بررسی اثرات ضد تومور و تمایزی آلکالوییدهای هارمین و هارمالین روی سلول‌های لوسمیک درمان شده با ATRA و G-CSF

دکتر فرهاد ذاکر I

چکیده

در لوسمی حاد تمایز سلول‌های بدخیم متوقف شده و این سلول‌ها فقط تکثیر می‌یابند. در سال‌های اخیر غیر از شیمی درمانی ترکیبی، از عوامل تمایز دهنده، سیتوکین‌ها و داروهای سیتوتوکسیک در درمان لوسمی حاد به خصوص لوسمی حاد پرومیلوسیتی استفاده شده است. این مطالعه جهت ارزیابی تکثیر، میزان سمیت و تمایز مشتقات آلکالوییدی گیاه اسپند یعنی هارمین و هارمالین روی سلول‌های لوسمیک HL٦٠ به صورت تنها یا در ترکیب با ATRA، G-CSF انجام شد. یافته‌ها نشان داد که هارمین و هارمالین موجب کاهش و توقف وابسته به مقدار(دوز) و زمان رشد سلولی می‌شوند. کاهش در تکثیر سلول‌ها در مقدار مطلوب ناشی از خاصیت سیتواستاتیک دارو می‌باشد. غلظت مطلوب هارمین برای اثرات ضدتکثیری ٠/٤، ٠/٨ و ١/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای هارمالین ٦ و ١٠ میکروگرم در میلی‌لیتر بود اما در غلظت‌های بیش از ٦/٤ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هارمین و ١٠ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هارمالین، هر دو ماده سیتوتوکسیک بودند. ترکیب ATRA و G-CSF با هر یک از غلظت‌های مطلوب این دو ماده از تکثیر کم‌تری نسبت به ATRA و G-CSF به صورت همراه با هم برخوردار بود. سلول‌ها در غلظت مطلوب درجاتی از تمایز میلوییدی را از نظر مورفولوژی و NBT(Nitroblue tetrazolium) نشان دادند. این تمایز نسبت به ATRA، G-CSF به صورت همراه با هم کم‌تر بود و به طور عمده در رابطه با هارمالین با غلظت ١٠ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. آنالیز فلورسانت با به کارگیری شاخص‌های CD١٤ و CD١١b افزایش آن‌ها را به خصوص در CD١٤ نشان داد. ترکیب ATRA و G-CSF با هر یک از مواد ذکر شده تاثیری روی تغییرات تمایز نداشت. براساس نتایج به دست آمده هر یک از آلکالوییدهای گیاهی نام برده شده در مقدار مطلوب و غیرتوکسیک موجب کاهش تکثیر و به خصوص تمایز در هارمالین همراه بود. به طور کلی بررسی این مواد پنجره‌ای جدید را جهت درمان آنتی‌لوسمیک باز کرده است که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

کلیدواژه‌ها: ١ – لوسمی حاد پرومیلوسیتی ٢ – میزان سمیت ٣ – تمایز ٤ – هارمین ٥ – هارمالین

مقدمه

لوسمی حاد، نئوپلازی است که از سلول‌های بدخیم در مغز استخوان منشا می‌گیرد و به دنبال آن کلون بدخیم گسترش یافته و وارد خون و بافت‌ها می‌شود.

برای درمان بدخیمی‌های خونی حاد، از روش‌های مختلف از جمله شیمی درمانی استفاده می گردد که طی آن بافت‌های سالم نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرند.

تمایز درمانی(Differemtiation therapy) یک روش درمانی جدید در درمان بیماری‌های هیپرپرولیفراتیو و نئوپلاستیک است.

این روش با به کارگیری مشتقات اسید رتینوییک و ویتامین D٣ اهمیت زیادی پیدا کرده است(١) درمان موفقیت‌آمیز لوسمی حاد پرومیلوسیتی(APL) و سایر انواع

این مطالعه تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است(شماره ثبت: ٤٠٢).

I) استادیار گروه خون‌شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

AML، مسیرهای جدیدی را جهت دست‌یابی به ایجاد تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی(Apoptosis) تعیین کرده است.

تمایز درمانی در بسیاری از موارد با کاهش اختصاصی تکثیر سلولی همراه بوده(۲و ۳) و از خاصیت تومورزایی می‌کاهد.

در پروسه تمایز، پروتئین‌های تنظیمی(Regulatory) جهت بروز ژن‌های اختصاصی لازم هستند و فاکتورهای نسخه‌برداری(Transcription factors) نقش محوری را در فنوتیپ اختصاصی رده‌های سلولی ایفا می‌کنند(٤).

استفاده از ترکیب داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایز دهنده یک راه جدید و مؤثر برای درمان می‌باشد(٥).

از آن‌جا که شیمی درمانی اثرات جانبی سمی برای سلول‌های طبیعی دارد، استفاده از سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد در ترکیب با آن‌ها مؤثر می‌باشد(٦).

در "ترکیب درمانی" سلول‌های مقاوم با القا کننده‌ها تمایز می‌یابند(۷و ۸). آلکالوئیدهای گیاهی از جمله ترکیباتی هستند که روی سلول‌های سرطانی موثر می‌باشند.

اسپند و مشتقات آن در طب سنتی ایران در درمان تومورهای جلدی به کار برده شده است و در بعضی از مقالات نیز اثرات سیتوتوکسیک و فعالیت ضدسرطانی آن‌ها گزارش شده است که اغلب روی سلول‌های سرطانی غیرخونی بوده است(۹و ۱۰).

در این مطالعه از سلول‌های لوسمیک HL٦٠ که از بیمار APL جدا شده بود به عنوان مدل سلولی لوسمی حاد استفاده شد.

مشتقات آلکالوییدی گیاه اسپند(Peganum Harmala) یعنی هارمین و هارمالین جهت بررسی تکثیر، میزان سمیت و تمایز سلولی و در ترکیب با ATRA (آل ترانس رتینوییک اسید) و G-CSF (فاکتور رشد گرانولوسیتی) مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

ماده ATRA یک تمایز دهنده شناخته شده در درمان سرطان و لوسمی پرومیلوسیتی و G-CSF یک سیتوکین است که در تکثیر و تمایز سلولی، اثرات هم‌افزایی با ATRA دارد(۱۱و ۱۲).

روش بررسی

ـ کشت سلولی و بررسی اثرات داروها: سلول‌های لوسمیک رده میلوییدی HL٦٠ در محیط RPMI با ۱۰٪ FCS(Gibco) و همراه با آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین(Sigma) در انکوباتور حاوی ٥٪CO_2 در فلاسک کشت داده شدند. در آزمون‌ها از فاز لگاریتمی کشت نمونه برداری شد و به محیط کشت تازه در حجم معین با دانسیتی اولیه ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر در پلیت‌های چندخانه‌ای اضافه گردید.

برای ایجاد اثرات دارویی بر سلول‌ها رقت‌های لازم تهیه شد. ماده ATRA(Sigma) در اتانول مطلق و G-CSF(Neopagen) در PBS یا آب مقطر و مشتقات اسپند یعنی هارمین و هارمالین(Acros) در DMSO حل شد.

ـ بررسی تکثیر و میزان سمیت: شمارش سلولی و تعداد سلول‌های زنده با لام هموسیتومتر با استفاده از تریپان بلو(Merck) تا ٥ روز انجام شد.

برای بررسی درصد سلول‌های زنده از تست MTT (Dimethyl thiazole diphenile tetrazolium bromid) استفاده گردید که طی آن ۱۰۰۰۰۰ سلول در حجم ۸۰ میکرولیتر و میزان معین دارو در حجم ۲۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت‌های چندخانه‌ای اضافه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ٥٪CO_2 (معمولاً ۲ روز) انکوبه گردید.

پس از آن به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول با غلظت ٥ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از MTT(Sigma) و پس از ٤ ساعت ایزوپروپانول اسیدی(Merck) به هر چاهک اضافه شد و توسط Eliza reader(Dynex) میزان جذب نوری یا Optical density(OD) بر حسب شدت رنگ آبی فورمازان در طول موج ٥٧٠-٥٤٠ خوانده شد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

به منظور تبدیل OD به درصد سلول‌های زنده از فرمول $\frac{OD_{تست}}{OD_{شاهد}} \times ۱۰۰$ استفاده گردید.

ـ بررسی تمایز سلولی: تاثیرات داروها در پلیت‌های چندخانه‌ای حاوی سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر و غلظت‌های لازم داروها تا ۵روز صورت گرفت و در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 نگه‌داری شد.

تغییرات مورفولوژیک از طریق لام‌های Cytospin (Shandon) با رنگ‌آمیزی رایت ـ گیمسا (Merck) و تغییرات سلول به سمت رده‌های بالغ‌تر نوتروفیلی و مونوسیتی بررسی شد.

تست احیای NTB(Nitro blue tetrazolium)، (Merck) جهت بررسی فاگوسیتوز انجام گردید و شاخص بلوغ سلولی با تعیین درصد سلول‌های حاوی دانه‌های آبی تیره در لام هموسیتومتر به دست آمد. شاخص‌های سلولی CD11b، CD۱٤(Dako) با فلوسیتومتری (Becton Dickinson) برای بررسی تمایز به رده نوتروفیلی و مونوسیتی به ترتیب استفاده شد و شدت فلورسانس تجزیه و تحلیل گردید.

ـ روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: نتایج بر حسب نیاز با استفاده از Mann-whittney و نرم‌افزار SPSS و EXCEL محاسبه شد نتایج آزمون‌ها با گروه شاهد مقایسه گردید.

نتایج

I) نتایج ناشی از تاثیر روی تکثیر و میزان سمیت در سلول‌ها: در این مطالعه مقادیر مطلوب و کاهنده تکثیر و سیتوتوکسیک به دست آمد.

سلول‌های همراه G-CSF به میزان ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر یا بدون آن تغییراتی مشابه داشتند.

تغییر در سلول‌ها همراه با MATRA $۱۰^{-۷}$ یا ATRA با G-CSF نیز یکسان بود.

ـ اثرات هارمین از نظر تکثیر و میزان سمیت: غلظت‌های ۳/۲، ٦/٤ و ۱۲/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب از خاصیت سیتوتوکسیک بیش‌تری برخوردار بودند. حتی در روز سوم اغلب سلول‌ها به خصوص در ۱۲/۸ مرده بودند، از این رو از مقادیر مطلوب ٠/٤، ٠/٨ و ١/٦ استفاده گردید.

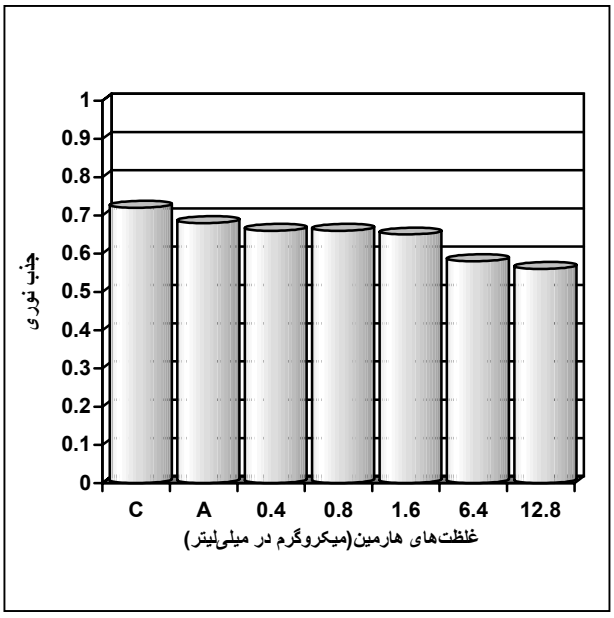
با افزایش دوز، شمارش سلولی کاسته شد اما تعداد سلول‌های زنده خوب بود.

کاهش رشد سلولی پس از ۵ روز در ATRA، غلظت‌های مختلف هارمین، G-CSF و ATRA با هارمین در غلظت‌های مختلف در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود($P<۰/۰۵$)(جدول شماره ۱).

کاهش رشد سلولی در تمام غلظت‌های هارمین، ATRA و G-CSF با هارمین در غلظت‌های مختلف در مقایسه با ATRA به تنهایی معنی‌دار نبود(جدول شماره ۱).

بررسی سیتوتوکسیتی در ATRA و غلظت‌های مختلف از هارمین نشان داد که غلظت‌های ٦/٤، ۱۲/۸ از خاصیت سیتوتوکسیک زیادی برخوردار هستند و اختلاف آن‌ها با گروه شاهد معنی‌دار بود($P<۰/۰۵$).

این تاثیرات وابسته به مقدار بود اما در سایر موارد تفاوت معنی‌دار نبود(نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱– تست MTT در سلول‌های HL٦٠ در غلظت‌های مختلف هارمین (Hi). C:شاهد، A: ATRA. $P<۰/۰۵$ در غلظت‌های ٦/٤ و ۱۲/۸ نسبت به گروه شاهد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

جدول شماره ۱- میانگین رشد سلول‌های HL۶۰ در هارمین(Hi) همراه با ATRA(A)، G-CSF(G)

	روزها			روز پنجم مقایسه با شاهد(P)	روز پنجم مقایسه با A(P)
	۰	۳	۵		
شاهد	۱۰۰۰۰۰	۸۳۴/۲۹۰ ± ۲۱۶/۹۴۰	۱/۵۱۶۰۰۰ ± ۲۵۶/۹۶۰	-	-
A	۱۰۰۰۰۰	۴۶۴/۲۹۰ ± ۹۸/۸۰۰	۶۴۶/۰۰۰ ± ۱۹۷/۶۹۰	۰/۰۰۹	-
Hi۰/۴	۱۰۰۰۰۰	۶۱۶/۶۷۰ ± ۴۱/۶۳۰	۹۱۰/۰۰۰ ± ۶۰/۰۰۰	۰/۰۲۵	۰/۰۵۵
Hi۰/۸	۱۰۰۰۰۰	۵۴۳/۶۷۰ ± ۲۰/۸۲۰	۶۶۶/۶۷۰ ± ۱۳۶/۲۹۰	۰/۰۲۵	۰/۸۸
Hi۱/۶	۱۰۰۰۰۰	۵۱۳/۳۳۰ ± ۵۱/۳۲۰	۴۴۶/۶۷۰ ± ۴۰/۴۱۰	۰/۰۲۴	۰/۰۹۸
A+G+Hi۰/۴	۱۰۰۰۰۰	۵۰۱/۶۷۰ ± ۲۵/۶۶۰	۷۲۰/۰۰۰ ± ۹۰/۰۰۰	۰/۰۲۵	۰/۴۵
A+G+Hi۰/۸	۱۰۰۰۰۰	۴۹۳/۳۳۰ ± ۱۱۹/۳۳۰	۵۸۰/۰۰۰ ± ۱۱۰/۱۵۰	۰/۰۰۹	۰/۷۵
A+G+Hi۱/۶	۱۰۰۰۰۰	۴۴۰/۰۰۰ ± ۸۱/۲۴۰	۳۹۵/۰۰۰ ± ۸۵/۳۲۰	۰/۰۰۹	۰/۴۵

ـ اثرات هارمالین از نظر تکثیر و میزان سمیت: غلظت‌های ۱۶، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب از خاصیت سمی بودن بیش‌تری برخوردار بودند. به خصوص این حالت در روز سوم و با غلظت ۴۰ مشاهده شد که اغلب سلول‌ها مرده بودند. از این رو از مقادیر مطلوب ۶، ۸ و ۱۰ استفاده گردید. با افزایش مقدار، از تعداد سلول (HL۶۰) کاسته شده و تعداد سلول‌های زنده خوب بود. کاهش رشد سلول پس از ۵ روز در ATRA، غلظت‌های مختلف هارمالین، ATRA و G-CSF با هارمالین در غلظت‌های مختلف در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود($P<0/05$)(جدول شماره ۲).

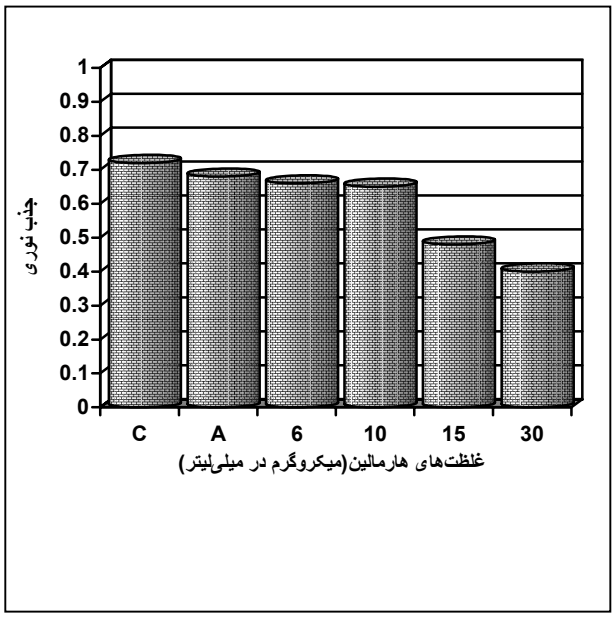
کاهش رشد سلولی در تمام غلظت‌های هارمالین، ATRA، G-CSF با هارمالین در غلظت‌های مختلف در مقایسه با ATRA به تنهایی معنی‌دار بود($P<0/05$)(جدول شماره ۲).

بررسی میزان سمیت در ATRA و غلظت‌های مختلف از هارمالین نشان داد که غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ از خاصیت سمی بودن زیادی برخوردارند و تفاوت آن‌ها با گروه شاهد معنی‌دار است ($P<0/05$). این تاثیرات وابسته به مقدار بود. اما در سایر موارد، تفاوت معنی‌دار مشاهده شد(نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۲- میانگین رشد سلول‌های HL۶۰ در هارمالین(Hi) همراه با ATRA(A) و G-CSF(G)

	روزها			مقایسه با شاهد روز پنجم(P)	مقایسه با ATRA روز پنجم(P)
	۰	۳	۵		
شاهد	۱۰۰۰۰۰	۸۳۴/۲۹۰ ± ۲۱۶/۹۴۰	۱/۵۱۶۰۰۰ ± ۲۵۶/۹۶۰	-	-
A	۱۰۰۰۰۰	۴۶۴/۲۹۰ ± ۹۸/۸۰۰	۶۴۶/۰۰۰ ± ۱۹۷/۶۹۰	۰/۰۰۹	-
Hl۶	۱۰۰۰۰۰	۳۸۶/۶۷۰ ± ۴۱/۱۳۰	۳۰۶/۶۷۰ ± ۱۲۵/۰۳۰	۰/۰۳۶	۰/۰۲۵
Hl۱۰	۱۰۰۰۰۰	۳۰۸/۲۳۰ ± ۵۱/۹۳۰	۲۰۶/۶۷۰ ± ۶۴/۲۹۰	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
A+G+Hl۶	۱۰۰۰۰۰	۲۶۵/۰۰۰ ± ۱۲۱/۵۲۰	۱۸۰/۰۰۰ ± ۶۰/۸۳۰	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
A+G+Hl۱۰	۱۰۰۰۰۰	۲۲۴/۲۹۰ ± ۴۸/۹۴۰	۱۷۰/۰۰۰ ± ۲۷/۳۹۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]



نمودار شماره ۲- تست MTT در سلول‌های HL۶۰ در غلظت‌های مختلف هارمالین(HI). C:شاهد، A: ATRA. P<۰/۰۵ در غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ نسبت به گروه شاهد.

II) نتایج حاصل از بررسی روی تمایز سلول‌ها: در این مطالعه از مقادیر دارویی که باعث کاهش تکثیر سلول شده بود استفاده گردید. سلول‌ها نیز از نظر تعداد سلول‌های زنده خوب بودند.

سلول‌های HL۶۰ در محیط کشت، ۹۵-۹۰٪ پرومیلوسیت و تعداد کمی بلاست دارند و میزان NBT و شاخص‌های CD11b و CD۱۴ آن‌ها خیلی ضعیف است.

سلول‌ها همراه با G-CSF یا بدون آن تغییرات مشابه داشتند.

تغییرات در سلول‌ها همراه ATRA یا ATRA و G-CSF نیز یکسان بود.

در این بررسی ماده ATRA موجب تمایز سلول‌ها به سمت رده نوتروفیلی شد واشکال بینابینی سلولی مانند میلوسیت، متامیلوسیت و باند و نوتروفیل مشاهده گردید.

درصد NBT و CD11b افزایش زیادی را نشان داد(P<۰/۰۵) اما در مورد هارمین، در غلظت‌های ۱/۶ و ۰/۸ تمایز از جنبه مورفولوژیک، NBT و شاخص‌های سلولی مشاهده نشد.

ترکیب G-CSF و ATRA با هارمین در غلظت‌های فوق از نظر مورفولوژیک، NBT و شاخص‌های فلوسیتومتری اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵)(جدول شماره ۳) که تمایز به سمت رده نوتروفیلی را نشان داد.

در رابطه با هارمالین در غلظت‌های ۶ و به خصوص ۱۰ تمایز مشاهده شد.

از نظر مورفولوژیک تعداد هستک کم و کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم و گرانول‌های سیتوپلاسمی و هم‌چنین سلول‌هایی شبیه اشکال مونوسیت با هسته‌های فرورفته مشاهده شد.

تست NBT نسبت به گروه شاهد معنی‌دار (P<۰/۰۵) و در غلظت ۱۰ این تفاوت آشکارتر بود.

در مقایسه با ATRA غلظت ۶ معنی‌دار(P<۰/۰۵) مشاهده شد اما غلظت ۱۰ معنی‌دار نبود.

این مطلب نشان دهنده آن است که در غلظت ۱۰ شدت تمایز با ATRA نزدیک است.

در مورد هارمالین به خصوص غلظت ۱۰ هر دو شاخص CD11b و CD۱۴ بروز یافته بودند که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت(P<۰/۰۵).

در مقایسه با ATRA غلظت ۶ معنی‌دار بود(P<۰/۰۵) اما غلظت ۱۰ معنی‌دار نبود که نشان می‌دهد شدت تمایز با ATRA نزدیک است.

اختلاف ترکیب G-CSF و ATRA با هارمالین در غلظت‌های فوق از نظر مورفولوژی وNBT و شاخص‌های فلوسیتومتری با گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۳) که تمایز به سمت نوتروفیل و غالب بودن اثر ATRA بر هارمالین را نشان می‌دهد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

جدول شماره ۳- میانگین درصد NBT و شاخص‌های CD11b و CD۱٤ در سلول‌های HL٦۰ همراه هارمین(Hi) و هارمالین(Hl) پس از ٥ روز

	٪NBT	٪CD11b	٪CD۱٤	مقایسه با شاهد(P)	مقایسه باATRA(P)
شاهد	۱/٥ ± ۱/۲	۱/۳ ± ۰/٤	۱/۲ ± ۰/۲	-	-
ATRA	٤۰ ± ٤	۷۱ ± ۱۰/٥	٥/۷ ± ٤/٤	۰/۰۰٥	-
Hi۰/۸	۲/٦ ± ۱/۳	٤/۸ ± ۱/۱	۲/۷ ± ۱/۲	۰/۱۲	۰/۰۳
Hi۱/٦	٤/٦ ± ۱/۱	٥/۲ ± ۲/۹	۳/۲ ± ۱/۳	۰/۱۲	۰/۰۳
A+G+Hi۰/۸	٤۲ ± ۳	٦۹ ± ۸/۹	٤/۳ ± ۱/٥	۰/۰۰٥	-
A+G+Hi۱/٦	٤۲ ± ۳	٥۹ ± ٦/۲	۲/۲ ± ۱/٤	۰/۰۰٥	-
Hl٦	۱٤/٦ ± ٤/۲	۱۳/۲ ± ۳/۱	۱۰/٦ ± ۲/۲	۰/۰۱	۰/۰۳
Hl۱۰	۲۸ ± ۹/۸	۲٤/۳ ± ٦/٥	٤۳/٥ ± ۱۰/۲	۰/۰۱	۰/۲۸
A+G+Hl٦	٤۳ ± ٥	۷٥ ± ٦/۳	۸/٥ ± ۱/٥	۰/۰٥	-
A+G+Hl۱۰	٤۳ ± ٥	٦۳ ± ٦/۱	۱٦ ± ۷/۳	۰/۰٥	-

بحث

هدف از برنامه رایج درمانی در لوسمی‌های حاد، از میان بردن سلول‌های بدخیم به طور عمده از طریق شیمی درمانی است اما در این روش سلول‌های طبیعی بدن هم تحت تأثیر قرار گرفته و در اغلب موارد عود مجدد بیماری رخ می‌دهد. تمایز درمانی همراه با شیمی درمانی(ترکیب درمانی) و استفاده از سیتوکین‌ها از برنامه‌های جدید درمانی است که موجب جلوگیری از ایجاد سلول‌های مقاوم به درمان می‌شوند(۱۳). عوامل تمایز دهنده‌ای مانند ATRA و ویتامین D۳، سلول‌های بدخیم و نابالغ میلوییدی را در جهت تمایز سلول‌های نوتروفیل و مونوسیت هدایت می‌کنند. براساس مشاهدات موجود در بیماران APL استفاده از ATRA در درمان مؤثر بوده است(٥). در یک مطالعه اثر سیتوکین‌های مختلف همراه با مشتقات ویتامین A(Retinoids) به صورت ترکیب درمانی جهت درمان بیماران AML مورد استفاده قرار گرفت که موجب افزایش پاسخ شده بود(۱۲). براساس تحقیقات اخیر ماده ارسنیک تری‌اکسید (AS_2O_3) باعث توقف رشد و القای تمایز در سلول‌های NB٤ و HL٦۰ می‌شود و در بیماران APL مورد استفاده دارویی دارد(۱٤و ۱٥).

در پژوهش حاضر از هارمین و هارمالین که آلکالوییدهای گیاه اسپند هستند استفاده شد این آلکالوییدها اثرات ضد سرطانی داشته و این اثر در چندین رده سلولی سرطانی مانند هپاتوکارسینوما گزارش شده است.

کاهش پرولیفراسیون سلولی در ۲٤ ساعت و مرگ سلولی با توجه به غلظت دارو در فاصله چند روز رخ می‌دهد(۱۰و ۱٦). اثرات سیتوتوکسیک هارمین و بعضی از مشتقات اسپند روی انواع رده‌های سلولی مقاوم به دارو با مکانیسم‌های مختلف مقاومت، به اثبات رسیده است(۹).

نتایج این تحقیق نشان داد که هارمین وابسته به دوز و زمان، در غلظت‌های اپتیمال ۰/٤ تا ۱/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب کاهش تکثیر و در غلظت‌های ٦/٤ به بالا موجب بروز اثرات سیتوتوکسیک می‌شود. ترکیب ATRA، G-CSF و غلظت‌های کاهش دهنده تکثیر هارمین نیز نتایج مشابه داشت. غلظت‌های مطلوب هارمین از تمایز برخوردار نبود اما ترکیب آن با ATRA و G-CSF تمایز مشابهی را با ATRA نشان داد. هارمالین در غلظت‌های ۱۰ به بالا به شکل وابسته به مقدار و زمان اثر سیتوتوکسیک داشت و در غلظت‌های ٦ و ۱۰ باعث کاهش تکثیر شد. ترکیب G-CSF و ATRA با هارمالین در غلظت‌های کاهنده تکثیر هارمالین نتایج مشابه داشت و از کاهش تکثیر بیش‌تری نسبت به ATRA به تنهایی برخوردار بود. غلظت ۱۰ هارمالین تمایز خوبی را نشان داد و ترکیب آن با ATRA و G-CSF نیز نتایج مشابهی را با ATRA به دنبال داشت. نکته قابل توجه این است که در مورد هارمالین به خصوص با غلظت ۱۰، تمایز مونوسیتی مشاهده شد و شاخص‌های CD11b و CD۱٤ که به ترتیب شاخص‌های نوتروفیلی و مونوسیتی هستند، با شدت بیش‌تری بروز یافته بودند در حالی که در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

مورد ATRA تنها CD11b بروز پیدا کرده بود. به طور خلاصه می‌توان گفت که هر دو داروی گیاهی آلکالوییدی اثرات خود را وابسته به مقدار و زمان نشان می‌دهند که این اثرات در غلظت مطلوب در کاهش تکثیر سلولی و در مورد هارمالین با تمایز همراه است.

اگر چه بیش‌ترین اثر در رابطه با هارمالین ۱۰ مشاهده شده اما اثر ATRA بر اثرات داروهای گیاهی مورد نظر، غالب بوده است زیرا در ترکیب با آن‌ها هیچ گونه اثر هم‌افزایی مشاهده نشد. اثر سیتوتوکسیک این داروها نیز نشان دهنده اثرات تخریبی و کشنده بر سلول‌های لوسمیک HL۶۰ می‌باشد. مکانیسم این داروها بررسی نشد اما مطالعات قبلی نشان داده است که هارمامول و مشتقات آلکالوییدی اسپند از طریق جلوگیری از ساخته شدن DNA و تقسیم سلولی مانع رشد سلول‌های لوسمیک اریتروییدی K۵۶۲ می‌شوند. مشتقات دیگر مانند هارمن از عمل‌کرد آنزیم توپوایزومراز I جلوگیری می‌کنند(۱۷).

کاهش تکثیر سلولی می‌تواند در نتیجه اثر داروها روی سیکل سلولی باشد که در مورد ATRA تجمع سلول‌ها در فاز G۱ به اثبات رسیده است(۳). نتایج این بررسی اثرات آنتی‌لوسمیک و تمایز نسبی مواد آلکالوییدی گیاهی را نشان می‌دهد و دریچه تازه‌ای را در بررسی و فهم بیش‌تر مکانیسم‌های حاکم بر لکوموژنزیس می‌گشاید که نیاز به تحقیقات گسترده‌تری در این زمینه دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران که بودجه لازم را جهت این طرح فراهم نمود و هم‌چنین مرکز تحقیقات سلولی مولکولی به خصوص خانم‌ها بخشایش و حیات و مدیریت گروه خون‌شناسی و کمک و راهنمایی‌های آقای سلیمانی از دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- James SY., Williams MA., Newland AC., Closton KW. Leukaemia cell differentiation. Cellular and molecular interaction of retinoids and Vitamin D, Gen Pharmacol, 1999, 32(1): 143-154.

2- Waxman S. Differentiation therapy in AML(non APL), Leukaemia, 2000,14: 491-496.

3- Fenoux P., Degos L. Differentiation therapy for acute promyelocytic leukaemia, N Engl J Med, 1997, 337(15): 1076-1078.

4- Kehrl JH., Hematopoietic lineage commitment. Role of transcription factors, Stem Cell, 1995, 13(3): 223-241.

5- Degos L. Differentiation therapy and leukaemia, Leukaemia, 1993, 7(5): 766-773.

6- Metcalf D. Hematopoietic regulators. Redundancy or subtlety? Blood, 1993, 82:3515-3523.

7- Advani SH., Nair R., Bapna A., Gladstone B., Kadam P., Saikia TK., et al. Acute promyelocytic leukaemia, All trans retionic acid with chemotherapy is superior to ATRA alone, Am J Hematol, 1999, 60(2): 87-93.

8- Hozumi M. Fundamentals of chemo-differentiation therapy of myeloid leukaemia, Anti Cancer Res, 1994, 14(34): 1175-1192.

9- Ishida J., Wang HK., Bastow KF., Huc Q., Lee KH. Anti tumor agents(201) cytotoxicity of Harmine and B-Carboline analogs. Bioorg Med Chem Lett, 1999 9(23): 3319-3324.

10- Al-Allaf TA., Khuzaie RF., Rashan LJ., Halaseh WF. Cytotoxic activity of a series of tumor cell lines with various tumor ligands, Boll Chim Farm, 1999, 138(6): 267-271.

11- Peck R., Bollag W. Potentiation of retinoid-induced differentiation of HL60 and U937 cell lines by cytokins, Eur J Cancer, 1991, 27(1): 53-57.

12- Bollage W., Holdener E. Retinoids in cancer prevention of therapy, Ann Oncol,1992,3(7):513-526.

13- Olsson I., Bergh G., Ehinger M., Gullberg U. Cell differentiation in AML, Eur J Hematol, 1996, 57(1): 1-16.

14- Wang ZG., Rivi R., Delav L., Konig A., Scheinberg DA. Arsenic trioxide induce cell death in myeloid leukaemia, Blood, 1998, 92(5): 1497-1504.

15- Niu C., Yan H., Yu T., Sun HP., Liu JX., Li XS., et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukaemia with arsenic trioxide, Blood, 1999, 94(0): 3315-3324.

16- Lamchouri F., Settaf A., Cherrah Y., Semzami M., Lyoussi B., Zaid A., Anti tumor principle from peganum Harmala seeds, Therapie, 1999, 54(6): 753-758.

17- Boeira JM., Dasilva J., Erdtmann B., Henriques JA. Genotoxic effect of alkaloid Harmane and Harmine asses by commet assay in mammalian cell in vitro, Pharmacol Toxicol, 2001, 89(6): 287-294.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

ANTI TUMORAL AND DIFFERENTIATION EFFECTS OF ALKALOIDS OF HARMINE AND HARMALINE ON LEUKAEMIC CELLS TREATED WITH ATRA AND G-CSF

F. Zaker, PhD [I]

ABSTRACT

In acute leukaemia, the maturation of the malignant cells is arrested and the cells merely proliferate. In the recent years, beside chemotherapy combination of differential factors cytokins and cytotoxic agents have been used in treatment of acute leukaemia particularly acute promyelocytic leukaemia. The present study was an evaluation of proliferation, cytotoxicity and differentiation of Harmine and Harmaline as alkaloid derivates of Peganum Harmala on HL60 cells individually or in combination with ATRA and G-CSF. The data showed that these agents caused cessation of proliferation in dose and time dependent manner. Optimal concentration of anti proliferative effect was 0.4, 0.8 and 1.6μg/mL for Harmine and 6-10 μg/mL for Harmaline. However, both agents in concentration of over 6.4 and 10 μg/mL for Harmine and Harmaline were cytotoxic respectively. Combination of ATRA(10^{-7} M) and G-CSF(100 ng/mL) with each optimal concentration of agents extensively reduced proliferation compared with ATRA and G-CSF. Cells, induced with optimal concentration of these agents, showed some morphological changes and NBT positivity; however, it was in lesser extent compared to ARTA and G-CSF. Most overt sign of myeloid differentiation was observed using 10 μg/mL Harmaline. Fluorescent analysis showed an increase in CD11b and CD14 using Harmaline. Combination of ATRA and G-CSF with each agent caused differentiation similar to ARTA and G-CSF. These preliminary data showed that either Harmine or Harmaline in optimal and non toxic dose caused cessation in proliferation and some degree of differentiation using Harmaline. These results have opened a new window in the leukaemic in vitro investigation.

Key Words: 1) Acute promyelocytic leukaemia 2) Cytotoxicity 3) Differentiation

4) Harmine 5) Harmaline

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

This study has been conducted under financial support of undersecretary of research of Iran University of Medical Sciences and Health Services, (No.402)

I) *Assistant Professor of Haematology, School of Paramedicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*