

مقایسه اثر وینکریستین بر لنفوسیت‌های طبیعی در حال تکثیر موش و رده سرطانی BCL1

نویسندگان: محدثه شاه‌حسینی^۱، سوسن کبودانیان اردستانی^۲ و رویا یارائی^{۳*}
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد - گروه ایمنونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. دانشیار - گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. دانشیار - گروه ایمنونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: ryaraee@yahoo.com

* نویسنده مسئول: رویا یارائی

چکیده

مقدمه و هدف: تکثیر و آپوپتوز جزو لاینفک عملکرد لنفوسیت‌ها در سیستم ایمنی است و؛ بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی ضدسرطان مانند وینکریستین سیکل سلولی را هدف‌گیری کرده، القاکننده آپوپتوز در سلول‌های سرطانی هستند و به عبارتی، سلول‌هایی که بیشتر تقسیم می‌شوند، مرگ سلولی بیشتری را نیز متحمل می‌شوند که ممکن است شامل حال لنفوسیت‌های نرمال در حال تکثیر و پاسخگو به بدخیمی‌ها نیز بشود؛ لذا هدف این مطالعه، بررسی مقایسه آثار سایتوتوکسیک داروی ضدسرطانی وینکریستین بر لنفوسیت‌های طبیعی در حال استراحت و در حال تکثیر در مقایسه با اثر آن بر سلول سرطانی است.

مواد و روش‌ها: رده سلولی سرطانی BCL1 کشت‌داده شد و سلول‌های طبیعی از طحال موش تهیه شده، کشت‌داده شدند و با استفاده از میتوزن به تکثیر وادار شدند. اثر داروی وینکریستین در غلظت‌های مختلف بر این سلول‌ها لنفوسیت‌های نرمال و در حال تکثیر طحال موش و مقایسه اثر همین دارو بر رده لنفوم BCL1 در سه زمان بررسی شد. درصد سایتوتوکسیسیته دارو توسط تست MTT اندازه‌گیری و IC50 زمانهای مختلف محاسبه شد. درصد سلول‌های آپوپتوتیک به روش رنگ‌آمیزی دوگانه اتیدیم برمایید و آکریدین اورنج و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس به‌دست‌آمد.

نتایج: نتایج MTT نشان‌داد که غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر وینکریستین اثر سایتوتوکسیک قابل‌توجهی بر رده سلولی BCL1 دارد و غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز با گذشت زمان اثر سایتوتوکسیک خود را نشان می‌دهد. در لنفوسیت‌های نرمال و در حال تکثیر، غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو باعث مرگومیر سلولی می‌شوند؛ ولی غلظت‌های کمتر از ۵ اثر سایتوتوکسیک چندانی بر سلول‌های در حال استراحت ندارند درحالی‌که غلظت‌های کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های در حال تکثیر بعد از تیمار ۷۲ ساعت اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری نشان‌دادند. درصد سلول‌های آپوپتوتیک متأثر از غلظت‌های مختلف دارو مشاهده شده با میکروسکوپ فلورسانس با درصد سایتوتوکسیسیته به‌دست‌آمده همان غلظت‌های دارو در تست MTT متناسب بود.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد بیشترین اثر توکسیک این دارو بر سلول‌های سرطانی است و در سلول‌های طبیعی به‌شدت به زمان و فعالیت سلولی، وابسته است.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، تکثیر سلولی، BCL1 (رده سرطانی لنفوم)، وینکریستین، لنفوسیت‌های طحال موش

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم - شماره ۹۹
تیر ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۲/۶

آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۴/۱۳

پذیرش: ۹۱/۴/۲۰

مقدمه

دراصل از طریق تداخل با عملکرد طبیعی میکروتوبول‌ها و توقف پیشرفت چرخه سلولی میان فاز G2-M اثر می‌کنند. با توجه به مکانیسم اثر وینکریستین، این دارو به‌عنوان یک داروی اثرگذار بر مرحله میتوز سلول‌های در حال تکثیر، با هدف بررسی اثرهای احتمالی آن بر سلول‌های طبیعی در حال استراحت و طبیعی در حال تکثیر انتخاب و با تأثیرهای این دارو بر رده سلولی سرطانی از نظر میزان مرگ‌ومیر سلولی و وقوع آپوپتوز مقایسه شد. هدف این مطالعه، بررسی اثر وینکریستین به‌طور خاص نیست بلکه تأکید مطالعه بر اثر داروهای هدف‌گیرنده تقسیم سلولی است. از عوارض دارو اثر توکسیک بر لنفوسیت‌هاست ولی اثر آن بر لنفوسیت در حال تکثیر که سلول پاسخگو در سیستم ایمنی است نامعلوم باقی مانده است.

مواد و روش‌ها

داروی وینکریستین (ساخت شرکت ریختر آلمان) تهیه شد و با استفاده از محیط کشت RPMI1640 غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دارو فراهم شدند.

جداسازی سلول‌های طحال

سلول‌های طحال موش BALB/c به‌عنوان منبع سلول‌های طبیعی انتخاب شدند. برای به‌دست آوردن سلول در حال تکثیر به گروهی از سلول‌های طحال موش محرک کانکاوآلین A (ConA) افزوده شد. بعد از کشتن موش با اتیل اتر با استفاده از قیچی و پنس استریل و در شرایط استریل، طحال موش جدا شد و به داخل یک پتری دیش استریل محتوی محیط RPMI 1640 (Gibco) منتقل شد. با فشردن طحال با استفاده از پنس استریل سلول‌های طحال به‌صورت سوسپانسیون در محیط کشت رها شد. سلول‌های جدا شده به لوله فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل شده، سانتریفیوژ سلول‌ها در دمای ۱۳ درجه سانتیگراد و ۱۵۰۰ دور در دقیقه (500 × g) به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و به سلول‌های سانتریفیوژ شده بافر لیزکننده گلبول‌های قرمز افزوده شد. بافر لیزکننده از

سلول‌ها با میتوز متولد می‌شوند و حیاتشان با آپوپتوز به پایان می‌رسد؛ هر دو، فرایندهای فعال و فیزیولوژیک هستند. وقتی توازن میان میتوز و آپوپتوز مختل شود، یکی از پیامدها، سرطان است. به‌وسیله آپوپتوز، سلول‌های ناخواسته و غیرمفید طی رشد و فرایندهای بیولوژیک طبیعی دیگر ریشه‌کن می‌شوند (۱) ویژگی سلول‌های سرطانی، تقسیم بی‌رویه و غیرقابل کنترل است. سلول‌های طبیعی، هنگام تماس با سلول مجاور، تقسیم را متوقف می‌کنند که «مکانیسم مهار تماسی» شناخته می‌شود. فرایند تقسیم سلولی چه در سلول‌های طبیعی چه در سلول‌های سرطانی از طریق سیکل سلولی انجام می‌شود (۲). توانایی شیمی‌درمانی برای کشتن سلول‌های سرطانی وابسته به توانایی‌اش برای متوقف کردن تقسیم سلولی است. بیشتر داروها با آسیب‌رسانی به RNA و DNA این کار را انجام می‌دهند؛ بنابراین سلول‌هایی که سریع‌تر در حال تقسیم هستند بسیار محتمل‌تر است که بر اثر شیمی‌درمانی کشته شوند؛ این داروها همچنین آپوپتوز را القای می‌کنند (۳).

بررسی جنبه‌های مختلف تکثیر سلولی زمانی، بیشتر مهم می‌شود که به نقش این پدیده در لنفوسیت‌ها، بازوی اساسی در سیستم ایمنی توجه کنیم. تکثیر و مرگ سلولی، دو فرایند مهم در روند پاسخ سلول‌های سیستم ایمنی نیز هستند. لنفوسیت‌ها طی پاسخ‌دهی ایمنی تحت روند تقسیم میتوزی قرار می‌گیرند که به اصطلاح «گسترش کلونال»^۱ نامیده می‌شود. بعد از فروکش کردن پاسخ‌های ایمنی، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابد و هموستاز برقرار می‌شود (۴).

وینکریستین، دارویی ضدسرطانی است که برای سیکل سلول ویژگی دارد (۵). وینکریستین دارویی از خانواده وینکالکالوئیدهاست که در ترکیب با دیگر عوامل در درمان لنفوم و لوکمی استفاده می‌شود. وینکالکالوئیدها عوامل ضد میکروتوبولی هستند که

1. Clonal expansion

FBS RPMI1640 (Gibco) دارای ۱۰ درصد سرم FBS (Gibco) کشت داده شد. برای انجام تست، سلول‌ها از فلاسک کشت جدا شده، بعد از شمارش (همراه با تریپان بلو) تعداد 2×10^4 سلول به هر چاهک پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و بعد از یک شب انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تعویض محیط مراحل افزودن غلظت‌های مختلف دارو (۵، ۲، ۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و سایر مواد مشابه موارد پیشین انجام شد.

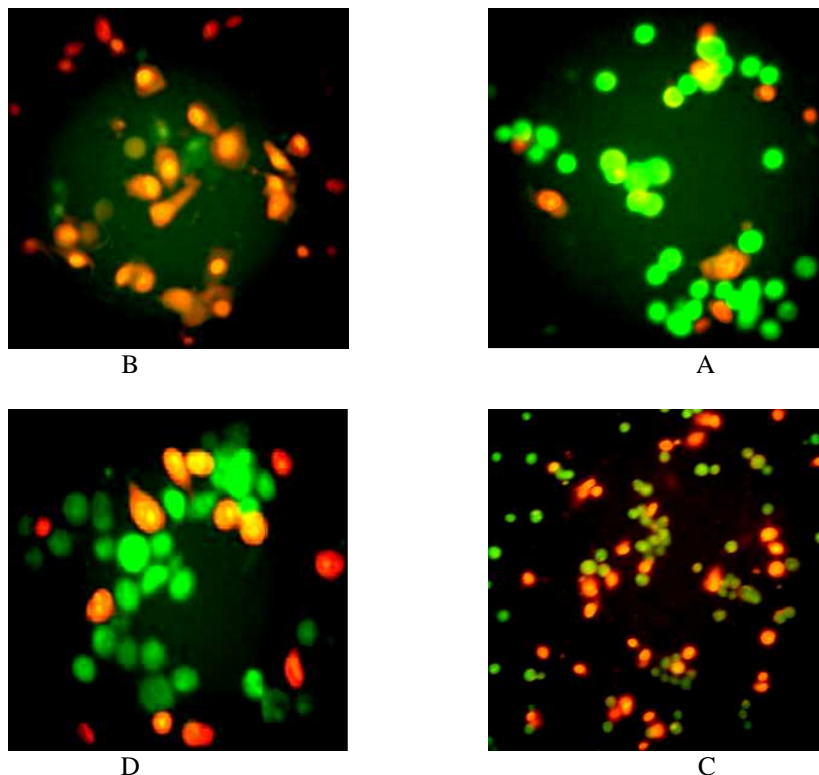
تست MTT و محاسبه درصد توکسیسیته بعد از گذشت زمان تیمار دارویی (۲۴، ۴۸ یا ۷۲ ساعت) پلیت را از انکوباتور خارج کرده، زیر هود در شرایط استریل به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (غلظت ۵ درصد در نرمال سالین) افزوده شد و دوباره داخل انکوباتور به مدت ۴ ساعت قرار گرفت (۱). پلیت توزین شده، پلیت دیگری برای موازنه در ساترئیفیوژ تهیه شد. ساترئیفیوژ در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. بعد از ساترئیفیوژ محیط داخل چاهک‌ها به دقت تخلیه شد به طوری که کریستال‌های بنفش‌رنگ در چاهک باقی بمانند. به چاهک‌ها ایزوپروپانول اسیدی (0.04N اسید کلریدریک) اضافه شد تا کریستال‌ها حل شوند؛ در نهایت، جذب نور در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه الایزا - ریدر خوانده شد. میزان جذب متناسب با فعالیت حیاتی است و با در نظر گرفتن میانگین جذب گروه کنترل (فاقد دارو) به عنوان ۱۰۰، درصد توکسیسیته محاسبه شد.

تریس ۰/۲۰۶٪ (وزنی - حجمی در آب مقطر) و کلرید آمونیوم ۰/۸۳ درصد به نسبت ۱ به ۱۰ (حجمی) ساخته شده بود. سلول‌های طحال به مدت ۲ دقیقه در معرض بافر لیزکننده قرار گرفتند تا گلبول‌های قرمز لیز شوند. برای جلوگیری از لیز سایر سلول‌ها که اغلب، لنفوسیت هستند بلافاصله به لوله سرم جنین گاوی (FBS^۱) افزوده شد. ساترئیفیوژ برای حذف گلبول‌های قرمز لیز شده در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰۰ دور در دقیقه (معادل) به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. دو مرحله شستشو با محیط RPMI و متعاقب آن ساترئیفیوژ نیز روی سلول‌ها انجام شد. به سلول‌های باقی‌مانده محیط کشت با ۱۰ درصد FBS افزوده شد. برای بررسی درصد سلول‌های جدا شده زنده از طحال از رنگ‌آمیزی سلول با تریپان بلو و مشاهده با میکروسکوپ نوری استفاده شد و شمارش سلولی با لام نتوبار زیر میکروسکوپ نوری انجام گرفت و در آزمایش‌های مکرر، درصد سلول‌های زنده همیشه بالای ۹۸ درصد بود.

کشت سلول‌ها و اثر دادن دارو

از پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای به منظور کشت سلول‌ها استفاده شد. برای به دست آوردن سلول در حال تکثیر به گروهی از سلول‌های طحال موش محرک کانکوالین (A) ConA افزوده شد. درباره سلول‌های طحال گروه‌های مختلف شامل گروه کنترل، کنترل با محرک کانکوالین (A) ConA به غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، گروه‌های دارو (غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در نهایت، گروه‌های دارو همراه با محرک کانکوالین (A) ConA بود. در هر چاهک، تعداد 2×10^5 سلول و برای هر غلظت دارو یا کنترل، ۵ چاهک کشت داده شد. برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سه پلیت جدا داخل انکوباتور با ۵ درصد CO₂ قرار داده شد.

رده سلولی BCL1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (کد C551) خریداری و در محیط کشت



تصویر ۱. رده سلولی BCL1 متأثر از غلظت‌های مختلف داروی وینکریستین در زمان ۸ ساعت. سلول‌ها با ET/AO رنگ آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند.

خانه‌ای کشت داده شدند. بعد از طی ۴۸ ساعت سلول‌ها با PBS^۱ شستشوداده شدند و با ترکیب رنگ اتیدیوم برماید/آکریدین اورنج رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسانس OLYMPUS مدل BX51 مشاهده شدند و به منظور تعیین نسیبی تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و زنده شمارش انجام شد. آکریدین اورنج هم به سلول‌های مرده و هم به سلول‌های زنده نفوذ می‌کند و فلورسانس سبز رنگ انتشار می‌دهد که نتیجه داخل شدن (ایترکاله) این رنگ در DNA دو رشته است بنابراین با این رنگ به تنهایی نمی‌توان سلول زنده را از غیرزنده تشخیص داد (۶). اتیدیوم برماید بعد از اتصال به DNA سلول‌هایی که تغییرهای غشایی را متحمل شده‌اند (سلول‌های آپوپتوتیک)، فلورسانس قرمز منتشر می‌کند (۷). با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه ET/AO^۲ می‌توان

گروه کنترل رده سلولی BCL1 بدون افزودن دارو با بزرگنمایی ۴۰x سلول‌های زنده با فلورسانس سبز به طور غالب در این گروه مشاهده می‌شود. B- گروه متأثر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۴۰x سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز در این گروه به طور غالب دیده می‌شود. C- گروه سلولی متأثر از غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۲۰x همان‌طور که مشاهده می‌شود، تعداد سلول‌های زنده با فلورسانس سبز تاحدی بیشتر از سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز است؛ ولی به طور کامل، غالب نیست. D- گروه سلولی متأثر از غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۴۰x سلول‌های زنده با فلورسانس سبز جمعیت غالب این گروه است. مشاهده میکروسکوپی آپوپتوز سلول‌های گروه‌های منتخب از غلظت‌های دارو و گروه کنترل (با و بدون محرک) در پلیت کشت شش

1. Phosphate buffered saline
2. Ethidium bromide / Acridine orange

میلی‌لیتر دارو بعد از تیمار ۴۸ ساعت اثر سایتوتوکسیک داشت و غلظت‌های ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر، اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری نشان‌ندادند. مقایسه هم‌زمان اثر دارو به شکل درصد در مقایسه با کنترل در سه زمان مذکور در نمودار ID قابل مشاهده است.

تأثیر وینکریستین بر فعالیت حیاتی سلول‌های طحال در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از جذب نور چاهک‌های با غلظت مختلف دارو، نمودار درصد فعالیت حیاتی سلول‌های نرمال طحال در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین رسم شد (نمودار ۲). همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث مرگ‌ومیر معنی‌دار سلول‌های نرمال (در حال استراحت) طحال شدند. غلظت‌های کمتر از ۱۰ اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری را در ۲۴ ساعت نشان‌ندادند اما با گذشت زمان بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت اثرگذاری دارو بر سلول‌های در حال استراحت مشاهده شد و نشان‌داد که دارو بر سلول‌های در حال استراحت طحال، اثر سایتوتوکسیک وابسته به غلظت و زمان دارد.

تأثیر وینکریستین بر فعالیت حیاتی سلول‌های در حال تکثیر طحال در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درصد فعالیت حیاتی سلول‌های در حال تکثیر طحال در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین نشان‌داد همه غلظت‌های مورد آزمایش، اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری بر این سلول‌ها دارند. اثر سایتوتوکسیک وابسته به غلظت در سلول‌های در حال تکثیر مشاهده شد به این صورت که غلظت‌های بالاتر مرگ‌ومیر بیشتری را باعث شدند (نمودار ۳).

مقایسه درصد حیاتی سه گروه سلولی (طحال در حال استراحت، طحال در حال تکثیر و رده سلولی BCL1) در نمودار ۴ نشان‌دادند که داروی وینکریستین در غلظت‌های یکسان به ترتیب بر رده سلولی، طحال در حال تکثیر و در حال استراحت، بیشترین اثر سایتوتوکسیک را داشت.

افتراق میان سلول‌های زنده و آپوپتوز شده را زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده کرد؛ بعد از شمارش و محاسبه درصد، عکس‌ها نیز به صورت تصادفی از بخش‌های مختلف پلیت گرفته شد.

محاسبات آماری

درصد سایتوتوکسیسیته براساس جذب نور به روش T-test و ANOVA تفسیر شد. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام گرفت و $p < 0.05$ برای معنی‌دار بودن از نظر آماری در نظر گرفته شد.

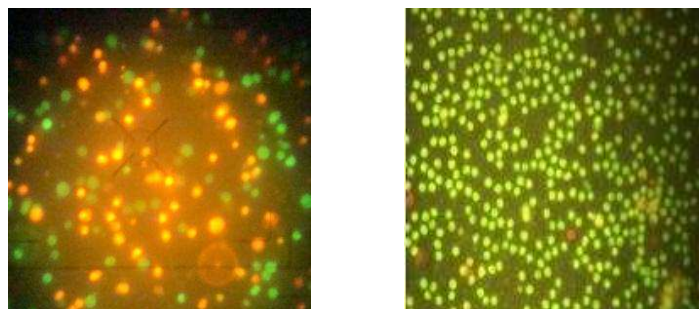
یافته‌ها

بررسی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در هر گروه، تعداد ۲۰۰ سلول از سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با ET/AO به طور تصادفی، زیر میکروسکوپ فلورسانس شمارش شدند و درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های سلولی متأثر از دارو بعد از گذشت ۴۸ ساعت به دست آمد و مشخص شد که میزان آن با افزایش غلظت دارو به شدت افزایش می‌یابد؛ بدین صورت که این مقادیر در سلول‌های گروه کنترل رده سلولی (بدون دارو) ۴ درصد و در رده سلولی متأثر از غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱۸.۵، ۲۴، ۵۱ و ۵۲ درصد بود (جدول ۱).

از پلیت‌های حاوی سلول‌ها در شرایط مختلف (از جمله کنترل و دارو) عکس‌هایی نیز به طور تصادفی گرفته شدند (تصاویر ۱-۳). همان‌طور که دیده می‌شود نسبت سلول‌های در وضعیت آپوپتوتیک در حضور غلظت‌های بالاتر دارو روبه افزایش است.

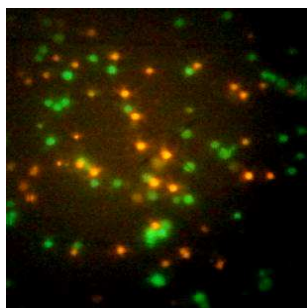
تأثیر وینکریستین بر فعالیت حیاتی سلول‌های BCL1 در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت:

با استفاده از جذب نوری چاهک‌های با غلظت مختلف دارو، نمودار درصد فعالیت حیاتی سلول‌ها رسم شد (نمودار ۱). همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو در هر سه زمان اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری بر سلول‌های رده BCL1 نشان‌داد؛ در حالی که غلظت ۲ میکروگرم بر

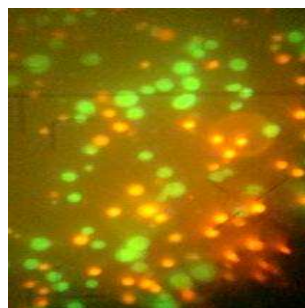


B

A

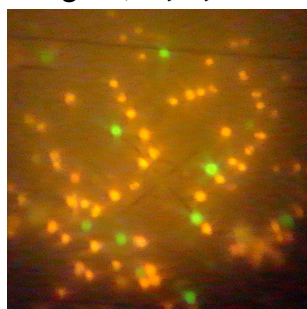


D

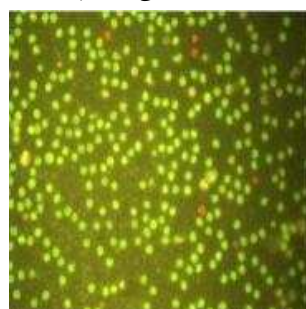


C

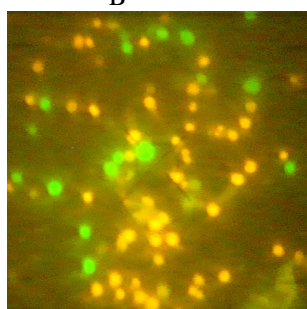
تصویر ۲. سلول‌های طحال طبیعی متأثر از غلظت‌های مختلف داروی وینکریستین در زمان ۴۸ ساعت.



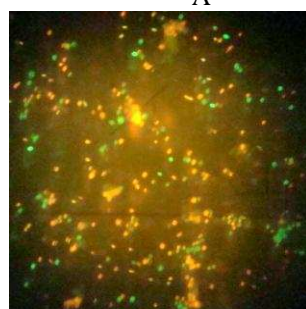
B



A



D



C

تصویر ۳. سلول‌های طحال در حال تکثیر متأثر از غلظت‌های مختلف داروی وینکریستین در زمان ۴۸ ساعت. سلول‌ها با ET/AO رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند.

A- گروه کنترل بدون افزودن دارو با بزرگنمایی 40x.

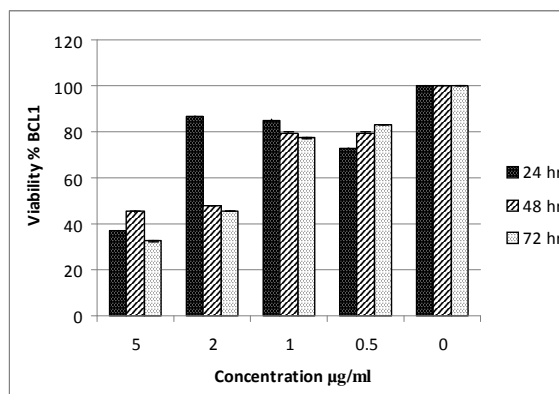
B- گروه متأثر از غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی 40x. سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس قرمز در این گروه به‌طور غالب دیده می‌شود. C - گروه سلولی متأثر از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی 20x. D - گروه سلولی متأثر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی 40x.

قرمز در این گروه به طور غالب دیده می‌شود. C - گروه سلولی متأثر از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۴۰x. همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد سلول‌های زنده با فلورسانس سبز نسبت به سلول‌های با فلورسانس قرمز بیشتر است. D - گروه سلولی متأثر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۴۰x.

سلول‌ها با ET/AO رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. A - گروه کنترل بدون افزودن دارو با بزرگنمایی ۴۰x. سلول‌های زنده با فلورسانس سبز به طور غالب در این گروه مشاهده می‌شود. B - گروه متأثر از غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو با بزرگنمایی ۴۰x. سلول‌های آپوپتوتیک با فلورسانس

جدول ۱. درصد سلول‌های آپوپتوتیک در مشاهده میکروسکوپی

غلظت دارو (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد سلول شمارش شده رده سلولی	درصد سلول‌های آپوپتوتیک
۰	200	۴%
0.5	200	۱۸.۵%
1	200	۲۴%
2	200	۵۱%
5	200	۵۲%



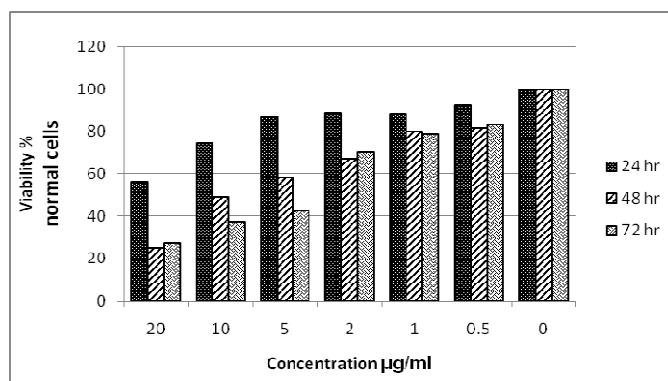
نمودار ۱. درصد فعالیت حیاتی سلول‌های رده BCL1 در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین در تست MTT. سلول‌ها به تعداد 2×10^4 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و در معرض دارو با غلظت‌های مختلف (محور افقی نمودار) قرار گرفتند و تست MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد و درصد توکسیسیته در بقیه گروه‌ها با آن مقایسه شد (محور عمودی)، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

سلول‌های سرطانی، بیشترین آسیب‌پذیری را نسبت به دارو دارند ولی درباره سلول‌های طبیعی، میزان IC50 به شدت، وابسته به زمان است. برای مشاهده ۵۰ درصد آسیب سلولی ظرف ۲۴ ساعت، در سلول‌های در حال استراحت به بیش از ۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو نیاز داریم در حالی که غلظت حدود ۹/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند همین میزان آسیب را ظرف ۷۲ ساعت ایجاد کند؛ سلول‌های در حال تکثیر نیز بیشترین آسیب‌پذیری خود را در ۷۲ ساعت نشان می‌دهند.

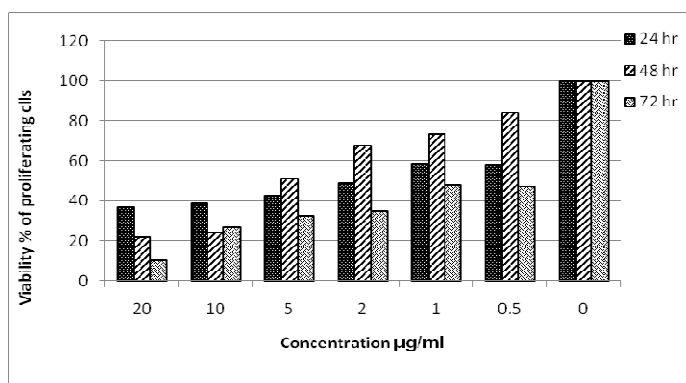
محاسبه IC50^۱

پس از تبدیل جذب به دست‌آمده در دستگاه الیزا- ریدر از تست MTT به درصد سایتوتوکسیسته، غلظتی از دارو که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مرگ‌ومیر سلول‌ها شود محاسبه می‌شود (۸). در جدول ۲ نتایج مربوط به IC50 دیده می‌شود یعنی غلظتی که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مرگ‌ومیر شود و براساس تست MTT در هر سه زمان محاسبه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود

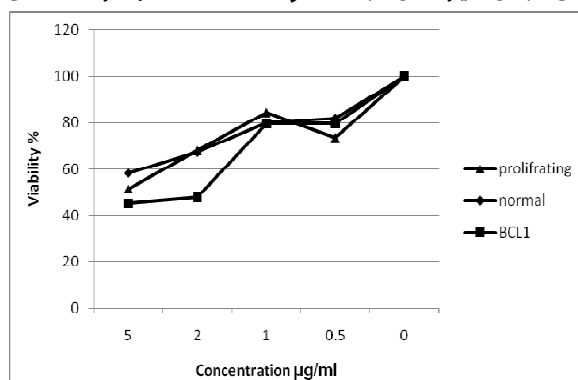
1. half maximal inhibitory concentration



نمودار ۲. درصد فعالیت حیاتی سلول‌های نرمال طحال در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین در تست MTT. سلول‌ها به تعداد 2×10^5 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و در معرض دارو با غلظت‌های مختلف (محور افقی نمودار) قرار گرفتند و تست MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد و درصد توکسیسیته در بقیه گروه‌ها با آن مقایسه شد (محور عمودی)، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۳. درصد فعالیت حیاتی سلول‌های در حال تکثیر طحال در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت متعاقب اثر غلظت‌های مختلف وینکریستین در تست MTT.



نمودار ۴. مقایسه درصد فعالیت حیاتی سه گروه سلولی؛ طحال در حال استراحت، طحال در حال تکثیر و رده سلولی BCL1 در ۴۸ ساعت نشان می‌دهد داروی وینکریستین در غلظت‌های یکسان به ترتیب بر رده سلولی، طحال در حال تکثیر و در حال استراحت، بیشترین اثر سائتوتوکسیک را داشت.

جدول ۲. IC_{50} داروی وینکریستین بر رده سلولی BCL1، سلول‌های نرمال و در حال تکثیر طحال بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

Treatment time	Resting normal cells	Proliferating normal cells	Cancerous cell line (BCL1)
24 hr	23.15	8.18	4.19
48 hr	10.59	8.48	3.76
72 hr	9.52	2.94	3.12

مطالعه‌ای مبنی بر اثر این داروی شیمی‌درمانی بر سلول‌های در حال تکثیر طبیعی انجام نشده بود. در مطالعه حاضر با توجه به IC_{50} به دست آمده برای سلول‌های طحال می‌توان نتیجه گرفت اثر داروی وینکریستین بر سلول‌های نرمال و سلول‌های در حال استراحت طحال وابسته به زمان و غلظت است. با گذشت زمان، یعنی پس از ۷۲ ساعت بالاترین اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های نرمال و به خصوص در حال تکثیر طحال را می‌توان مشاهده کرد و همین‌طور غلظت‌های بالاتر دارو مانند ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سایتوتوکسیک بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر دارو دارند. با توجه به IC_{50} به دست آمده برای رده سلولی نیز اثر وابسته به زمان و غلظت دارو را می‌توان مشاهده کرد اما این غلظت‌های سایتوتوکسیک مشابه اثرگذار بر رده سلولی نسبت به سلول‌های طحال پایین‌تر مثلاً ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. مقایسه IC_{50} رده سلولی با سلول‌های در حال تکثیر پس از تیمار ۷۲ ساعته نشان می‌دهد که سلول‌های در حال تکثیر آسیب‌پذیرتر از رده سلولی هستند؛ در واقع با افزایش زمان تریتمنت لنفوسیت‌های در حال تکثیر بیشتر متحمل مرگ سلولی می‌شوند.

امروزه داروهای شیمی‌درمانی ضد لنفوم، مانند وینکریستین استفاده‌ای گسترده دارند؛ مهم‌ترین عملکرد این داروها القای آپوپتوز است، این دارو، اختصاصی سیکل سلولی است که به توپولین‌ها متصل شده، باعث دیلمیریزاسیون میکروتوبول‌ها می‌شود؛ همچنین وینکریستین از پلیمریزاسیون زیرواحدهای توپولین به میکروتوبول‌ها نیز جلوگیری می‌کند از آنجا که میکروتوبول‌ها در تشکیل دوک میتوزی دخالت دارند به نظر می‌رسد مداخله این عامل با دینامیک و پویایی میکروتوبول‌ها، تقسیم سلولی را مختل کرده، چرخه سلولی را متوقف می‌کند و القاکننده آپوپتوز است (۶)؛ از طرفی، لنفوسیت‌ها بازوی اجرایی سیستم ایمنی هستند و تکثیر، جزو لاینفک پاسخ ایمنی است (۴). با توجه به مکانیسم عمل وینکریستین که چرخه سلولی را

سلول‌ها به تعداد 2×10^6 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و در معرض دارو با غلظت‌های مختلف (محور افقی نمودار) قرار گرفتند و تست MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد و درصد توکسیسیته در بقیه گروه‌ها با آن مقایسه شد (محور عمودی)، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه اوزالپ^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اثر وینکریستین بر بافت تومور TVT و میزان آپوپتوز القا شده بررسی شد و نتایج نشان دادند که به کارگیری زمان بندی شده وینکریستین علاوه بر القای آپوپتوز، از تکثیر سلول‌های تومور نیز جلوگیری می‌کرد (۶) (A)؛ در مطالعات دیگر نیز اثر وینکریستین بر رده‌های مختلف سرطانی مثل A549، Hella و SKOV3 به تنهایی یا همراه با ترکیب‌های دیگر به منظور تعیین میزان آپوپتوز القا شده بررسی شد که همگی که اثر سایتوتوکسیک وابسته به زمان وینکریستین را نشان دادند (۹).

در سال ۱۹۹۹ Nefić و Ibrulj روی آثار ژنوتوکسیک وینکریستین بر لنفوسیت‌های خون محیطی به صورت *in vitro* مطالعه کردند. آنها لنفوسیت‌های خون محیطی را جدا کرده، این سلول‌ها را در معرض غلظت‌های مختلف وینکریستین در شرایط *in vitro* قرار دادند و ثابت کردند وقتی لنفوسیت‌های خون محیطی در معرض غلظت‌های کمتر (۰/۰۵ تا ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند فعالیت میتوزی‌شان تحریک شد؛ در حالی که قرارگیری در معرض غلظت‌های بالاتر (غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تکثیر لنفوسیت‌ها را به طور معنی‌دار کاهش داد؛ همچنین غلظت‌های بالا باعث پیدایش آنافاز نامنظم و توزیع کروموزومی به شکل نامنظم در سلول‌های مذکور شد (۱۰)؛ اما تاکنون

منابع

1. Kova E. Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. comparison of Viscum album QuFrF extract with Vincristine in an in vitro model. *The Scientific World Journal* . 2010 ; 10 : 311-320
2. Tait S.W.G, Green D.R . Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond . *Nature Reviews*. 2010 ; 11 : 621-632
3. Magalska A, Sliwinska M, Szczepanowska J, Salvioi S, Franceschi C, Sikora E . Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe . *Int. J. Cancer* . 2006 ;119: 1811-1818.
4. Abbas A.K, Lichman A, Pilla S . Cells and tissues of the adaptive immune system . In : *Cellular and molecular immunology* . Elsevier. 2007 ; 52
5. Krishna R, Webb M, Onge G, Mayer L . Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties . *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* . 2001; 298 :1206-1212
6. Gursel O, Sari E, Altun D, Atay AA, Akin R . Vincristine induced unilateral ptosis in a child. *Pediatr Neurol*. 2009;41:461-463
7. Yaraee R, Ghazanfari T, Eghtedardoost M, Rajabi M, Naseri M . The effect of MS14 on innate and cellular immune responses in BALB/c mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2011; 33(3): 509-514
8. Babykutty S, Padikkala J, Sathiadevan P, Vijayakurup V, Abdul Aziz T, Srinivas P, Gopala S . Apoptosis induction of centella asiatica on human breast cancer cells .Babykutty et al., *Afr. J. Trad. CAM*. 2009; 6 (1): 9 - 16
9. Bian Y, Yang H, Yang Z, Gao F, Zhang N, Xiao C. Amlodipine treatment prevents angiotensin II-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis. *Archives of medical research* . 2011;42:22-27
10. Kosmider B, Zynerb E, Osiecka R, Ochocki J . Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research* . 2004 ; 583 : 61-70
11. Lewis L. N. Chemical catalysis by colloids and clusters. *Chem. Rev*. 1993 Dec; 93 (8): 2693-2730
12. Ozalp G, Zik B, Bastan A, Peker S, Ozdemir-Salcı E, Bastan I, Darbaz I, Salar S, Karakas K. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). *Biotechnic and histochemistry* 2012; in press:1-6
12. Ying-jia Zhong, et al. Crocetin induces cytotoxicity and enhances vincristine-induced cancer cell death via p53-dependent and -independent mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica* 2011; 32: 1529-1536
14. Nefić H, Ibrulj S . Genotoxic effect of the antitumor agent vincristine sulfate on human peripheral blood lymphocytes in vitro . *Medicinski arhiv* . 1999;53(4):185-8

هدف می‌گیرد و سلول‌هایی بیشتر هدف قرار می‌گیرند که بیشتر تقسیم می‌شوند، بررسی‌های بیشتر در خصوص اثر توکسیک این گروه از داروها بر سلول‌های فعال در حال تکثیر، مانند لنفوسیت‌های در حال تکثیر ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعات می‌توانند از طرفی در جهت روشن شدن تفاوت‌های میان سلول در حال تکثیر طبیعی و سلول در حال تکثیر سرطانی مفید باشند و از طرف دیگر، برخی عوارض احتمالی و ناشناخته این داروها بر سلول‌های فعال و در حال پاسخ در سیستم ایمنی را روشن سازند.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.99
June, July
2012*

Received: 25/4/2012

Last revised: 3/7/2012

Accepted: 10/7/2012

Comparing the effect of vincristine on proliferating normal lymphocytes and BCL1 cell line

Mohaddese Shahhosseini¹, Sussan Kabudanian Ardestani², Roya Yaraee^{3*}

1- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

2- Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran

3- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

E-mail: ryaraee@yahoo.com

Asbtract

Background and Objective: Proliferation and apoptosis of lymphocytes are essential parts of the immune system. Most anti-cancer chemotherapy drugs such as vincristine target cell cycle and induce apoptosis in cancer cells .In other words, dividing cells undergo more apoptosis, which may also include the normal proliferating lymphocytes responsive to malignancies as well.

Materials and Methods: In this study, the effect of different concentration of vincristine at three different time periods on resting and proliferating spleen lymphocytes were evaluated and compared with the effect of the drug on mouse lymphoma cell line BCL1. The cytotoxicity of vincristine was determined by MTT assay and IC50 was calculated for all periods. The cells were also stained with double staining acridine orange and ethidium bromide and were observed with fluorescence microscope and the percentage of apoptotic cells were determined.

Results: MTT results showed that vincristine at concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ caused cell death in both resting and proliferating lymphocytes, but concentrations <5 $\mu\text{g/ml}$ did not show any significant cytotoxic effect, while concentrations of 2 and 5 $\mu\text{g/ml}$ showed significant cytotoxic effect on BCL1 cells. The percentage of the apoptotic cells which were affected by different concentrations of the drug was proportional in the two methods, i.e. fluorescence microscope and MTT assay.

Conclusion: Vincristine has a strong cytotoxic effect in tumor cells and its toxic effect in normal cells is highly dependent on time and the activation of the cells.

Key words: Apoptosis, Proliferation, BCL1 (lymphoma cell line), Vincristine, Spleen