفقیت‌آمیز لوسمی حاد پرومیلوسیتی با استفاده از آ تی آر آ، ترکیبات ارسنیک وداروهای کشنده‌ی سلول، افق جدیدی را در مورد به کارگیری این عوامل روشن نمود (۳). داروهای گیاهی نیز منبع ارزشمند طبیعی برای تولید انواع محصولات دارویی و داروهای شیمی درمانی می‌باشند. طی ۵۰ سال گذشته مطالعات زیادی روی اثرات داروهای گیاهی بر انواع سرطان‌ها انجام شده است.

دانه‌های گیاه اسپند[۳] به عنوان یک گونه‌ی گیاهی که در مناطق

[۱] دکترای تخصصی خون شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
[۲] کارشناس ارشد خون شناسی، سازمان انتقال خون ایران
[۳] دکترای تخصصی ویروس شناسی، سازمان انتقال خون ایران
[٤] دانشجوی دکترای تخصصی خون شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

[۱] All Trans Retinoic Acid (ATRA)
[۲] Acute Promyelocytic Leukemia (APL)
[۳] Peganum harmala

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف آسیا و هم‌چنین مناطق مختلف ایران به وفور یافت می شود، در طب سنتی ایران کاربرد داشته است. هارمین[٤]، هارمالین[٥]، هارمالول[٦]، آلکالوییدهای مشتق از این گیاه می‌باشند که به صورت معرق ، خواب آور و با خواص خلسه آور کاربرد داشته اند. در طب سنتی ایران از پودر دانه‌های اسپند در درمان تومورهای جلدی و زیر جلدی استفاده می‌شده است (٤،٥). اثرات ضد سرطانی و کشنده‌ی سلول آلکالوییدهای گیاهی اسپند در مطالعات قبلی به تایید رسیده است که به طور عمده روی سلول‌های سرطانی غیرخونی بوده است (٦). در این مطالعه اثر عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند و مشتقات آلکالوییدی آن بر روی مدل سلولی لوسمیک حاد پرومیلوسیتی اچ ال ٦٠ از نظر قدرت کشندگی سلول، رشد و چرخه‌ی سلول و ایجاد تمایز در سال ١٣٨١ در دانشگاه تربیت مدرس و با همکاری سازمان انتقال خون مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های مذکور از بیمار لوسمی حاد پرومیلوسیتی تهیه شده است و الگوی مناسبی جهت مطالعه‌ی داروهای کشنده‌ی سلول و تمایز دهنده می‌باشد (٧).

## مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت.

**روش عصاره گیری داروهای گیاهی:** ابتدا میزان ٢٠ گرم پودر دانه‌ی گیاه اسپند را از الک شماره‌ی ٢٠ رد کرده، سپس در حرارت اتاق به مدت ٢٤ ساعت با ٢٠٠ میلی‌لیتر اتانل ٧٥ درصد خیسانده و سپس به ستون پرکلاسیون منتقل شده و طبق دستورالعمل فارماکوپه‌ی ١٠ آلمان عصاره‌گیری انجام شد. غلظت عصاره‌ی حاصله٤ میلی گرم در هر میلی لیتر تهیه شد. هارمین و هارمالین مشتقات آلکالوییدی گیاه مذکور می‌باشند که حلال آن‌ها دی ام اس اُ می‌باشد. غلظت اولیه‌ی هارمین و هارمالین ٢١٢ و ٢٨٦ میکروگرم در هر میلی لیتر بود که رقت‌های لازم از آن‌ها تهیه شد.

**تهیه‌ی آ تی آر آ (سیگما):** مقدار معین از آ تی آر آ در اتانول حل شد و غلظت اولیه‌ی $10^{-5}$ مولار از آن تهیه و در آزمایشات، از غلظت $10^{-7}$ مولار به عنوان کنترل مثبت در زمان لازم استفاده شد.

**کشت سلولی و اثر دادن داروها:** سلول‌های اچ ال ٦٠ در محیط آر پی ام آی (سیگما)، حاوی ١٠ درصد سرم جنین گاوی (GIBCO)، ١٠٠ واحد درمیلی لیتراستریتومایسین و پنی‌سیلین ٦٣ میلی گرم در میلی لیتر در دمای ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد و در محیط مرطوب با فشار٥ درصد دی اکسید کربن در فلاسک کشت داده شدند، سپس سلول‌ها در غلظت $10^{5}$ در هر میلی لیتر برای بررسی تاثیر داروها به ظروف ٢٤ خانه ای کشت منتقل شده و برای مدت ٥ روز تحت اثر داروها قرار گرفتند.

سلول‌های اچ ال ٦٠ تحت تاثیر غلظت‌های ٠/٤، ٦/٤ و ١٢/٨ میکرو گرم در میلی لیتر هارمین، غلظت‌های ١٠ ، ٢٠ و ٣٠ میکرو گرم در میلی لیتر هارمالین و ١٠، ٥٠ و ٥٠٠ میکروگرم درمیلی لیتر از عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند قرار گرفتند و در خلال پنج روز، شمارش سلولی با تریپان بلو انجام و پس از ٢٤ ساعت آزمایش ام تی تی[٧] بر روی هر سری از سلول‌ها انجام شد.

سلول‌ها در روزهای مختلف با استفاده از لام نئوبار شمارش شده و درصد زنده بودن آن‌ها به وسیله‌ی رنگ آمیزی تریپان بلو تعیین شد. از سلول‌های اچ ال ٦٠ بدون تاثیر دارو به عنوان کنترل استفاده شد.

**روش نور سنجی ام تی تی:** در این روش میزان ٨٠ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی $10^{5}$ سلول در ظروف ٩٦ خانه‌ای به هرچاهک اضافه و سپس به هرچاهک ٢٠ میکرولیتر از رقت های مورد نظر دارویی اضافه شد. ظروف به مدت ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و سپس ١٠ میکرولیتر محلول ام تی تی (سیگما) به هر چاهک افزوده و ظروف به مدت ٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد

[٤] Harmine

[٥] Harmaline

[٦] Harmalol

[٧] 3.4.5 Dimethyl thiazole 2.5 diphenile

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شدند. پس از انکوباسیون، دی ام اس اُ (سیگما) به هر چاهک افزوده و جذب نوری با دستگاه الیزا ریدر دینکس (Dynex) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. میزان فورمازان تشکیل شده‌ی حاصله از شکسته شدن ام تی تی توسط سلول‌های زنده و شدت رنگ آبی حاصله نشان دهنده‌ی توده‌ی سلول‌های زنده بود. از سلول‌های اچ ال ۶۰ بدون تاثیر دارو به عنوان کنترل استفاده شد.

**بررسی محتوی دی ان آ و چرخه‌ی سلولی:** در این روش سلول‌ها درغلظت $10^5$ سلول در هر میلی لیتر به مدت ۴ روز در فلاسک‌های کشت سلول تحت تاثیر داروی آ تی آر آ به عنوان کنترل مثبت و سلول‌های اچ ال ۶۰ بدون تاثیر دارو به عنوان کنترل منفی قرار داده شدند. سپس سلول‌ها را با پی بی اس شستشو داده و پس از آن به ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی ۰/۵ میلی لیتر آر ان آز ( سیگما)[۸]، ۵۰ میکرو لیتر تریتون ۱۰۰ ـ ایکس (سیگما) و ۰/۵ میلی لیتر رنگ پروپیوم یداید (سیگما) اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها آماده‌ی تحویل به دستگاه فلوسیتومتری شده و بدین وسیله تغییرات چرخه‌ی سلولی سلول‌های تحت درمان با داروها در مقایسه با کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. تغییرات چرخه‌ی سلولی شامل درصد سلول‌های موجود در فازهای مختلف جی ۱ و جی ۲ و اس می‌باشد.

**بررسی تغییرات تمایزی سلول‌ها:** از سلول‌های اچ ال ۶۰ بدون تاثیر دارو و با اضافه نمودن آ تی آر آ به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۵ روز در ظروف ۶ خانه‌ای تحت درمان با غلظت‌های غیر سمی داروها قرار گرفتند. ضمن انجام شمارش سلولی و تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها، با استفاده از سیتوسانتریفوژ (Shandon) گستره‌ی سیتواسپین تهیه ورنگ آمیزی گیمسا (Merck) انجام شد و تغییرات مورفولوژیک به سمت رده‌ی نوتروفیل و مونوسیتی در سلول‌های تحت درمان با داروها بررسی شدند.

هم‌چنین آزمون ان بی تی[۹] (سیگما) در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر نیز برای بررسی تمایز سلول‌ها به کار برده شد. این آزمون برای ارزیابی فاگوسیتوز به عنوان یکی از مشخصات سلول‌های بالغ می‌باشد. سلول‌های تمایز یافته این ماده را احیا می‌کنند و رنگ قهوه‌ای تیره در سلول‌ها ایجاد می‌شود که تعداد آن‌ها شمرده می‌شود. جهت تایید نهایی از فلوسایتومتری (Becton Dickinson) به منظور بررسی بروز شاخص‌های سطحی سلولی سی دی ۱۴ و سی دی ۱۱ بی[۱۰] (Dako) استفاده شد. لوله‌های حاوی سوسپانسیون سلولی که از قبل در مجاورت داروها بودند سانتریفوژ و با بافر فسفات شستشو شدند. در انتها به رسوب سلولی ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی مونوکلونال اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد آنکوبه شدند. سپس سلول‌ها شسته شده و در پایان یک میلی‌لیتر بافر افزوده شده و سوسپانسیون یکنواختی به دست آمد و شدت فلورسانت اندازه‌گیری شد. داده‌ها پس از جمع آوری و دسته بندی با استفاده از آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند و $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

**الف ـ** قدرت کشندگی سلولی داروها و اثر آن‌ها بر تکثیر سلولی: اثرات کشندگی سلولی داروها به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان بود. میزان مرگ و میر سلول‌ها با تریپان بلو پس از ۴۸ ساعت درمان به ترتیب با غلظت‌های ۱۲/۸، ۳۰ و ۵۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر هارمین، هارمالین، و عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند به ۱۰۰ درصد رسید. آزمون ام تی تی نشان داد که حضور داروها باعث کاهش میزان جذب نوری نسبت به کنترل شده است که این اثر در عصاره‌ی اتانولی اسپند شدیدتر بوده است ($P<0/05$) (نمودار ۱). در تاثیر درمان سلول‌ها با غلظت‌های

[۸] RNase (Sigma)

[۹] Nitroblue tetrazolium

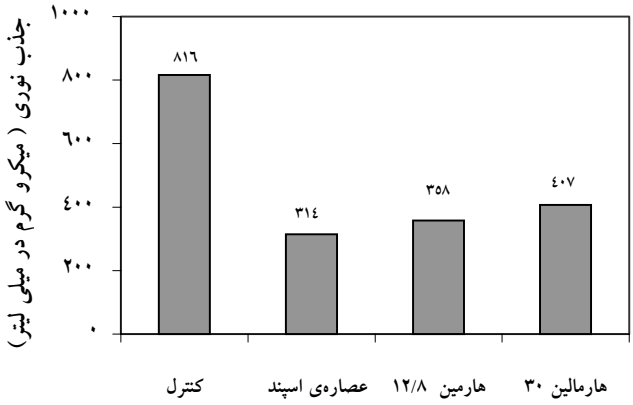
[۱۰] $CD_{11}b$, $CD_{14}$ (Dako)

www.SID.ir

Archive of SID

*جدول ۱- اثر عصاره‌ی اتانلی اسپند و آلکالوییدهای مشتق از آن در غلظت‌های مختلف بر تعداد سلول‌های رده‌ی سلولی اچ ال ۶۰ در طول زمان و مقایسه‌ی آن با گروه کنترل، تهران ۱۳۸۱*

| نوع و غلظت دارو | تعداد سلول در ساعات مختلف ($10^4$ سلول در هر میلی لیتر) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (میکرو گرم در میلی لیتر) | ۰ | ۲۴ ساعت | ۴۸ ساعت | ۷۲ ساعت | ۱۲۰ ساعت |
| **کنترل** | ۱۰ | ۲۰/۱ | ۵۱ | ۱۱۵ | ۱۳۱ |
| **اسپند (۱۰)** | ۱۰ | ۱۶/۴ | ۴۰ | ۸۰ | ۹۲ |
| **اسپند (۵۰)** | ۱۰ | ۱۵ | ۱۱ | ۷ | ۵ |
| **اسپند (۵۰۰)** | ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| **هارمین (۰/۴)** | ۱۰ | ۱۸ | ۳۴/۵ | ۷۸ | ۶۷ |
| **هارمین (۶/۴)** | ۱۰ | ۱۲ | ۸/۵ | ۶ | ۳ |
| **هارمین (۱۲/۸ )** | ۱۰ | ۴/۵ | ۰ | ۰ | ۰ |
| **هارمالین (۱۰)** | ۱۰ | ۱۴/۵ | ۱۸/۷ | ۳۶ | ۸۰ |
| **هارمالین (۲۰)** | ۱۰ | ۸/۵ | ۶/۵ | ۴ | ۲/۵ |
| **هارمالین (۳۰)** | ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |




*نمودار ۱ ـ میزان جذب نوری سلول‌های تحت درمان با غلظت‌های سمی اسپند و آلکالوییدهای مشتق از آن در عرض ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل، تهران ۱۳۸۱*

غیر سمی ۰/۴، ۱۰ و ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر به ترتیب برای هارمین، هارمالین و عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند در عرض ۱۲۰ ساعت به تدریج تکثیر سلولی نسبت به کنترل کاهش داشت ($P< ۰/۰۵$) (نمودار ۲، جدول ۱). در غلظت‌های بینابینی سمی و کاهنده‌ی تکثیر، از رشد سلولی کاسته شده، اما میزان زنده بودن سلول نیز کمتر شد.

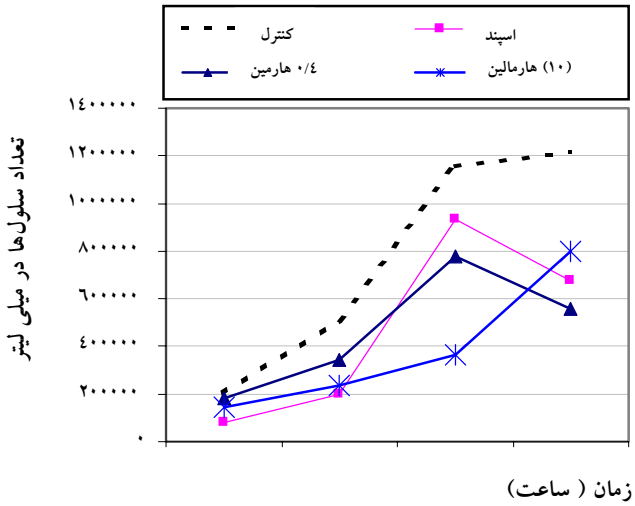
**ب ـ** بررسی اثر عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند بر چرخه‌ی سلولی: پس از ۴ روز درمان سلول‌ها با دوزغیر سمی عصاره‌ی اتانولی اسپند (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) و آ تی آر آ، چرخه‌ی سلولی در مقایسه با کنترل

*جدول ۲ ـ اثر عصاره‌ی اتانلی اسپند و ال ترانس رتینوییک اسید بر چرخه‌ی سلولی رده‌ی سلولی اچ ال ۶۰ پس از ۴ روز و مقایسه‌ی آن با گروه کنترل، تهران ۱۳۸۱*

| نوع داروی مصرفی | تعداد سلول ($10^4$ سلول در میلی لیتر) | درصد سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی | | |
|---|---|---|---|---|
| | | اس | جی ۲ | جی ۱ |
| **کنترل** | ۱۳۱ | ۴۰ | ۵/۱ | ۵۵ |
| **آل ترانس رتیوییک اسید** ($10^{-7}$ مولار) | ۷۰ | ۹/۲ | ۸/۳ | ۸۲/۵ |
| **عصاره‌ی اتانولی اسپند** (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) | ۹۲ | ۵۲/۷ | ۳/۲ | ۴۴/۵ |

www.SID.ir

Archive of SID




*نمودار ۲ ـ تعداد سلول‌های رده‌ی سلولی اچ ال ٦۰ بر حسب زمان و به تفکیک غلظت‌های غیر سمی اسپند و آلکالوییدهای مشتق از آن ( میکرو گرم در میلی لیتر) ، تهران ۱۳۸۱*

بررسی شد (جدول ۲). درصد سلول‌های موجود در فاز اس نسبت به کنترل ۱۲/۷ درصد افزایش نشان داد و از درصد سلول‌های موجود در فاز جی ۱ کاسته شد. سلول‌های تحت درمان با آ تی‌آر آ در مقایسه با کنترل در فاز جی ۱ به میزان ۲٦/۵ درصد افزایش نشان دادند و از درصد سلول‌های موجود در فاز اس کاسته شد.

**ج ـ** اثر داروها بر ایجاد تمایز سلولی: بعد از ۵ روز درمان سلول‌ها با دوزهای غیر سمی داروها، سلول‌های تحت درمان با آ تی آر آ به میزان ۸۰ درصد هسته‌های لبوله، سیتوپلاسم فاقد گرانول و آزروفیل به صورت سلول‌های تمایز یافته‌ی رده‌ی نوتروفیل مانند میلوسیت، متامیلوسیت و باند، خود را نشان دادند. سلول‌های تحت درمان باغلظت‌های غیر سمی عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند وهارمین هیچ‌گونه تغییرات مورفولوژیک بیان‌گر تمایز سلولی را بروز ندادند. سلول‌های تحت درمان با غلظت غیر سمی هارمالین (۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر) به میزان ۳۰ درصد تغییرات مورفولوژیکی را بروز دادند. به طوری که سلول‌ها تغییراتی را به شکل هسته‌ی متراکم، باندی شکل و یا هسته‌یدارای فرورفتگی و سیتوپلاسم فاقد گرانول آزروفیل که شبیه سلول‌های رده‌ی منوسیتی می‌باشد، نشان دادند (جدول ۳). پس از ۵ روز استفاده از غلظت غیر سمی داروها، آزمایش ان بی تی نشان داد که، سلول‌های تحت درمان با آ تی آر آ و هارمالین به میزان ٤۰ درصد و ۲۸ درصد احیای ان بی تی را نشان دادند (P<۰/۰۵) و سلول‌های تحت درمان با هارمین و عصاره‌ی اتانولی اسپند تغییرات چندانی نشان ندادند (جدول ۳). آزمایش‌های فلوسیتومتری جهت بررسی بروز شاخص‌های سطحی سی‌دی۱۱ بی و سی دی ۱٤ نشانه‌هایی از تمایز را در سلول‌های تحت درمان با غلظت‌های غیر سمی عصاره‌ی اتانلی گیاه اسپند و هارمین را نشان نداد. تنها سلول‌هایی که تحت درمان با غلظت غیر سمی هارمالین (۱۰میکرو گرم در میلی لیتر) بودند به میزان ٦٤ درصد بروز شاخص‌های سلولی فوق را نشان دادند، که مبین تمایز سلول به سمت رده‌ی منوسیتی می‌باشد.داروی آ تی آر آ به تنهایی باعث تمایز سلول‌ها به سمت رده‌ی نوتروفیلی با بروز ۸۷ درصد از شاخص سی دی ۱۱ بی شد (جدول ۳).

*جدول۳ ـ اثر اسپند و مشتقات آلکالوییدی آن بر تمایز سلول‌های اچ ال ٦۰ و مقایسه‌ی آن با گروه کنترل پس از ۵ روز، تهران ۱۳۸۱*

| نوع غلظت دارو | تغییرات مورفولوژیک (درصد) | ان بی تی (درصد) | شاخص‌های سی دی (درصد) |
|---|---|---|---|
| **کنترل** | ۲ | ۱ | ۳/۵ |
| **ال ترانس رتینوییک اسید** ($۱۰^{-۷}$ مولار) | ۸۰ | ٤۰ | ۸۷ |
| **اسپند** (۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر) | ٤ | ۳ | ۵/۸ |
| **هارمین** (۰/٤ میکرو گرم در میلی لیتر) | ۵ | ٤ | ۷/٤ |
| **هارمالین** (۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر) | ۳۰ | ۲۸ | ٦٤ |

www.SID.ir

Archive of SID

## بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که گیاه اسپند و آلکالوییدهای آن در غلظت‌های غیر سمی باعث کاهش تکثیر سلولی در لوسمی پرومیلوسیتی حاد می‌شوند. امروزه روش‌های درمانی متفاوتی جهت غلبه و کنترل کلون‌های بدخیم سلول‌های لوسمیک وجود دارند و شیمی درمانی به عنوان اصلی‌ترین روش درمانی، با عوارض گوارشی، نوروپاتی یا سرکوب مغز استخوان همراه است. تمایز درمانی و استفاده از داروهای آپوپتوتیک از جمله روش‌های درمانی است که در بیماران لوسمی حاد و به طور خاص در مورد بیماران مبتلا به‌لوسمی حاد پرومیلوسیتی مورد توجه واقع شده است. با استفاده از غلظت‌های فارماکولوژیک ترکیباتی مثل آ تی آر آ، ویتامین دی ۳، آرسنیک می‌توان به جای از بین بردن بلاست‌های لوسمیک، آن‌ها را به سلول‌های تمایز یافته تبدیل کرد و یا کلون بدخیم را از طریق مرگ سلولی نابود کرد (۲،۸،۹). وجود عوارض جانبی حاصل از داروهای شیمی درمانی، بروز مقاومت‌های دارویی و رسیدن به کمترین میزان عود، موجب پیشنهاد ترکیبی از روش‌های درمانی فوق برای درمان بیماران شده است. گیاه درمانی نیز با کم‌ترین عارضه‌ی جانبی به همراه سایر عوامل مورد توجه روز افزون پزشکان سراسر دنیا قرار گرفته است. آلکالوییدهای گیاهی یکی از مهم‌ترین ترکیبات گیاهی هستند که دارای اثرات ضد سرطان می‌باشند. اثر عصاره‌ی آلکالوییدی گیاه اسپند بر کاهش تکثیر سلولی رده‌های سلولی سرطانی از قبیل هپاتو سلولار کارسینوما، فیبروسارکومار و میلوما را در غلظت‌های کاهنده نشان داده است (۱۰). هم‌چنین تاثیرات مشتقات اسپند و هارمین بر انواع رده‌های سلولی سرطانی مقاوم به دارو به اثبات رسیده است و مرگ کامل سلولی وابسته به دوز دارو از ٤٨ تا ٧٢ ساعت گزارش شده است (۱۱). در مطالعه‌ی حاضر نیز اثرات کشندگی سلولی داروها به صورت وابسته به غلظت و زمان مشاهده شد. با افزایش غلظت و زمان مصرف، این داروها از خاصیت کشندگی سلولی زیادی برخوردار بودند و در غلظت‌های غیر سمی نیز رشد و تکثیر سلولی را کاهش دادند. هر چند مکانیسم عمل این داروها در این پژوهش بررسی نشد ولی مطالعات قبلی نشان داده‌اند که هارمالول و مشتقات آلکالوییدی اسپند از طریق آسیب‌های ایجاد شده در دی ان آ و ممانعت از تقسیم سلولی، از رشد سلول‌های لوسمیک کا ٥٦٢[11] جلوگیری می‌کند و بعضی مشتقات دیگر آن مانع از عملکرد آنزیم توپوایزومراز I می‌شود (۱۲،۱۳). در تحقیقات قبلی بعضی عوامل ضد تومورال و تمایز دهنده، تاثیر خود را روی فازهای مختلف سلول‌های لوسمیک اریترولوسمیا نشان داده‌اند (١٤). در اینجا نیز کاهش تکثیر، احتمالا به علت تاثیر روی چرخه‌ی سلولی می‌باشد، به طوری که اکثر سلول‌ها در فاز اس تغییرات خود را بروز دادند. در حالی که در سلول‌های تحت درمان با آ تی آر آ اکثر سلول‌ها در فاز جی ۱ تجمع داشتند. این موضوع در مطالعات قبلی هم به اثبات رسیده است (۱) و این اختلاف نشان دهنده‌ی اثرات مختلف این مواد روی چرخه‌ی سلولی می‌باشد. البته به جهت محدودیت‌های آزمایشگاهی، مطالعه‌ی سیکل سلولی در تمامی داروهای گیاهی انجام پذیر نبود. نکته قابل توجه در این بررسی مشاهده‌ی القای تمایز نسبی سلولی به سمت رده‌ی بالغ منوسیتی توسط هارمالین می‌باشد، که احتمالا تجربه‌ای جدید در مورد این ماده است. در موارد مصرف آ تی‌آر آ معمولا سلول‌ها به سمت رده‌ی نوتروفیلی بلوغ می‌یابند. این تفاوت در نوع تمایز سلولی نشان دهنده‌ی مکانیزم متفاوت تاثیر این مواد روی بیان ژنی می‌باشد (۲). در مورد آ تی آر آ ژن‌های مربوط به بلوغ سلول‌های نوتروفیلی و به طور عمده، فاکتورهای نسخه برداری[12] تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۱۵). در مورد نحوه‌ی اثر هارمالین مطالعه‌ای جداگانه مورد نیاز می‌باشد. در خاتمه می‌بایستی یادآور شد که نتایج این مطالعه حاصل کار در محیط آزمایشگاهی بوده و لزوم انجام تحقیقات بیشتر مورد تاکید می‌باشد.

---

[11] $K_{562}$

[12] Transcription

www.SID.ir

Archive of SID

**تشکر و قدردانی**

از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، آقای دکتر فریبرز معطر استاد محترم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به جهت تهیه عصاره‌ی گیاهی و آقای دکتر علی اکبر پور فتح اله مدیر گروه محترم هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس، خانم‌ها نیکوگفتار و دکتر آشتیانی که در مراحل مختلف انجام این بررسی ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

**منابع**

1- Fenoux P, Degos L. Differentiation therapy for acute promyelocytic leukaemia. ***N Engl J Med*** 1997; 337: 1076-8.

2- James SY, Williams MA, Newland AC, Colston KW. Leukemia cell differentiation. ***Gen Pharmacol*** 1999; 32(1): 143-54.

3- Waxman S.Differentiation therapy in AML. ***Leukemia*** 2000;14: 491-6.

٤ـ علی زرگری. ***فرهنگ گیاهان دارویی،*** جلد اول. تهران: انتشارات و چاپ دانشگاه تهران،١٣٧٨، صفحات ٨٢ـ٧٨.

٥ـ سید هادی صمصام شریعت. ***عصاره گیری و استخراج مواد موثر گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آن‌ها.*** تهران: انتشارات مانی ،١٣٧١، صفحات ٦٧ـ٦٥.

6- Al-allaf TA, Khizaie RF, Rashan LJ, Halaseh WF. Cytotoxicity activity of a series of tumor cell lines with various tumor ligands. ***Boll Chim Farm*** 1999; 138(6): 267-71.

7- Koeffler P. Human acute myeloid leukemia lines models of leukomogenesis. ***Semin Hematol*** 1986; 223-36.

8- Chelbi MK, Pelicano L. Retinoic acid and INF signalling cross talk in normal and RA-resistant APL cell. ***Leukemia*** 1999; 13:1167-74.

9- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xinong SM, Zhu J. Use of Arsenic trioxide in treatment of acute promylocytic leukaemia. ***Blood*** 1997; 89(9): 3345-53.

10- Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, Semzami M, Lyoussi B, Zaid A. Anti tumour principle from Peganum Harmala seeds. ***Therapie*** 1999; 54:753-6.

11- Ishida J, Wong HK, Baston KF, Hu CQ, Lee KH. Anti tumor agents 201 , cytotoxicity of harmine and β- carbolin analoges. ***Bioorg Med Chem Lett*** 1999; 9(23): 3319-24.

12- Boeira JM, Dasilva J, Erdtmann B, Henriques JA. Genotoxic effects of the alkaloids Harman and Harmine assesed by commet assay and chromosome abberration test in mammalian cell invitro. ***Pharmacol Toxicol*** 2001; 89(6) :287-94.

13- Sobhani AM, Ebrahimi SA, Mahmoodiani M. Invitro evaluation of human DNA topo isomerase I inhibition by Peganum Harmala and its beta carolin alkaloids. ***J Phamacol Sci*** 2002; 5:19-23.

14- Zaker F, May A, Burnett AK. Key regulatory gene expression in erythroleukemia differentation. ***Iran Biomed J*** 2002; 6(4) :97-103.

15- Mills KJ, Walsh V, Gilkes AF, Wood gate LJ, Brown G, Burnett AK. Induction of transcription factors expressed during ATRA-Induced neutrophil differentiation of Hl60 cells. ***Br J Hematol*** 1998; 163:38-92.

www.SID.ir