Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۸۲

اثر سینرژیک اینترفرون گاما با داروهای شیمی درمانی روی KE-37

جواد آراسته[۱]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، دکتر سیدمحمد مؤذنی[۱]، مسعود سلیمانی[۲]

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی
۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون شناسی

چکیده

استفاده همزمان از مواد مؤثر بر پاسخ‌های بیولوژیک و داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی باعث افزایش کارائی و کاهش اثرات جانبی روشهای درمانی سرطان می‌گردد . هر چند مکانیسم دقیق واکنش بین این دو دسته از داروها به خوبی روشن نیست. اینترفرون گاما یکی از مدولاتورهای بیولوژیک می‌باشد که باعث افزایش تمایز و کاهش تکثیر سلولهای سرطانی می‌گردد و با داروهای ضد سرطان اثر سینرژیک دارد.

در این تحقیق با استفاده از رده سلولیKE-37 منتج شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع T به بررسی اثر هم‌افزائی اینترفرون گاما با بعضی از داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی پرداختیم.

ابتدا رده سلولی مذکور در فلاسک سلول کشت داده شد و سپس به پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای منتقل گردید. دزهای مختلف داروهای وین‌کریستین، متیل پردنیزولون و دونوروبیسین به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و میزان ۱۰۰ IU/ml اینترفرون‌گاما به محیط کشت سلولها در فواصل زمانی مختلف (ساعات صفر، ۸، ۳۶ و ۶۰) اضافه شد. اثر سینرژیک این داروها و اینترفرون گاما با استفاده از بررسی میزان تکثیر سلولها با روش سنجش MTT ارزیابی گردید. نتایج بدست آمده، مؤید اثر سینرژیک اینترفرون گاما با وین‌کریستین، متیل پردنیزولون و دونوروبیسین می‌باشد. بدین ترتیب که اینترفرون‌گاما اثر سیتوتوکسیک و یا سیتواستاتیک داروهای مذکور را افزایش داده و این افزایش از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد ($P<0.05$) علاوه بر این اضافه کردن اینترفرون‌گاما در ساعات ۳۶ و ۶۰ نسبت به ساعات صفر و ۸ پس از اضافه نمودن دارو در جلوگیری از رشد و تکثیر سلولها مؤثرتر می‌باشد ($P<0.05$).

واژه‌های کلیدی : اینترفرون گاما، ردهٔ سلولی، شیمی درمانی

مقدمه

شیمی‌درمانی ترکیبی به طور شایع در درمان لوسمی استفاده می‌شود. کاربرد تعدیل کننده‌های پاسخ بیولوژیک در ترکیب با داروهای شیمی درمانی روش درمانی جدیدی را با افزایش کارائی و کاهش اثرات جانبی و سمی پیشنهاد می‌کند. مکانیسم واکنش این تعدیل کننده‌های بیولوژیک با خودشان و با عوامل شیمی درمانی هنوز به طور کامل روشن

www.SID.ir

Archive of SID

نشده است.

IFN- γ نیز یکی از این تعدیل کننده‌های بیولوژیک است که دارای فعالیت ضدتکثیری و خاصیت تمایزی روی سلولهای لوسمی می‌باشد و همچنین با عوامل ضد لوسمی اثر سینرژیک دارد[۱].

اینترفرون گاما گلیکوپروتئینی مونومر با وزن مولکولی ۲۵-۲۰ کیلو دالتن و با خصوصیات چند عملکردی (Multifunctional) است که از سلول‌هایT و سلول‌های NK (Natural Killer cell) ترشح می‌شود. INF- γ در ابتدا توسط فعالیت ضد ویروسی آنها در دهۀ ۱۹۶۰ شناسایی شد. طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی در مورد INF- γ بصورت In vitro مشاهده شده که عبارتند از:

فعالیت ضد تکثیری روی سلول‌های توموری بصورت In vitro و در مدلهای حیوانی ، القاء آنتی‌ژن‌های MHC کلاس ۱ و ۲ ، القاء سنتز و ترشح IFN- α , IL-2 , TNF و IFN- β ، فعال کردن ماکروفاژها ، القاء ترشح ایمونوگلوبولین توسط سلول‌های B و افزایش تکثیر و بلوغ سلول B، افزایش فعالیت سلولهای NK، تنظیم فعالیت‌های سیتوکاین‌ها از طریق القاء سنتز سایتوکاین و سینرژیسم (Synergism) با سیتوکاین‌ها . فعالیت IFN-γ از طریق واکنش با گیرنده ویژه سطح سلول صورت می‌گیرد ، تعداد گیرنده‌های سطح سلول معمولاً کم بوده و دراکثر موارد از چند صد تا چند هزار در هر سلول می‌باشد [۳ و ۲].

مواد و روش‌ها

الف) تهیه محلول MTT

۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT (Sigma) در ۱۰ میلی‌لیتر PBS حل شد و با فیلتر ۲۲٪ میکرون استریل گردید. این محلول تا زمان استفاده در فریزر $-۲۰^{o}C$ نگهداری گردید.

ب) رده سلولی مورد استفاده

در این تحقیق از رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T انسانی شامل ، KE-37 که از بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد جدا شده است [۴] استفاده گردید، این رده سلولی از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه شد.

ج) کشت سلول

ابتدا رده سلولیKE-37 در محیط کشت RPMI 1640(Sigma) حاوی ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین (Sigma) و ۱۰۰µg/m استرپتومایسین (Sigma) و۱۰ درصد FCS (جهاددانشگاهی) در فلاسک کشت سلول (Nunc) و در انکوباتور$۳۷^{o}C$ حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. بعد از کشت سلول زمانی که تعداد سلولها به حد مورد نظر رسید انتقال سلول از فلاسک به پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول (Nunc) انجام گردید، بدین ترتیب که به هر چاهک پلیت کشت سلول ۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی$۱۰^{۶}$ cell/ml اضافه شد. غلظت‌های مختلف داروهای متیل پردنیزولون (Upjohn) ، وین‌کریستین (Gedeon Richter LTD) و دونوروبیسین (Farmitalia carlo erba) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. از هر دارو ۶ غلظت داروئی انتخاب گردید، بدین ترتیب که برای متیل‌پردنیزولون از غلظت‌های ۱۲۵۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰ ، ۱۰ ، ۲ و ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر (با ضریب رقت ۵)، وین‌کریستین از غلظتهای ۲۵۰ ، ۶۲/۵ ، ۱۵/۵ ، ۳/۹ ، ۰/۹۵ و ۰/۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر (با ضریب رقت ۵) و دونوروبیسین از غلظت‌های ۱۰ ، ۲/۵ ، ۰/۶۲۵ ، ۰/۱۵۵ ، ۰/۰۳۵ و ۰/۰۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (با ضریب رقت ۴) مورد استفاده قرار گرفت[۵].

د) سنجش MTT

به منظور بررسی تأثیر ترکیب IFN-γ و داروهای شیمی درمانی بر سلولهای سرطانی به روش سنجش MTT ،

www.SID.ir

Archive of SID

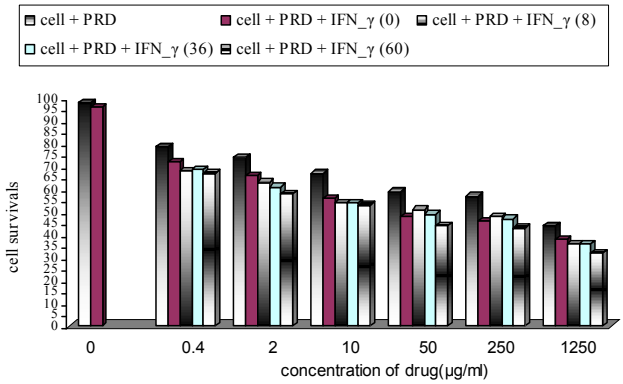
بعد از انتقال ۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به هر چاهک پلیت کشت سلول، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف دارو و ۱۰۰IU/ml اینترفرون گاما (Boehringer - GmbH) در ساعات صفر ، ۸ ، ۳۶ و ۶۰ به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید (تست‌ها به صورت دوتایی مورد آزمایش قرار گرفت). چاهکی که تنها شامل محیط کشت و فاقد سلول بود به عنوان Blank دستگاه الیزا ریدر انتخاب شد. چاهکهایی که فقط شامل سوسپانسیون سلولی بودند به عنوان کنترل انتخاب شدند و چاهکهائی که شامل سوسپانسیون سلولی و IFN-γ بود جهت بررسی اثر IFN-γ بر سلولهای لوسمیک استفاده شد.

سپس پلیت‌های کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. مدت زمان انکوباسیون چهار روز انتخاب شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک پلیت کشت سلول ، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۶ ساعت انکوبه گردید. سپس به هر چاهک حدود ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (HCl ۰/۴ N) اضافه کرده و محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط شدند. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت [۶].

نتایج

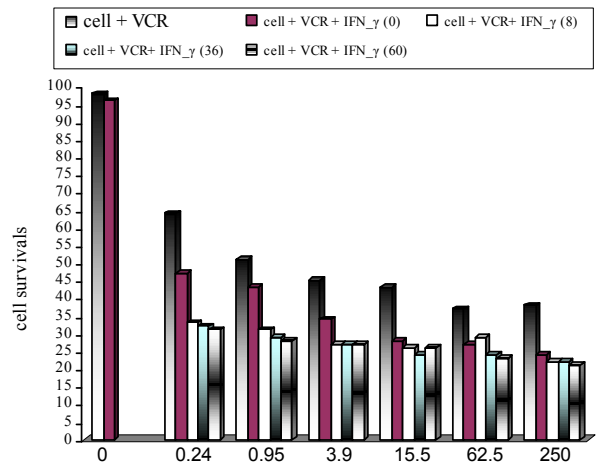
نتایج حاصل از تأثیر IFN-γ بر رده سلولی KE-37 نشان داد که IFN-γ به تنهایی تأثیر چندانی بر رده سلولی مذکور ندارد . ولی در مورد اثر ترکیبی IFN-γ با داروهای متیل پردنیزولون ، وین کریستین و دونوروبیسین بر روی این رده سلولی نتایج زیر بدست آمد :

تأثیر IFN-γ با داروی متیل پردنیزولون با غلظت‌های ۱۲۵۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰ ، ۱۰ ، ۲ و ۰/۴ میکروگرم در هر میلی لیتر روی این رده سلولی نشاندهنده کاهش بیشتر درصد سلولهای زنده (Viability) می باشد ($P<0.05$) و همچنین میزان LC_{50} (غلظتی از دارو که سبب مرگ ۵۰ درصد سلولها می‌گردد) در مورد این دارو حدود ۱۲۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه تأثیر فاصله زمانی بر اثر هم‌افزایی IFN-γ و متیل‌پردنیزولون در ردهٔ سلولی KE-37

اثر IFN-γ با داروی وین کریستین با غلظت های ۲۵۰، ۶۲/۵، ۱۵/۵ ، ۳/۹ ، ۰/۵۹ ، ۰/۲۴ میکروگرم در هر میلی لیتر بر روی این رده سلولی نیز مشخص شد که سبب افزایش فعالیت سیتوتوکسیسیتی این دارو بر سلولهای سرطانی می شود . ($P<0.05$) و میزان LC_{50} در مورد این دارو حدود ۱۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (نمودار ۲) .

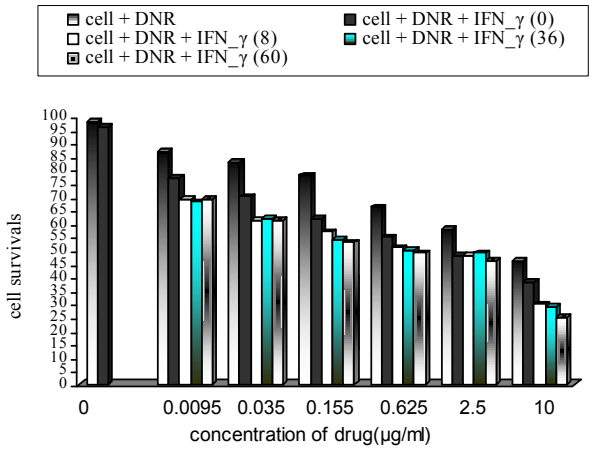


www.SID.ir

Archive of SID

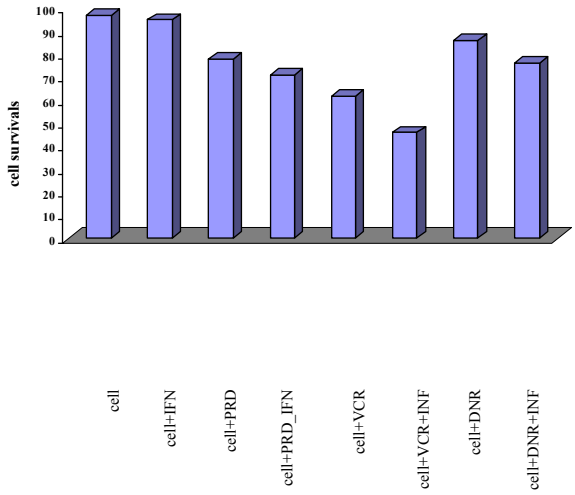
نمودار ۲- مقایسه تأثیر فاصله زمانی بر اثر هم‌افزایی IFN-γ و وین‌کریستین در ردهٔ سلولی KE-37

تأثیر IFN-γ با داروی دونوروبیسین با غلظت های ۱۰ ، ۲/۵ ، ۰/۶۲۵ ، ۰/۱۵۵ ، ۰/۰۳۵ و ۰/۰۰۹۵ میکروگرم در هر میلی لیتر نیز نتایج مشابهی بدست آمد و مشخص شد که این اثر سینرژیک باعث کاهش درصد سلولهای زنده می گردد که از لحاظ آماری این کاهش معنی دار می باشد ($P<0.05$) و میزان LC_{50} در مورد این دارو نیز ۰/۹۵ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (نمودار ۳) .

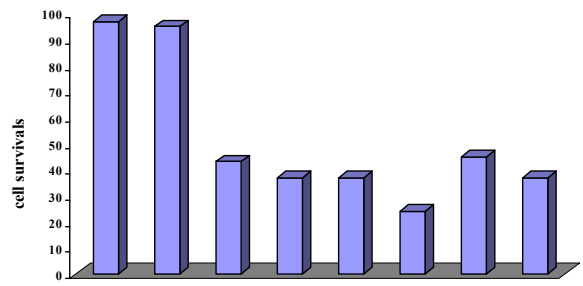


نمودار ۳- مقایسه تأثیر فاصله زمانی بر اثر هم‌افزایی IFN-γ و دونوروبیسین در ردهٔ سلولی KE-37

در مقایسه ای که بین غلظت های پایین داروهای متیل پردنیزولون (۰/۴µg/ml) ، وین کریستین (۰/۲۴µg/ml) و دونوروبیسین(۰/۰۰۹۵µg/ml) و همچنین غلظت های بالای متیل پردنیزولون (۱۲۵۰µ) ، وین کریستین (۲۵۰µg/ml) و دونوروبیسین (۱۰µg/ml) از نظر میزان تأثیر بر روی این رده سلولی صورت گرفت ، نتایج بدست آمده نشان داد که داروی وین کریستین چه هنگامی که به تنهایی و چه همراه با IFN-γ استفاده می شود نسبت به متیل پردنیزولون و دونوروبیسین باعث کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده می گردد (نمودارهای ۴ و ۵) .

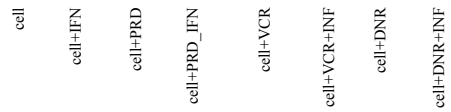


نمودار ۴- مقایسه غلظت‌های بالای متیل پردنیزولون، وین‌کریستین و دونوروبیسین بر ردهٔ سلولی KE-37



www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۵- مقایسه غلظت‌های پایین متیل پردنیزولون، وین‌کریستین و دونوروبیسین بر ردهٔ سلولی KE-37

همچنین نتایج نشان داد که اضافه کردن IFN-γ در ساعات زمانی ۳۶ و ۶۰ پس از کشت نسبت به زمانی که بلافاصله و ۸ ساعت بعد اضافه می شود کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده مشاهده می گردد ($P<0.05$) (نمودارهای ۱ و ۲ و ۳) .

بحث

تحقیق در مورد اثرات ضد لوسمی IFN-γ در ترکیب با داروهای شیمی درمانی در حال بررسی است . کافکا (Kafka) و همکاران نشان دادند که فعالیت Ara-c (سیتوزین آرابینوزید) (Cytosine arabinoside) روی سلولهای HL60 و سلول‌های پروژینتور CGL (Chronic granulocytic leukemia) (لوسمی گرانولوسیتی مزمن) توسط IFN-γ تقویت می‌گردد [۷]. همچنین هاریسون (Harrison) و همکاران به این نتیجه رسیدند که پاسخ سلول‌های لوسمیک P388 موشی به ترکیب Ara-C, IFN-γ بیشتر از Ara-C به تنهایی می‌باشد [۸].

کافکا و همکاران همچنین اثر ترکیبی قابل توجهی را وقتی IFN-γ همراه با 5 ـ FU (5-Fluorouracil) استفاده می‌شد ، مشاهده کردند این ترکیب نشان داد که به صورت سینرژیک، تکثیر و تشکیل کلنی سلول‌های HL60 همچنین سلول‌های پروژنیتور CML را مهار می کند [۷].

Elias و همکاران نیز عنوان کردند که رشد سلول HL 60 همچنین در حضور IFN-γ و5-FU کاهش می‌یابد [۹] . Margolin و همکاران نیز نشان دادند که همانند 5-FU، سیتوتوکسیستی سیس پلاتین (Cisplatin) در محیط In vitro همراه به IFN افزایش می‌یابد[۱۰].

Yoneda و همکاران عنوان کردند که اینترفرون با داروهایی مانند بلئومایسین (Bleomycin) ، آدریامایسین (Adriamycin) و وین کریستین ، با تأثیر روی غلظت داخل سلولی آنها واکنش می‌دهند [۱۱] .

نتایج حاصل از آزمایشات ما نیز حاکی است که ترکیب IFN-γ با داروهای مورد تحقیق باعث کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده می‌گردد که این اثر IFN-γ بر داروهای متیل پردنیزولون ، وین‌کریستین و دونوروبیسین ممکن است از طریق افزایش غلظت داخل سلولی این داروها و یا از طریق تعدیل و تنظیم فعالیت آنزیم‌های مربوط به متابولیسم این داروها صورت گیرد .

نتایج دیگر نشان داد که اضافه کردن IFN-γ در ساعات زمانی ۳۶ و ۶۰ پس از کشت نسبت به زمانی که IFN-γ بلافاصله و ۸ ساعت بعد اضافه می‌شود ، کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده مشاهده می‌گردد . این نتایج با یافته‌های آقای Novelli و همکاران هماهنگ است آنها در مطالعه‌ای که بر روی رده‌های سلولی ژورکت (Jurkat) ، PF382 و ST4 (رده‌های سلولیT بدخیم) (Malignant T-cell lines) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مجاورت این سلول‌ها با داروهای شیمی‌درمانی آنتی‌بلاستیک (Antiblastic) اتوپسید ، سیس پلاتین ، سیتارابین (Cytarabin) و دائونومایسین (Daunomycine) باعث افزایش تعدیلی بیان

www.SID.ir

Archive of SID

گیرندهٔ IFN-γ در سطح این سلول‌ها می‌شود و هر چه زمان مجاورت این داروها با سلول‌ها بیشتر باشد میزان بیان گیرنده IFN-γ نیز بیشتر می‌شود به طوری که در ۷۲ ساعت پس از کشت ، بیشترین میزان بیان این گیرنده وجود دارد[۱۲] . همچنین عنوان کردند که توانایی IFN-γ به القاء تکثیر یا آپپتوز به بیان کم یا زیاد این گیرنده بستگی دارد [۱۳] .

بنابراین شاید بتوان اینگونه اظهارنظر کرد که داروهای متیل پردنیزولون، وین کریستین و دونوروبیسین باعث افزایش بیان گیرنده IFN-γ در سطح سلول‌های KE-37 می‌شوند و هر چه از مجاورت این داروها با این سلول‌ها می‌گذرد بیان این گیرنده افزایش می‌یابد ، بنابراین در زمانی که IFN-γ را در ساعات ۳۶ و ۶۰ اضافه می‌کنیم کاهش بیشتری در درصد سلول‌های زنده مشاهده می‌کنیم که این کاهش در ساعت ۶۰ پس از کشت به خوبی نشان داده شده است .

منابع

داروهای سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی. **مجله پژوهشی حکیم** ، شماره ۳ ، دور اول ، زمستان ۱۳۷۷.

[1] Kafka M., Dvilansky A., Nathan I. Mechanism of interaction between interferon gamma and antineoplastic agent on the differentiation of HL-60 promyelocytic cells. ***Exp. Hematol.,*** 18(3): 153-8 ،1990.

[2] Drexler H.G., Zaborski M., Quentmeier H. Interferon-gamma induced proliferation of human myeloid leukemia cell lines. ***Br. J. Haematol.,*** 98: 699-710, 1997.

[3] Watson R.B., Galvani D.W., Nash J.R., Cawley J.C. Gamma interferon receptor expression in haemic malignancies ***Leuk. Res.,*** 14: 657-660, 1990.

[4] Carrel S. Monoclonal antibodies against idiotypic determinant (s) of the T cell receptor from HPB/All cells induse IL-2 production in jurkat cells without apparent evidence of binding. ***Eur. J.Immunol.,*** 16: 823-8, 1986.

[5] Kaspers G.J.L. In vitro drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood. ***Br. J. Cancer,*** 64: 469-474, 1991.

[۶] سلیمانی م.، پورفتح‌اله ع.، مؤذنی س. م. و کاویانی س. مقایسهٔ روش‌های محرومیت از رنگ‌پذیری و رنگ سنجی تترازولیوم (MTT assy) جهت بررسی اثرات

[7] Kafka M., Nathan I., Dvilansky A. New combination of 5-fluorouracil and interferon-γ effective against human myeloid leukemia in vitro. ***Anticancer Res.,*** 9: 1037-1040, 1989.

[8] Harrison S.D., Evaluation of combinations of interferons and cytotoxic drugs in murine tumor models in vivo.***J.Biol. Response Mod.,*** 9: 395-400, 1990.

[9] Elias L., Crissman H.A. Interferon effect upon the adenocarcinoma 38 and Hl-60 cell lines: antiproliferative responses and synergistic interaction with halogenated pyrimidine antimetabolites. ***Cancer Res.,*** 48: 4868-4873, 1988.

[10] Pinedo H.M., Longo D.L., Chabner B.A. ***Cancer chemotherapy and biological response modifiers,*** annual 15, Amesterdam: Elsvier, 1994.

[11] Yoneda K., Yamamoto T., Osaki T. Enhanced cytotoxicity of ontineoplasics by interferon. ***Nippon Gan Chiryo Gokkaishi,*** 25: 77-84, 1990.

[12] Novelli F., Allion A., Bernabei P., Rigamonti L., Forni G. Antiblastic chemotherapy drugs up-modulate interferon gamma receptor on

www.SID.ir

Archive of SID

expression of the IFN-gamma receptor on human T cells control whether IFN-gamma promotes proliferation or apoptosis. ***J. Immunol.,*** 152(2): 496-504, 1994.

[13] Novelli F.,. Envionmental signals influencing human malignant T cells. ***Cancer Detect. Prev.,*** 21(2): 191-5, 1997.

www.SID.ir