بررسی اثرات سیتوتوکسیک، تمایز و ایجاد آپوپتوز عصاره گیاهی ویسکام آلبوم بر روی سلولهای لوسمیک HL60 به تنهایی و در ترکیب با ATRA

*دکتر فرهاد ذاکر I

سعید عقیله II

دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله III

دکتر مسعود سلیمانی IV

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد(Acute promyelocytic leukemia=APL) یکی از انواع لوسمی‌های حاد با ترانسن لوکاسیون کروموزومی۱۷و ۱۵[T(15, 17)] و تجمع پرومیلوسیت‌های نئوپلاستیک که در تبدیل شدن به سلولهای بالغ ناتوانند، شناخته می‌شود. جهت درمان لوسمی‌ها از شیمی درمانی، داروهای تمایز دهنده و مواد ایجاد کننده آپوپتوزیس استفاده می‌شود. امروزه از عصاره‌های گیاهی جهت تحقیق و کاربرد کلینیکی در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود. در این مطالعه تاثیر عصاره گیاهی ویسکام آلبوم از نظر سیتوتوکسیسیتی، آپوپتوز و تمایز، بر روی سلولهای لوسمیک HL60 به عنوان مدل لوسمی پرومیلوسیتی به تنهایی و در ترکیب با ATRA(All trans retinoic acid) استفاده شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی در محیط آزمایشگاهی اثر سیتوتوکسیک عصاره گیاهی روی سلولهای لوسمیک HL60 به وسیله MTT(Dimethyl thiazole diphenile tetrazolium) بررسی شد و زنده بودن سلول با ستفاده از شمارش سلول و تریپان بلو مورد سنجش قرار گرفت. ایجاد تمایز روی رده سلولی در مجاورت با عصاره گیاهی توسط رنگ‌آمیزی گیمسا و NBT(Nitro blue tetra zolium) و ارزیابی مارکرهای CD11b و CD_{14} با استفاده از فلوسیتومتری مورد سنجش قرار گرفت. همچنین بررسی آپوپتوز نیز با استفاده از Annexin و PI(Propidine iodide) توسط فلوسیتومتری انجام گرفت.

یافته‌ها: عصاره گیاهی در غلظت کمتر از ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت، تاثیر سیتوتوکسیک نداشت اما بالاتر از این غلظت وابسته به دوز و زمان اثرات سیتوتوکسیک خود را نشان داد. در غلظت‌های ۵۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، تکثیر سلولی بدون مرگ سلولی که نتیجه اثر ضد تکثیری این دارو است، کاهش یافت؛ گر چه ایجاد تمایز به وسیله این عصاره گیاهی مشاهده نشد. همچنین در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان ۲٤ ساعت، شواهد کمی از آپوپتوز در مقایسه با دگزامتازون(به عنوان آپوپتوز مثبت) وجود داشت. ترکیب این عصاره گیاهی با ATRA تغییری در تمایز سلول نشان نداد و ATRA اثر تمایزی خود را حفظ کرد؛ هر چند که تکثیر سلولی نسبت به ATRA به تنهایی کاهش بیش‌تری نشان داد که مبین خاصیت هم‌افزایی است.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج بدست آمده، عصاره گیاهی مورد مطالعه روی رده سلولی HL60 اثرات سمی و خاصیت ضد پرولیفراتیو داشت و تا حدودی نیز آپوپتوز مشاهده شد. استفاده از آن به عنوان یک دارو جهت درمان در کنار دیگر داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایز دهنده مانند ATRA، نیازمند تحقیقات تکمیلی است.

کلیدواژه‌ها: ۱ – لوسمی پرومیلوسیتی حاد ۲ – ویسکام آلبوم ۳ – سیتوتوکسیسیتی ۴ – آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۸٤/۲/۲۸، **تاریخ پذیرش:** ۸٤/۱۲/۱٦

مقدمه

لوسمی میلوییدی حاد یک اختلال نئوپلاستیک در سلولهای خونساز می‌باشد که در نتیجه اختلالات کروموزومی و جهش در سلولهای پیش‌ساز خونی ایجاد می‌شود، در نتیجه توانایی سلولها برای پاسخ به پیام‌هایی که تمایز

I) استادیار گروه هماتولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

II) کارشناس ارشد گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

III) دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

IV) استادیار گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

و بلوغ را تحریک می‌کنند، از بین می‌رود. یکی از انواع لوسمی‌ها، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic leukemia=APL) است که با ترانس لوکاسیون کروموزومی ۱۷و ۱۵ [T(15,17)] و تجمع پرومیلوسیت‌های نئوپلاستیک، که در تبدیل شدن به سلولهای بالغ ناتوانند، شناخته می‌شود.

در سالهای اخیر تحقیقات قابل توجهی در مورد اثر عوامل تمایز دهنده و کشنده سلول و آپوتیوتیک در درمان لوسمی حاد میلوییدی و بخصوص لوسمی پرومیلوسیتی انجام شده است و داروهای آل‌ترانس رتینوتیک اسید(ATRA) و ترکیبات آرسنیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند.[۱-۳] امروزه، به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی، مقاومت‌های دارویی و از طرفی شناخت پروتئین‌های ادغامی و پیدا کردن نقاط اثری برای القاء تمایز و آپوپتوز انتخابی، دستیابی به گیاهان دارویی با اثرات جانبی کمتر که بتواند تأثیرات داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایز دهنده را افزایش بدهد، مورد توجه قرار گرفته است.[۴-۶] داروهای گیاهی، منبع با ارزشی برای تولید انواع محصولات دارویی و داروهای شیمی درمانی می‌باشند.

به همین دلیل، در این مطالعه از عصاره گیاهی ویسکام آلبوم(Viscum album) که به زبان فارسی به دارواش و در انگلیسی به Mistletoe شناخته می‌شود، استفاده شد. این گونه گیاهی در مناطق مختلف اروپا، آسیا و از جمله ایران یافت شده است و از قدیم به عنوان گیاهی دارویی و مقدس شناخته شده است. این ماده از نقطه‌نظر طبقه‌بندی براساس اثر دارویی، جزو ضد تومورها(Cytostatica) می‌باشد. برگ سبز رنگ آن حاوی ویسکوتوکسین، کولین، استیل کولین و ترکیبات آلی دیگر است و در اروپا به عنوان درمان مکمل سرطان استفاده می‌شود.[۷و ۸] در مطالعه حاضر عصاره این گیاه از نظر سیتوتوکسیسیتی، تمایز و آپوپتوز بررسی شد؛ ضمناً اثر ترکیبی این عصاره از نظر تمایز با داروی آل ترانس رتینوئیک اسید (All trans retinoic acid) که یک رژیم استاندارد برای درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد است، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی در محیط آزمایشگاهی می‌باشد که نمونه‌ها تحت اثر دارو و بدون آن(کنترل) قرار گرفتند.

عصاره گیاهی ویسکام آلبوم با غلظت نهایی ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد؛ بدین صورت که ابتدا پودر برگها با الکل اتانول، مخلوط و از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون زیر هود بیولوژیک استریل گردید. این استوک به مدت چندین ماه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. داروی ATRA به صورت تجارتی از شرکت Acros خریداری شد و در اتانول مطلق حل شد و غلظت اولیه 10^{-5} مولار از آن، تهیه و در آزمایشات از غلظت 10^{-7} مولار آن استفاده شد.

تعداد 10^{5} سلول در میلی‌لیتر از رده سلولی HL60(هدیه دکتر ذاکر) در RPMI(Sigma) و ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (Sigma) همراه با آنتی‌بیوتیک و ۵٪ CO_2 با غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی در پلیت‌های چند خانه‌ای، کشت داده شد. در خلال ۵ روز با استفاده از تریپان بلو(Merck) و لام هموسیتومتر، زنده بودن سلولها(Viability cell) و شمارش سلول بررسی شد. به منظور بررسی اثر سمیت از روش MTT(Dimethyl thiazole diphenile tetrazolium) استفاده شد که اساس آن، رنگ‌سنجی است. بعد از انتقال ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی 10^{5} سلول در هر میلی‌لیتر به هر چاهک از پلیت‌های ۹٦ خانه‌ای، ۲۰ میکرولیتر از رقتهای مختلف عصاره تهیه شده، اضافه گردید. پلیت‌های آماده شده در انکوباتور به مدت یک تا ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 قرار گرفتند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، به هر چاهک، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده و سپس ٦-٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد؛ سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی(Merck) جهت حل کردن رسوب

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

فورمازون اضافه شد و توسط الیزاریدر(Dynex) جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. در تمام مراحل از سلولهای HL60 بدون تاثیر دارو به عنوان کنترل استفاده شد.

برای بررسی تمایز و بلوغ سلولی، از سه روش مورفولوژی سلولی، نیتروبلوتترازولیوم (Nitro blue tetra zolium=NBT) و فلوسیتومتری استفاده شد. سلولها به مدت ۵ روز در پلیت‌های چند خانه‌ای تحت درمان با غلظت‌های غیر سمی قرار گرفتند؛ از سلولهای HL60 بدون تاثیر دارو و با اضافه کردن ATRA به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد.

جهت تغییرات مورفولوژی با استفاده از دستگاه سیتواسپین(Shandon) اسمیر تهیه شد و با رنگ گیمسا (Merch) رنگ‌آمیزی انجام شد و با میکروسکوپ نوری مراحل بلوغ و تکامل آنها به سمت رده‌های بالغتر نوتروفیل و مونوسیتی بررسی شد. تست NBT(Merck) براساس توانایی نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها در احیاء NBT و تشکیل فورمازان می‌باشد که با قرار دادن قطره‌ای از محیط مورد نظر بین لام نئوبار و لامل، درصد سلولهایی که در آنها فورمازان تشکیل شده است(دانه‌های قهوه‌ای متمایل به تیره) نسبت به تعداد کل سلولها بدست می‌آمد.

از فلوسیتومتری برای تشخیص مارکرهای سلولی استفاده شد، در این روش تعداد سلولها باید حداقل به 10^6 سلول در میلی‌لیتر برسد، سپس با استفاده از بافر PBS(Phosphate buffer saline)(Merck) شستشو انجام گرفت و با اضافه کردن آنتی‌بادی‌های منوکلونال CD11b و CD_{14}(Dako) به مقدار ۱۰ میکرولیتر به مدت ۲۰ دقیقه لوله‌ها در تاریکی نگهداری شدند و سپس با PBS، ۲ بار شستشو داده شدند و در نهایت به دستگاه فلوسیتومتری Beckton Dickinson داده شدند و هر یک از منحنی‌های هیستوگرام از لحاظ مارکرهای سلولی آنالیز گردیدند.

جهت بررسی سلولهای آپوپتوتیک، Annexin V (IQ Holand) متصل شده با مواد فلورسانس در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، در بافر مربوطه، رقیق شده و قبل از آزمایش به صورت تازه تهیه شد. همچنین محلول ذخیره PI(Propidine iodide)(IQ Holand) با غلظت ۱ میلی‌لیتر تهیه شد. یک میلیون سلول در میلی‌لیتر در بافر حاوی Annexin V به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و سوسپانسیون محلول PI به آن اضافه شد، بطوری که غلظت نهایی PI برابر ۱ میکروگرم در ۱ میلی‌لیتر شد. سلولها به وسیله فلوسیتومتری با اندازه‌گیری فلورسانس سبز رنگ Annexin V در طول موج ۵۳۰ نانومتر و اندازه‌گیری فلورسانس قرمز رنگ PI در طول موج ۶۰۰ نانومتر آنالیز شدند.

داده‌ها پس از جمع‌آوری بر حسب مورد با استفاده از آزمون T، تجزیه و تحلیل شدند و $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برای این منظور ابتدا غلظت‌های مختلفی از عصاره گیاهی بر روی سلولها تاثیر داده شد و پس از انجام شمارش سلولی و تعیین درصد زنده بودن سلولها در روزهای مختلف، دوزهای کشنده و کاهنده پرولیفراسیون سلولی بدست آمد.

همچنانکه در جدول شماره ۱ مشهود است در سلولهای بدون تاثیر دارو(کنترل)، تکثیر سلولی در روزهای مختلف، افزایش نشان داد؛ در سلولهای تحت درمان با عصاره گیاهی در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، تکثیر سلولی مشابه با کنترل بود، اما در غلظت‌های ۳۰ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، عصاره گیاهی باعث کاهش در میزان تکثیر سلولی شد و درصد سلولهای زنده خوب بود که بدین ترتیب رابطه معنی‌داری با کنترل از نظر تعداد سلولها وجود داشت($P<0/05$). در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بسته به غلظت و زمان، کاهش شدید در تکثیر سلولی مشاهده شد و ضمناً دارو اثرات سمی خود را به میزان زیاد نشان داد، چنانکه در روز پنجم بخصوص در غلظت‌های ۵۰۰ و

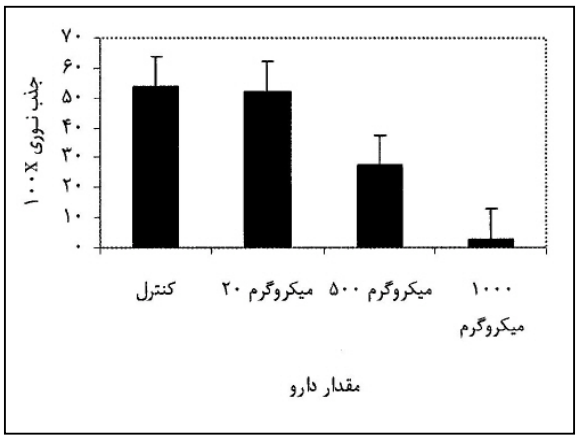
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاهش رشد سلولی بسیار شدید بود.

جدول شماره ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه ویسکام آلبوم بر رشد رده سلولی HL60 در روزهای مختلف (از غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به بالا در مقایسه با کنترل، P<۰/۰۵)

غلظت میکروگرم در میلی‌لیتر دارو	تعداد سلول زنده(10^4 سلول در هر میلی‌لیتر) در روزهای مختلف				
	۰	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۱۲۰ ساعت
کنترل	۱۰	۲۳	۵۶	۱۱۸	۱۳۵
۱۰	۱۰	۲۲	۵۶	۱۱۵	۱۳۲
۲۰	۱۰	۱۹/۴	۵۳	۱۱۷/۶	۱۲۰
۳۰*	۱۰	۱۶	۴۴	۷۸	۹۴
۵۰*	۱۰	۱۵	۴۰	۷۳	۹۰
۱۰۰*	۱۰	۱۵	۳۳	۶۷	۴۸
۳۰۰*	۱۰	۱۴/۲	۲۶	۴۱	۲۳
۵۰۰*	۱۰	۱۴	۲۸	۱۷	۸
۱۰۰۰*	۱۰	۱۲	۱۷	۱۱	۶/۵

جهت بررسی تایید سیتوتوکسیسیتی از روش MTT استفاده شد. چنانکه در نمودار شماره ۱ مشهود است، در سه دوز انتخابی ۲۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ـ به ترتیب بدون تاثیر سیتوتوکسیک، تاثیر سیتوتوکسیتی نسبی و تاثیر سیتوتوکسیتی مطلق در مقابل کنترل، سنجش شده‌اند ـ هر چه عصاره گیاه اثر سیتوتوکسیک کمتری داشته باشد، مقدار جذب نوری بالاتر است؛ چنانکه در دوز ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، جذب نوری معادل با کنترل دارد، یعنی ماده اثر سیتوتوکسیک نداشته است اما در مقابل، دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پایین‌ترین جذب نوری را دارد که نشانه اثرات سیتوتوکسیک قوی می‌باشد(P<۰/۰۵). نتایج غلظت ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در لیتر و نتایج غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در لیتر، مانند هم بودند.



نمودار شماره ۱- نتایج MTT بر میزان جذب نوری رده سلولی HL60 پس از ۴۸ ساعت درمان با غلظتهای مختلف ویسکام آلبوم (P<۰/۰۵ در غلظت‌های ۲۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)

بعد از گذشت ۵ روز از درمان سلولها با غلظت‌های غیرسمی داروها، سلولهای تحت درمان با ATRA با غلظت 10^{-7} مول در لیتر، به میزان ۸۰٪ هسته‌های لوبوله، سیتوپلاسم حاوی گرانول و سلولهای بینابینی تمایز یافته میلوسیت، متامیلوسیت، باند و نوتروفیل را نشان دادند. سلولهای لوسمیک تمایز نوتروفیلی را با افزایش درصد NBT و CD مارکرها، خصوصا CD11b نشان دادند(P<۰/۰۵). عصاره گیاهی در غلظت‌های کاهنده پرولیفراسیون یعنی ۳۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به تنهایی تاثیر تمایز دهنده نشان ندادند. بطوری که سلولها هیچ گونه تغییرات مورفولوژی نداشته، تست NBT منفی و مارکرهای سلولی CD_{14} و CD11b بروز نداشتند. عصاره گیاهی در ترکیب با ATRA هیچ گونه افزایش در تمایز نشان نداد و اثر مهارکنندگی هم وجود نداشت(P<۰/۰۵). نکته قابل توجه این که ترکیب آن با ATRA با کاهش افزون‌تر رشد و تکثیر سلولی همراه بود(جدول شماره ۲).

غلظتهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به جهت اینکه شروع سیتوتوکسیک را نشان می‌دادند انتخاب شدند. بعد از گذشت ۵ روز از مجاورت عصاره گیاهی با

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

جدول شماره ۲- نتایج حاصله از تاثیر ویسکام آلبوم، ATRA و ترکیب آن دو بر القاء تمایز رده سلولی HL60 پس از ۵ روز(در مقایسه با کنترل (P<۰/۰۵) در ATRA و ترکیب آن با ویسکام آلبوم)

	کنترل	ATRA	Viscum.Album+ATRA	Viscum.Album
غلظت	۰	$۱۰^{-۷}$ مول در لیتر	۳۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌متر و $۱۰^{-۷}$ مول در لیتر	۳۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر
NBT%	۳	٤۰	٤٥	۲
CD_{11b}%	۰/۳	۸٦/۹	۸۰	۱/۳
CD_{14}%	۱/۱٤	۱۰/۳	۸	۰/۷

غلظت‌های مذکور، مراحل آماده شدن و شستشو جهت فلوسیتومتری انجام شد و مشاهده شد که هیستوگرام این دو غلظت عصاره گیاهی تا حدی شبیه بهم بودند و درصد کمی آپوپتوز را در مقابل ۷۸٪ آپوپتوز توسط دگزامتازون با دوز ۵۰ میکروگرم (به عنوان کنترل مثبت) نشان می‌دادند، اما چون احتمال داده می‌شد که آپوپتوز زودتر رخ دهد، لذا غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بررسی شدند و مشاهده شد که در زمان ۲٤ ساعت حدود ٦٪ آپوپتوز وجود داشت، اما در زمان‌های ٤۸ و ۷۲ ساعت، آپوپتوز کمتر شده بود. ضمناً در سلولهای کنترل منفی که تحت تاثیر هیچ دارویی نبودند، آپوپتوزیس مشاهده نشد.

بحث

امروزه روشهای درمانی مختلف به منظور از بین بردن کلونهای بدخیم در لوسمی بکار گرفته می‌شوند. شیمی درمانی، مهم‌ترین درمان جهت ریشه‌کن کردن سریع لوسمی و القای بهبودی کامل می‌باشد اما امروزه به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی به نوعی دیگر از درمان توجه شده است. برای مثال درمان خاص بیماران مبتلا به APL، تمایز درمانی و ایجاد آپوپتوز می‌باشد.[۱۰-۸] درمان با آرسنیک در بیماران مبتلا به APL کاربرد دارد، آرسنیک در غلظت‌های پایین، با ایجاد تمایز و در غلظت‌های بالاتر، با القاء آپوپتوز در سلولهای لوسمیک و از بین بردن پروتئین ادغامی PAR/PML (Retinoic acid receptor/promyelocyte leukemia) در بیماران مبتلا به APL، بهبودی ایجاد می‌نماید.[۱۱] عوامل تمایز دهنده دیگری مثل ویتامین D_3 و ATRA وجود دارند که در دوزهای مختلف باعث تمایز و آپوپتوز می‌شوند اما با این حال، این نوع روشهای درمانی نیز با مواردی از مقاومت و عود بیماری همراه هستند.[۱۲] استفاده از عصاره گیاهان دارویی، یکی از روشهای درمانی است که مورد توجه روز افزون در سراسر دنیا قرار گرفته است.

عصاره گیاهی ویسکام‌البوم نوع Isorel یک محصول گیاهی است که در درمانی سرطان به عنوان ادجوانت استفاده می‌شود و به صورت ترکیبی با سیکلوفسفامایدباعث افزایش کارایی آن می‌شود. عصاره ویسکام آلبوم دارای دو خواص، پایداری DNA و تحریک ایمنی در غلظت‌های پایین و خاصیت سیتوتوکسیک/سیتواستاتیک در غلظت‌های بالاتر می‌باشد، همچنین باعث تحریک آپوپتوز می‌شود.[۱۳و ۱٤] در تحقیق حاضر، عصاره اتانولی ویسکام آلبوم که از سوش ایرانی و از درخت ازگیل تهیه شده است، در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر سیتوتوکسیک از خود نشان داد که این اثر وابسته به دوز و زمان بود، تا جایی که در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بیش‌ترین اثر سیتوتوکسیک مشاهده شد. در غلظت‌های غیرسمی ۵۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، اثر آنتی پرولیفراتیو و ضد توموری مشاهده شد که می‌تواند باعث کاهش رشد سلولهای سرطانی شود. تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که لکتین‌های ویسکام‌آلبوم بخصوص نوع

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

Iscador روی رده‌های سلولی سرطانی و سلولهای سرطان پوست، باعث فعالیت ضد سرطانی می‌شود و حدوداً ۷۰٪ کاهش رشد وجود داشته است.[۱۵] از نظر آپوپتوزیس مشخص شد که القاء کمی وجود داشته است. در مطالعات قبلی اثر آپوپتوز لکتین‌های گیاهی ویسکام آلبوم بخصوص گونه کلراتوم و لکتین II روی رده سلولی U937 میلومونوسیتی انسانی و HL60 مشاهده شده است و این اثر به واسطه فعال شدن کاسپس‌های(Caspases) ۳، ۸و ۹ بوده است.[۱۶و ۱۷] چون خاصیت آپوپتوز بودن دارو را، به نوع درخت میزبان، تهیه عصاره و زمان برداشت گیاه نسبت داده‌اند، احتمال دارد در مطالعه حاضر عوامل مذکور در کاهش آپوپتوزیس در این عصاره گیاهی موثر بوده است. ضمن اینکه نیاز به مطالعه بیش‌تر در طیف غلظت‌های مختلف ضروری می‌باشد، پروسه سیتوتوکسیک بودن گیاه را به یک سری عوامل فعال بیولوژیک از جمله ویسکوتوکین و لکتین‌های II و د-گالاکتوز نسبت داده‌اند و شواهد نشان داده است که حداقل دو راه کشتن سلول با واسطه سیتوتوکسیسیتی وجود دارد: یکی مرگ سلولی با واسطه آپوپتوزیس و دیگری مرگ سلولی به صورت صدمه زدن به غشاء سلول است که با نفوذ کلسیم رخ می‌دهد.[۱۸] در این مطالعه نشانه‌هایی از القاء تمایز با این دارو مشاهده نشد که موید مطالعات قبلی است و در ترکیب با ATRA تاثیری در کاهش تمایز نداشته است و جالب اینکه اثر هم‌افزایی در کاهش تکثیر سلولی داشته است که به عنوان اثر ضد توموری قابل توجه است. کاهش تکثیر و خاصیت ضد توموری، احتمالاً به علت تاثیر روی چرخه سلولی می‌باشد که در مطالعه قبلی در مورد ATRA، اکثر سلولها در فاز G1 تجمع داشتند[۱۹] که به جهت محدودیت‌های آزمایشگاهی، مطالعه سیکل سلولی امکانپذیر نشد.

بطور کلی در مطالعات مختلف اثرات سیتوتوکسیک، آپتوپتوتیک و تحریک سیستم ایمنی بر روی سلولهای سرطانی از طریق In vitro و پری کلینیکال اثبات شده است. تاثیرات مختلف و بیولوژیک این عصاره گیاهی بستگی به نوع روده سلولی و فرم عصاره دارد و هنوز اطلاعات کافی در مورد فارماکوکینتیک و سمیت محصولات آن بخوبی روشن نیست.[۲۰]

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که می‌توان برای از بین بردن سلولهای سرطانی پرومیلوسیتی، از این عصاره گیاهی در غلظت‌های بدست آمده استفاده نمود و یا به منظور افزایش اثر سایر داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایز دهنده، آن را بکار برد؛ چرا که این دارو تکثیر سلولی را کاهش می‌دهد و خاصیت ضد توموری دارد، بدین ترتیب داروهای سیتوتوکسیک دیگر و یا داروهای تمایز دهنده به میزان بیش‌تری تاثیرات خود را برجا می‌گذارند. در خاتمه یادآوری می‌شود که نتایج این مطالعه، حاصل کار در محیط آزمایگشاهی است و لزوم انجام تحقیقات بیش‌تر مورد تاکید می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این پروژه با همکاری و مساعدت جناب آقای دکتر معطر، استاد محترم دانشگاه علوم پزشک اصفهان که زحمت تلخیص و عصاره‌گیری را به عهده داشتند و سرکار خانم اودی از سازمان انتقال خون ایران و جناب آقای ارجمند انجام شد که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از ایشان ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

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

2- Waxman S. Differentiation therapy in acute myeloid leukemia. Leukemia 2000; 14: 491-6.

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

4- Chen Z, Wang ZY, Chen SJ. Acute promyelocytic leukemia: Cellular and Molecular basis of differentation and apoptosis. Pharmacol Ther 1997; 76: 141-9.

5- Burnett AK, Eden OB. The treatment of acute leukemia. Lancet 1997; 349: 270-5.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

6- Slack IL, Rusinlak ME. Current issues in manegement of APL. Ann Hematol 2000; 79: 227-38.

۷- معطر فریبرز، صمصام شریعت هادی، درمان با گیاه، موسسه انتشارات مشعل اصفهان. چاپ اول، ۱۳۷٦؛ صفحه: ۷۰-٦۸.

8- Wyllie A, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of Apoptosis. Int Rev Exp Pathol 1999; 32: 323-54.

9- Tallman MS. Differentating therapy with all trans retinoic acid in AML. Leukemia 1996; 10(suppl 2): 512-15.

10- Rowan S, Fisher DE. Mechanism of apoptotic cell death. Leukemia 1997; 11: 457-65.

11- Chen CQ, Shi G, Tang W, Xinong SM, Zhu J. Use of arsenic trioxide in treatment of APL. Blood 1997; 89(9): 3345-53.

12- Akihiro M, Mashahiro K, Kenji F. 1, 25 dihydroxy vitamin D3 induces differentiation of a retinoicacid resistant Acute promyelocytic leukemia cell line(4F-1) associated with expression of P21 WAF/cip 1 and p27 kipi. Blood 1999; 7(93): 2225-33.

13- Bussing A, Suzart K, Bergmann J, Pfulkr U. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with viscum album L is Mediated by the mistletoe lectins. Cancer lett 1996; 99(1): 59-72.

14- Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K. An overview an anticancer activities of viscum album extract Isoral. Cancer Biother Radiopharm 2001; 16(1): 55-62.

15- Maier G, Fiebig HH. Absence of Tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extract in vitro. Anticancer Drugs 2002; 13(4): 373-9.

16- Bussing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of viscum album L extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. Anticancer Res 1999; 19(1A): 23-8.

17- Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK. Activation of caspase cascades in korean mistletoe(viscum album var. coloratum)lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. Gen Pharmacol 2000, 34(5): 349-55.

18- Pae HO, Seo WG, Shin M, Lee HS, Kim SB, Chung HT. Protein kinase A or C modulates the apoptosis inducced by lectin II isolated from korean mistletoe, viscum album var coloratum, in the human leukemic HL-60 cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 2000; 22(2): 279-95.

۱۹- ذاکر فرهاد، ادوی آرزو، محمودیان محمود، سلیمان مسعود، اثرات گیاه اسپند و آلکالوئیدهای آن بر روی رده سلولی لوسمیک حاد پرومیلوسیتی، مجله علمی دانشگاه پزشکی زنجان ۱۳۸۳؛ (٤٥): ۱۵-۷.

20- Mansky PJ. Mistletoe and cancer. Sem In Oncol 2002; 29(6): 589-94.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]

The Effects of Cytotoxicity, Differentiation and Apoptosis of Viscum Album Lectin Extract on HL60 Cells Individually and in Combination with ATRA

*F. Zaker, Ph.D.[I] S. Aghileh, MSc[II] A.A. Pourfatollah, Ph.D.[III]
M. Solaimani, Ph.D.[IV]

Abstract

Background & Aim: Acute promyelocytic Leukemia(APL) is a kind of acute leukemia characterized by a balanced t(15, 17) translocation and the accumulation of neoplastic promyelocytes which fails to develop into mature cells. In the recent years, chemotherapy, differentiation agents and apoptotic drugs have beed used in treatment of leukemia. Recently, plant extracts have been used for treatment of cancers in research and clinical application. The aim of the present research was to study cytotoxicity differentiation and apoptosis of viscum album lectin extract on HL60 cells individually or in combination with ATRA.

Materials & Methods: Cytotoxic effect of extract on HL60 cells was studied by MTT colorometric assay and viability was monitored using cell counting and trypan blue. Differentiation induction of cells after treatment was examined by Geimsa staining, NBT test and evaluation of CD11b and CD14 markers flowcytometry. Apoptosis was also observed using Annexin and PI through flowcytometry.

Results: The data showed this extract was not cytotoxic in lower than 20μg/ml in 72hrs, but it had cytotoxic effect over this concentration in a dose and time-dependent manner. In concentrations of 30μg/ml, cell proliferation decreased with good viability revealing antiproliferative effects of this agent. However, differentiation induction effect was not observed with this agent. In proper dose(100μg/ml) in 24 hrs, little evidence of apoptosis was seen compared to dexamethasone(dexamethasone as a positive control). The combination of this agent with ATRA did not show any effect on differentiation of cells. However, ATRA preserved its effect of differentiation with higher cessation of proliferation.

Conclusion: This extract had antiproliferation and cytotoxic effect on HL60 cells depending on concentration. However, effect on apoptosis was minimal. The combination of this extract with cytotoxic drugs and differentiation agents requires further investigation.

Key Words: 1) Acute Promyelocytic Leukemia 2) Viscum Album 3) Cytotoxicity 4) Apoptosis

*I) Assistant Professor of Hematology Department. Cellular Molecular Research Center. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
II) MSc in Hematology. Hematology Department. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.
III) Associate Professor of Immunology Department. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.
IV) Assistant Professor of Hematology Department. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-10-04]