Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۵، شماره ۲، پائیز و زمستان ۸۰

اثر هم‌افزایی اینترفرون گاما و اریتروپوئیتین بر تمایز سلول‌های K562 تحت درمان با داروهای سایتوتوکسیک

عزیز محمودزاده[۱]، علی اکبر پور فتح ا...[۱]، دکتر فرهاد ذاکر[۲]

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی
۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

چکیده

لوسمی‌ها، نئوپلاسم‌هایی هستند که به واسطه استحاله بدخیم در یکی از پیش‌سازهای خونی به وجود می‌آیند. سلول بدخیم در مرحله‌ای از تمایز خود متوقف شده ولی همچنان به تکثیر خود ادامه می‌دهد. در دهه اخیر روش درمانی جدیدی پیشنهاد شده که بر اساس آن از موادی همچون سایتوکاین‌ها و داروهای شیمی درمانی با دوز کمتر و ... که سبب القاء تمایز در سلول‌های توموری می‌شود استفاده می‌کنند، این روش تمایز درمانی (Differentiation therapy) نام دارد. پژوهش حاضر نیز بر اساس این نوع درمان و با استفاده از سایتو کاین‌ها و داروهای شیمی‌درمانی صورت گرفته است.

از مواد مورد استفاده (اریتروپوئیتین، اینتروفرون گاما، سیتارابین، آدریامایسین و وین کریستین) رقت‌های مختلفی تهیه و بر روی سلول‌ها اضافه شد. غلظت‌هایی که اثرات سیتوتوکسیک داشتند، کنار گذاشته شدند و ادامه کار با استفاده از غلظت‌های دیگر که اثرات سیتوتوکسیک نداشتند، صورت گرفت و در نهایت یک یا دو دوز اپتیمم (دوزهایی که بیشترین اثر تمایزی داشتند) انتخاب و اثرات تمایزی آنها به صورت مجزا و در ترکیب با یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های K562 به مدت هفت روز در معرض دوزهای اپتیمم قرار گرفتند و سپس از آنها با استفاده از سیتواسپین لام تهیه شد و لام‌ها با رنگ رایت و بنزیدین رنگ‌آمیزی شدند و از نظر تمایز مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کمی برای اثبات تمایز، اندازه‌گیری هم تولید شده بود که در مورد این سلول‌ها انجام شد. نتایج به دست آمده با استفاده از روش آماری (کای دو) و t-test نسبت به گروه کنترل مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفتند.

در بررسی‌های کیفی (سلول‌های بنزیدین مثبت و بررسی مورفولوژیکی) نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تمام داروها به جز وین کریستین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارند ($P<0/05$) که حاکی از اثرات تمایزی این داروهاست. نتایج بررسی‌های کمی نیز (میزان هم تولید شده) مؤید اثرات تمایزی این داروها بر روی سلول‌های K562 است ولی شدت این اثرات کاهش پیدا کرده بود.

واژه‌های کلیدی : لوسمی، نئوپلاسم، اینترفرون گاما، اریتروپوئیتین، داروهای سایتوتوکسیک، تمایز سلول‌های K562

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لوسمی‌ها، نئوپلاسم‌هایی هستند که از سلول‌های بدخیم خون‌ساز منشاء می‌گیرند و این کلون سلول بدخیم شده گسترش می‌یابد. علت اکثر لوسمی‌ها مشخص نیست ولی هم عوامل ژنتیکی و هم عوامل محیطی را در بروز آن دخیل می‌دانند.

سلول‌های بدخیم در مراحل اولیه بلوغ متوقف می‌شوند و فقط دارای رشد و تکثیر هستند، بعضی از پروتئین‌ها را ندارند و بعضی را به مقدار زیاد و نامتناسب دارند.

بر این اساس، به عنوان یک اصل در انکولوژی پذیرفته شده است که باید بدخیمی به روش‌های مختلفی از جمله رادیوتراپی، کموتراپی، ایمونوتراپی و جراحی حذف شود و سلول‌های بدخیم کشته شوند اما روش‌های فوق علاوه بر اثر روی سلول‌های سرطانی، بر روی بافت‌های سالم دیگر نیز اثر می‌گذارند [۱].

در دهه اخیر نوع جدیدی از درمان ارائه شده است که علاوه بر کارایی مناسب، دیگر اثرات جانبی به شدت روش‌های فوق را نیز ندارد. این نوع دیدگاه قابل قبول در درمان سرطان که با استفاده از سایتوکاین‌ها، داروهای شیمی درمانی با دوز کمتر و ... صورت می‌گیرد و سبب ایجاد فنوتیپ با تمایز بیشتر، فعال شدن آپاپتوزیس (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) و یا توقف رشد سلول‌های توموری می‌گردد، به نام تمایز درمانی (Differentiation therapy) معرف است [۲].

مواد و روش‌ها

سایتوکاین‌ها و داروها : اینتروفرون گاما از شرکت بوهرینگر (Bohringer)، اریتروپوئیتین از شرکت سیمبا (Cimba) و سیتارابین، وین‌کریستین و آدریامایسین از شرکت (Upjohn) خریداری شد.

در ابتدا دوزهای مختلفی آزمایش شدند و دوزهایی که اثرات سیتوتوکسیک داشتند، کنار گذاشته شدند و دوزهایی انتخاب شدند که اثرات سیتوتوکسیک نداشته باشند و در نهایت دوز اپتیمم (از نظر اثر تمایزی) انتخاب و آزمایش شدند.

(EPO) = ۲ و ۵ و ۱۰ (اریتروپوئیتین)

۲۰ و ۴۰ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ و ۴۰۰ Iu/ml

(گاما ـ اینترفرون)

(INF-γ) = ۱۰۰ و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰Iu/ml

(سیتارابین)

(CYT) = ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۵ و ۰/۰۰۲ µgr/ml

(آدریامایسین)

(ADR) = ۰/۰۰۰۲ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۴ µgr/ml

(وین کریستین)

(VCR) = ۰/۰۰۲ و ۰/۰۱ و ۰/۰۵ µgr/ml

کشت سلول K562 : رده سلولی K562 مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات تمایزی می‌باشد. این رده سلولی که از بیماری با لوسمی میلوئیدی مزمن در مرحله کریزبلاستی به دست آمده است، بر اثر تمایز به فرم‌های تکامل یافته‌تر رده سلولی اریتروئیدی تبدیل و شواهد تولید هموگلوبین در آن ظاهر می‌شود [۳].

سلول‌های K562 اهدایی دکتر ذاکر (سلول ا زگروه هماتولوژی دانشگاه ولز آورده شده است) که این سلول‌ها در محیط RPMI-1640 (Sigma) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (Gibco) کشت داده شدند و پس از چند روز که به میزان قابل توجهی رسیدند، سلول‌ها شمارش شده و درصد زنده بودن آنها تعیین شد. سپس تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

5×10^4 cell/ml انتخاب و در چاهک‌های پلیت کشت سلولی ریخته و رقت‌های مورد نظر از داروهای مذکور به آنها اضافه شد.

پس از هفت روز مجدداً سلول‌ها شمارش شده و درصد زنده بودن آنها تعیین شد. سپس به وسیله سایتواسپین از سلول‌ها لام تهیه و لام‌ها با استفاده از رنگ رایت و بنزیدین رنگ آمیزی شده و از نظر تمایز مورد بررسی قرار گرفتند. روش رنگ‌آمیزی رایت بدین صورت بود که لام‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در رنگ رایت قرار گرفته، سپس بر روی لام‌ها بافر رایت اضافه و پس از ۱۰ دقیقه لام‌ها را با آب جاری شسته و پس از خشک شدن مورد بررسی قرار گرفتند. در رنگ‌آمیزی بنزیدین ابتدا لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بنزیدین و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلولی (شامل ۵۰ درصد متانول، ۵۰ درصد آب مقطر و یک میلی‌لیتر H_2O_2) قرار داده شد و پس از آن لام‌ها را با آب جاری شسته و بعد از خشک شدن با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند [٤].

جهت تبدیل روش کیفی به کمی از روش اندازه‌گیری هم (Heme) استفاده شد. بدین صورت که تعداد 5×10^4 سلول در هر میلی‌لیتر انتخاب و در فلاسک ریخته شد (حجم نهایی فلاسک‌ها ۵ میلی‌لیتر بود) و بر روی این سلول ها مقدار معینی از داروهای مذکور اضافه شده و به مدت ۷ روز در انکوباتور دارای CO_2، ۵ درصد قرار گرفتند. پس از هفت روز تعداد 5×10^6 سلول برداشته شد و پس از لیز کردن سلول ها، میزان هم تولید شده به وسیله آنها به روش زیر اندازه‌گیری شد. بدین صورت که سلول‌ها در دور ۱۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌ها را یک بار با PBS شسته، سپس به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند و بعد از آن ۲ میلی‌لیتر محلول لیز کننده به آن اضافه و به شدت ورتکس شد.

در مرحله آخر لوله محتوی سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و مایع رویی جهت اندازه‌گیری هم تولید شده در ٤١٥ nm جمع‌آوری شد [۵].

در ضمن تعداد 5×10^6 اریتروسیت انسانی هم به عنوان کنترل مثبت انتخاب و مقدار آنها هم نیز اندازه‌گیری شد.

نتایج

از میان غلظت‌های اریتروپوئیتین فقط EPO = ۳۰۰ Iu/ml و EPO = ٤۰۰ Iu/ml اثر تمایزی داشتند که از بین این دو غلظت EPO = ۳۰۰ Iu/ml اثر تمایزی بیشتری داشت. از میان غلظت‌های اینترفرون گاما، INF-γ = ۱۰۰۰ Iu/ml و INF-γ = ۱۰۰۰۰ Iu/ml اثر تمایزی داشتند و غلظت INF-γ = ۱۰۰۰ Iu/ml اثر تمایزی بیشتری داشت.

از غلظت‌های انتخابی CYT، غلظت CYT = ۰/۰۰۰۱ µgr/ml اثر تمایزی داشت. از غلظت‌های ADR، فقط غلظت ADR = ۰/۰۰۰۲ µgr/ml اثر تمایزی داشت.

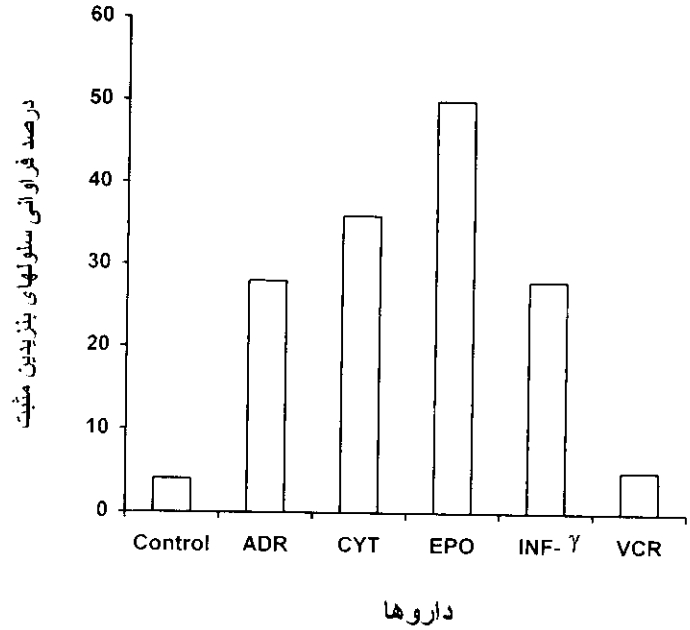
غلظت‌های انتخابی برای وین کریستین هیچ کدام اثر تمایزی از خود نشان نداد.

در روش کیفی، لام‌هایی که با رنگ رایت رنگ‌آمیزی شده بودند، از نظر تغییرات مورفولوژیک (سلول های بینابینی از رده اریتروئیدی) مورد بررسی قرار گرفتند (تعداد ۱۰۰ سلول شمارش شد).

لام‌هایی که با بنزیدین رنگ شده بودند، از نظر مثبت بودن بنزیدین مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۵۰۰ سلول شمارش شد و سلول‌های بنزیدین مثبت (سلول‌های آبی‌رنگ) نسبت به گروه کنترل (سلول‌هایی که هیچ دارویی به آنها اضافه نشده بود) مورد مقایسه قرار گرفتند.

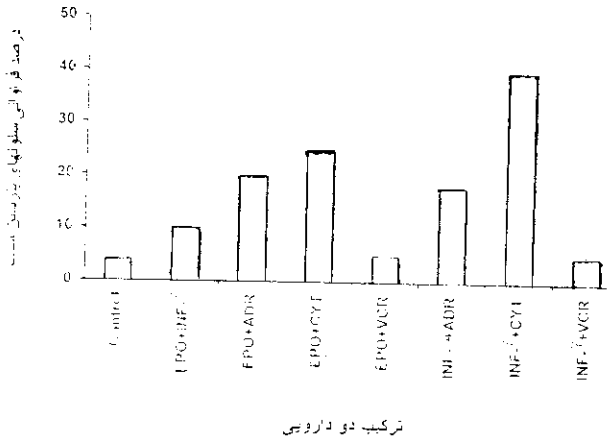
www.SID.ir

Archive of SID



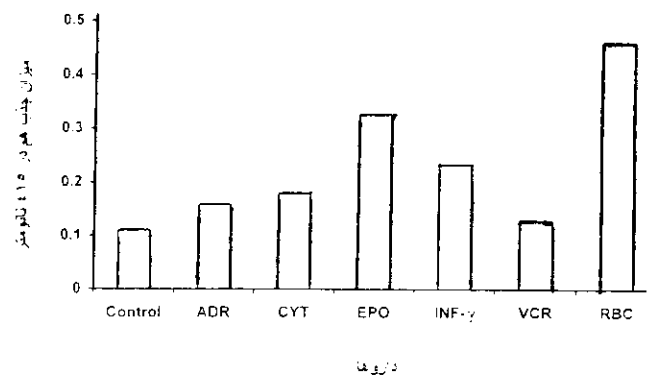
* P<۰/۰۵ , (Compared with Control)

نمودار ۱- بررسی و مقایسه فراوانی سلول های بنزیدین مثبت، نسبت به گروه کنترل



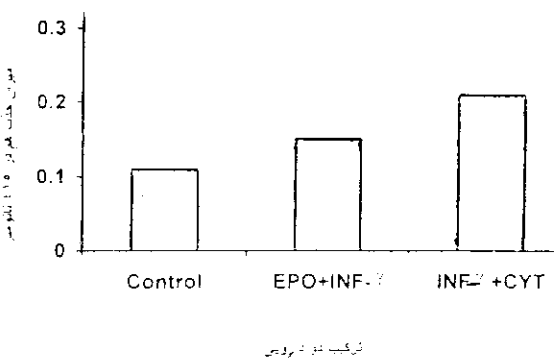
* P<۰/۰۵ , (Compared with Control)

نمودار ۲- بررسی و مقایسه فراوانی سلول‌های بنزیدین مثبت (ترکیب دو دارویی)، نسبت به گروه کنترل



* P<۰/۰۵ , (Compared with Control)

نمودار ۳- بررسی و مقایسه OD هم تولید شده، توسط داروها نسبت به گروه کنترل



P<۰/۰۵ , (Compared with Control)

نمودار ٤- بررسی و مقایسه OD هم تولید شده (ترکیب داروها)، نسبت به گروه کنترل

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه تأثیر داروها از نظر تولید هم نسبت به گروه کنترل

	X ± S.E	T	P
Cont	۰/۱۱۰۰±۰/۰۰۸		
EPO	۰/۳۲۸٤±۰/۰۰۳۷	۲٤/۷۸	<۰/۰۵
INFγ	۰/۲۳۳۹±۰/۰۱۰۸	۹/۲۲	<۰/۰۵
CYTA	۰/۱۷۹٤±۰/۰۰٤۸	۷/٤٤	<۰/۰۵
ADR	۰/۱۵۸٦±۰/۰۰٤۸	۵/۲۳	<۰/۰۵
VCR	۰/۱۲۹٤±۰/۰۰٤۵	۲/۱۱	<۰/۰۵
EPO+INFγ	۰/۱۵۱۰±۰/۰۰٤۲	٤/۵٤	<۰/۰۵

همان طور که در نمودار -۱ هم نشان داده شده است، اثرات تمایزی تمام داروها از نظر کمی (سلول‌های بنزیدین مثبت) نسبت به گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد، به جز وین کریستین که با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد.

در نمودار -۲ مشاهده می‌شود که ترکیب داروها با یکدیگر سبب کاهش اثرات تمایزی آنها می‌شود. به خصوص در ترکیب داروها با VCR اثرات تمایزی داروها به شدت کم می‌شود.

برای تبدیل روش کیفی به روش کمی میزان هم تولید شده توسط داروها در طول موج ٤۱۵nm اندازه‌گیری شد. همان طور که در جدول -۱ و نمودار -۳ نیز مشخص است، تمام داروها از نظر تولید هم نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارند، به جز وین کریستین. همچنین به عنوان کنترل مثبت، تعداد ۵×۱۰^{۶} cell/ml اریتروسیت طبیعی انسان انتخاب و میزان هم آنها نیز اندازه‌گیری شد که در نمودار مشخص است.

بیشترین میزان هم مربوط به اریتروسیت‌ها و پس از آن نیز متعلق به اریتروپوئیتین است.

همان طور که در جدول -۱ و نمودار -٤ هم مشخص است، میزان هم تولید شده در ترکیب داروها نسبت به تک‌تک آنها کاهش پیدا کرده است.

بحث

هدف رژیم‌های درمانی رایج کاهش سلول‌های بدخیم است و در تمایز درمانی به دنبال القاء تمایز سلولی و بازگرداندن سلول از حالت بلاستی به سوی یک سلول طبیعی می‌باشیم. این نوع درمان در دهه ۱۹۷۰ به وسیله Lotem و Sachs معرفی گردید. این دو با استفاده از تجربیات آزمایشگاهی در صدد راه‌اندازی سیستمی برای شناسایی کنترل کننده‌های سلولی و ملکولی بودند تا به وسیله آن منشاء سلول‌های لوسمی را شناسایی و نحوهٔ درمان آنها را ارائه نمایند [۲].

در سال ۱۹۷۸ Wang Yi dean در شانگ‌های چین توانست با استفاده از ATRA بیماران دچار لوسمی حاد پرومیلوسیتی را درمان کند [٦].

استفاده از ATRA در این نوع لوسمی بسیار موفقیت‌آمیز بود. ۲۳ نفر از ۲٤ نفر پاسخ کامل به درمان دادند، به طوری که ۸ نفر نیازی به شیمی درمانی نداشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

کارهای Wang سپس در فرانسه توسط Laurent Degos ادامه پیدا کرد. فرانسوی‌ها ابتدا روی دوز کم سیتارابین و Harringtonin (داروی چینی) کار می‌کردند که به دنبال موفقیت Wang با ATRA در چین، فرانسوی این دارو را روی سلول‌های تازه گرفته شده از بیماران لوسمی پرومیلوسیتی که در اولین عود قرار داشتند، امتحان کردند و ۹۵ درصد بیماران (۱۹ نفر از ۲۰ نفر) رمیشن کامل داشتند [۱]. در این موارد، بلوغ سلول‌های بلاستی بدون هیپوپلازی مغز استخوان بود.

از نظر سیتوژنتیکی نیز که با استفاده از کاریوتیپ و در رمیشن کامل صورت گرفت، کلون‌های غیر نرمال حذف شده بودند [۷].

گزارشات در مورد القاء تمایز در مورد اریتروپوئیتین مختلف است و Nana Kawasaki برای القاء تمایز از اریتروپوئیتین نوترکیب‌ها مستر چینی استفاده کرد (۲m Iu/ml) ولی هیچ گونه اثر تمایزی در سلول‌های K562 انسانی نداشت. در حالی که Hassan Towhid برای القاء تمایز از اریتروپوئیتین نوترکیب انسانی استفاده کرد (۲ Iu/ml) و موفق به تمایز رده اریتروئیدی شد [۸].

اریتروپوئیتین مورد استفاده ما (EPO = ۳۰۰ Iu/ml) اریتروپوئیتین نوترکیب انسانی است و اثرات تمایزی بسیار خوبی را از خود نشان داد.

با توجه به شمارش سلولی صورت گرفته در مورد اریتروپوئیتین (۵۰×۱۰^{۴} cell/ml) نسبت به کنترل (۹۰×۱۰^{۴} cell/ml) به نظر می‌رسد که اریتروپوئیتین اثر تمایزی خود را با کاهش تکثیر سلول‌های بدخیم انجام داده است.

در مورد اثرات تمایزی اینترفرون گاما، بیشتر تحقیقات در مورد HL-60 صورت گرفته ولی ما اثرات تمایزی بسیار خوبی را از اینترفرون گاما (INF-γ = ۱۰۰۰ Iu/ml) در رده سلولی K562 به دست آوردیم که در مورد این دارو نیز با توجه به شمارش سلولی صورت گرفته (۵۰×۱۰^{۴} cell/ml) نسبت به کنترل (۹۰×۱۰^{۴} cell/ml) به نظر می‌رسد که اینترفرون گاما نیز اثرات تمایزی خود را از طریق کاهش تکثیر سلول های بدخیم انجام می‌دهد.

در مطالعه سلیمانی و همکاران اینترفرون گاما سبب تشدید کاهش قدرت تکثیری سلول های بدخیم شده است. گرچه اثرات تمایزی نیز با ایجاد بلوغ در سلول قدرت تکثیری سلول را کاهش می‌دهد [۹].

Ebert و همکارانش اثرات تمایزی سیتارابین را در سلول‌های K562 نشان دادند. همچنانکه Cortesi و همکارانش نیز اثرات تمایزی این دارو را گزارش کرده‌اند [۱۰]. ما نیز اثرات تمایزی خوبی را از سیتارابین در سلول‌های K562 به دست آوردیم.

گزارشات در مورد اثر تمایزی آدریامایسین در سلول‌های K562 به ندرت است ولی ما اثرات تمایزی قابل توجهی از این دارو به دست آوردیم.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از اینترفرون گاما و اریتروپوئیتین به همراه داروهای سیتوتوکسیک علاوه بر تشدید اثرات ممانعت تکثیری و جلوگیری از رشد کلون بدخیم قادر است با القاء تمایز کمک مؤثری به رفع استحاله بدخیم در سلول مادری (stem cell) نماید و آن را به یک سلول رسیده و بلوغ یافته تبدیل نماید. کاهش پرولیفراسیون سلولی احتمالا به جهت تأثیرات مواد بر روی چرخه سلول می‌باشد و درصد زیادی از سلول در فازهای G0/G1 تجمع حاصل می‌کنند و از چرخه سلول خارج می‌شوند [۱۱].

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

[۱] *اصول طب داخلی هاریسون*، بیماری‌های خون هاریسون، ترجمه : هومان اکتائی، چاپ سیزدهم، تهران، انتشارات فرهنگ‌پرور، (۱۹۹٤) ۱٤۷-۱٤٥.

[2] Life, A., Nilsson, K. and Carl, O. K562-A human erythroleukemia cell line, ***Int. J. Cancer.,*** 23 (1979) 143-147.

[3] Bruce, D. The maturation of differentiation therapy, ***N. Eng. J. Med.,*** 327 (1992) 422-424.

[4] Fibach, E. Techniques for studying stimulation of fetal hemoglobin production in human erythroid cultures, ***Hemoglobin,*** 22 (1998) 445-448.

[5] Rutherford, T. and Weatherall, D.F. Dificient heme synthesis as the cause of noninducibility of hemoglobin synthesis in a friend erythroleukemia cell line, ***Cell,*** 16 (1979) 415-423.

[6] McKinnel, M.A., Blumenfeld, M. and Bergad, R.D. ***Differentiation and neoplasia,*** Springer-Verlag Company, Berlin, (1980) 203-209.

[7] Fenaux, P. and Degos, L. Differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia, ***N. Eng. J. Med.,*** 337 (1997) 1076-1078.

[8] Hassan, T., Wayne, L., Christopher, B. and John, R. Cooperative effects of human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and human recombinant erythropoietin in inducing erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line K562 colonogenic cells, ***Leukemia Res.,*** 13 (1989) 127-130.

[۹] سلیمانی، م.، پورفتح‌ا... ، ع.ا.، مؤذنی، س.م. مقایسه روش‌های محرومیت از رنگ‌پذیری و رنگ‌سنجی تترازولیوم (MTT assay) جهت بررسی اثرات داروهای سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های لوسمیک K562، ***مجله پژوهشی حکیم***، دوره ۱، شماره ۳، (۱۳۷۷) ۱۸۱-۱۸۸.

[10] Rowley, P.T., Ohlsson, B.M., Farley, B.A. and Labella, S. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells, ***Exp. Hematol.,*** 9 (1981) 32-37.

[11] Zaker, F. A novel model of differentiation therapy of leukaemia, ***British. J. Haematology,*** 1 (1996) 41.

www.SID.ir