Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم-شماره ۱۲۶
دی ۱۳۹۵

تأثیر فراوردهٔ گیاهی SIM5 بر سلول‌های مونونوکلئر جداشده از مغز استخوان بیماران مالتیپل‌میلوما

نویسندگان: رؤیا یارائی[1*]، محمدرضا جلالی‌ندوشن[2]، جلال‌الدین شمس[3]، شقایق تاجیک[4]

۱. دانشیار ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. استاد پاتولوژی، گروه علوم تشریح، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. استادیار خون و انکولوژی، بیمارستان مصطفی خمینی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: رؤیا یارائی
E-mail: ryaraee@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۹/۱۷
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۴

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان‌ها از مشکلات مهم جوامع هستند. در سال‌های اخیر فراورده‌های گیاهی برای یافتن اثرات ضدسرطانی و ایمونومدولاتوری مورد توجه قرار گرفته‌اند. SIM5 یک فراوردهٔ گیاهی است که اثرات افتراقی قابل‌توجهی بین سلول‌های سالم و رده‌های سرطانی داشته است؛ ولی تابه‌حال مستقیماً بر روی سلول‌های بیماران بررسی نشده است. در این مطالعه اثر SIM5 بر سلول‌های مونونوکلئر جداشده از مغز استخوان بیماران مالتیپل‌میلوما و افراد سالم بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: باقی‌ماندهٔ نمونه‌های مغز استخوان بیماران (۷ نفر) و همچنین افرادی که حین بررسی مغز استخوان، نهایتاً مشکل پاتولوژیک خاصی در لکوسیت‌های آن‌ها تشخیص داده نشد (۷ نفر-گروه شاهد) در نظر گرفته شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شد و با SIM5 و فراکشن R10 مجاور گشت. پس از ۴۸ ساعت، توکسیسیته با تست LDH و فعالیت حیاتی با تست MTT سنجیده شدند.

نتایج: در بیماران مبتلا به مالتیپل‌میلوما، SIM5 موجب افزایش مرگ‌ومیر سلول‌ها می‌شود؛ ولی در گروه شاهد غیرسرطانی چنین اثری ندارد. هم‌بستگی قوی بین توکسیسیته با تعداد پلاسماسل‌های مغز استخوان مشاهده شد. در نمونه‌های سرطانی کاهش فعالیت سلولی در حضور SIM5 دیده می‌شود؛ ولی در نمونه‌های گروه غیرسرطانی افزایش فعالیت روی می‌دهد.

نتیجه‌گیری: تأثیر SIM5 بر سلول‌های نمونهٔ سالم و سرطانی متفاوت است و اثر توکسیک آن متمرکز بر سلول سرطانی است؛ لذا این فراورده برای مطالعهٔ بیشتر بسیار باارزش محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: SIM5، مغز استخوان، مالتیپل‌میلوما، تکثیر سلولی

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

مقدمه

سرطان که حاصل رشد بی‌رویه و بدخیم سلول‌های بدن است، از معضلات جدی جوامع امروزی است و در بین آن‌ها بدخیمی‌های خونی دستهٔ بزرگی از بیماری‌های خونی هستند که اهمیت ویژه‌ای دارند (۱). مالتیپل‌میلوما ازجملهٔ این سرطان‌هاست که در آن سلول‌های سرطانی (پلاسماسل) در مغز استخوان بیماران تجمع می‌یابند. حضور بیش از اندازه و غیرعادی پلاسماسل‌ها در مغز استخوان و وجود پروتئین‌های منوکلونال در خون و ادرار بیماران از نشانه‌های این بیماری است (۲،۳). روش‌های درمانی هریک دارای مشکلات اجرایی و عوارض جانبی هستند که محدودیت‌هایی در درمان ایجاد می‌کند (۷-٤)؛ لذا یافتن داروهای جایگزین با اثرات جانبی کمتر و اثرات مفید بیشتر (به‌ویژه بر سیستم ایمنی) ضرورت پیدا می‌کند و گیاهان دارویی بستر مناسبی در این زمینه هستند.

مطالعات بسیاری دربارهٔ اثر دارویی گیاهان روی رده‌های سلولی سرطان ریه، پستان و... انجام گرفته است و نتایج آن‌ها اثرات سایتوتوکسیک داروهای گیاهی را نشان داده است (۸،۹). هرچند مطالعات مربوط به رده‌های سلولی مرحلهٔ بسیار مهمی در تحقیقات مربوط به یافتن فراورده‌های ضدسرطانی محسوب می‌شوند، ولی تأیید اثر آن‌ها بر سلول سرطانی که مستقیماً از بدن بیمار به‌دست آمده باشد، می‌تواند گامی به جلو باشد. یک فراوردهٔ گیاهی که جزء اصلی تشکیل‌دهندهٔ آن عصارهٔ مرزنگوش می‌باشد، به‌نام SIM5، اثرات درخورتوجهی ازنظر اثرات ضدسرطانی داشته است. بر اساس مطالعات قبلی ما این فراورده دارای اثر توکسیک قوی بر رده‌های سرطانی بوده و در همان شرایط اثر سمی بر روی سلول‌های نرمال ندارد (۱۰) که نشان‌دهندهٔ قدرت افتراق خوبی بین سلول سرطانی و طبیعی است. از بین فراکشن‌های (بخش‌های مختلف ترکیبات ازنظر وزن مولکولی تقریبی) آن، فراکشن R10 (مواد با وزن مولکولی بین ۱۰ تا ۳۰ کیلودالتون) بهترین اثر را نشان داده است (۱۱)؛ ولی تأثیر این فراورده و فراکشن آن به‌طور مستقیم بر سلول‌های به‌دست‌آمده از بیماران مبتلا به سرطان بررسی نشده است.

در این مطالعه اثر ضدسرطانی SIM5 و فراکشن R10 بر سلول‌های مونونوکلئر جداشده از مغز استخوان بیماران سرطانی و افراد گروه شاهد (غیرسرطانی) ازنظر توکسیسیته و فعالیت سلولی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

افراد و نمونه‌ها

این مطالعه (مورد-شاهدی) بر روی سلول‌های جداشده از نمونه‌های تازهٔ مغز استخوان بیماران که به بیمارستان مصطفی خمینی تهران مراجعه کرده و به‌دلایل بالینی و تشخیص پزشک متخصص نیازمند اخذ و بررسی نمونهٔ مغز استخوان بودند، در دو گروه مالتیپل‌میلوما و گروه شاهد صورت گرفته است (مجوز کمیتهٔ اخلاق پزشکی به شمارهٔ ٤١/١٧٥٢٦٩ تصویب‌شده در دانشگاه شاهد).

گروه بیماران (مالتیپل‌میلوما): بیماران با علائمی شامل کم‌خونی و کاهش وزن و درد استخوانی بر اساس تشخیص و تأیید پزشک متخصص هماتولوژی-انکولوژی در این مطالعه قرار گرفتند و آزمایشات اولیهٔ این بیماری (درصد پلاسماسل مغز استخوان بیش از ۱۰درصد و درصد باند گامای الکتروفورز پروتئین سرم بیش از ۲۵درصد) توسط متخصص پاتولوژی تأیید گردید. این افراد داروهای سرکوبگر ایمنی یا ضدسرطانی مصرف نکرده و سابقهٔ نقص ایمنی نداشته‌اند و از بین نمونه‌های تازه تشخیص‌داده‌شدهٔ مالتیپل‌میلوما انتخاب شدند.

گروه شاهد (غیرسرطانی): افرادی که بعد از بررسی نمونهٔ مغز استخوان، تشخیص سرطان در آن‌ها منتفی و صرفاً علائمی شامل کم‌خونی و یا ترومبوسیتوپنی داشتند و داروهای سرکوبگر ایمنی مصرف نکرده‌اند و یا سابقهٔ عفونت یا بیماری نقص ایمنی نداشته‌اند، به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

مراحل کار برای هر فرد شرح داده شد، رضایت‌نامه برای هریک از مراجعه‌کنندگان تهیه شد و در صورت رضایت، از باقی‌ماندهٔ نمونهٔ مغز استخوان آن‌ها برای انجام این پژوهش نیز استفاده شد. از بین کسانی که مورد بررسی قرار گرفتند، نهایتاً در هر گروه ۷ نفر واجد تمام معیارها بودند. داده‌های مربوط به شمارش سلول‌های خون محیطی (توسط دستگاه شمارشگر سلولی Kx-21 Sysmex, Japan) براساس اطلاعات مندرج در پروندهٔ افراد گزارش شده است.

جداسازی سلول‌های مونونوکلئر و کشت

باقی‌ماندهٔ نمونهٔ مغز استخوان (Bone Marrow Mononuclear Cell-BMMC) با ضدانعقاد هپارین مخلوط، در شرایط استریل و زیر هود لامینار به‌نسبت ۲:۱ با بافر PBS رقیق شد و به‌آرامی به لولهٔ فالکون استریل محتوی ۲/۵ سی‌سی محلول فایکول (1.077 g/ml Ficoll-Paque) اضافه شد و با دور rpm ۲۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۱۸ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. حلقهٔ میانی حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای با سمپلر برداشت شد و به لولهٔ فالکون استریل دیگر انتقال داده شد. مجدداً ۲ بار شست‌وشو انجام شد. به رسوب سلولی در آخرین مرحلهٔ شست‌وشو ۱ میلی‌لیتر محیط PRMI به همراه ۱۰درصد FBS اضافه شد و شمارش سلول‌ها با لام نئوبار همراه با تریپان بلو (۰/٤درصد) انجام گرفت. سپس $۱۵×۱۰^{٤}$ سلول تک‌هسته‌ای در هر چاهک میکروپلیت ۹٦ خانه کشت داده شد. پنج چاهک فقط به سلول‌ها و محیط کشت اختصاص داده شد (کنترل) و به چاهک‌های دیگر مقادیر منتخب SIM5 و R10 اضافه شد (پنج چاهک برای هر حالت). غلظت‌های مورداستفاده بر اساس مطالعات قبلی ۰/٤ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 و ۰/۰٦ میلی‌گرم در میلی‌لیتر R10 هستند. برای تهیهٔ فراکشن R10 از سیستم اولترافیلتراسیون آمیکون استفاده شد؛ به‌طوری‌که محلول حاوی SIM5 از چندین فیلتر با اندازه‌های ۱۰۰، ۵۰، ۳۰، ۱۰ و ۵ کیلودالتونی عبور داده شد. مولکول‌هایی که از فیلتر ۳۰ رد شده، ولی بالای فیلتر ۱۰ باقی ماندند عمدتاً حاوی مولکول‌هایی با وزن بین ۱۰ تا ۳۰ کیلودالتون هستند و R10 نامیده می‌شوند.

پس از پایان مدت انکوباسیون ٤۸ساعته، میکروپلیت سانتریفوژ شد و مایع رویی حاصل از کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای جمع‌آوری و تست MTT بر روی سلول‌ها انجام شد.

فعالیت حیاتی سلول با تست MTT

این تست برای سنجش میزان فعالیت سلولی که با فعالیت آنزیم‌ها ازجمله آنزیم‌های میتوکندریایی مرتبط است، طراحی شده است. در شرایط مرگ‌ومیر سلولی، مقدار آن کاهش و در شرایط فعال‌شدن یا تکثیر سلول مقدار آن افزایش می‌یابد. آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده، MTT (3-(4,5) dimethylthiazol 2 yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) را به کریستال‌های فورومازان که ترکیبی آبی‌رنگ و نامحلول است تبدیل می‌کند (۱۲،۱۳). پس از گذشت ٤۸ ساعت مجاورت سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان با SIM5، R10 یا بدون آن‌ها، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شده و پلیت‌ها به‌مدت ٤ ساعت انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک به‌آرامی تخلیه شد. کریستال‌های موجود در ته هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اسیدی (N ۰/۰٤ در اسیدکلریدریک) حل شده و جذب نوری هر چاهک با دستگاه ELISA Reader ثبت گردید. درصد فعالیت بر اساس جذب مشاهده‌شده و فرمول زیر گزارش شده است:

$$\text{درصد فعالیت} = \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های مواجه با SIM5}}{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های بدون SIM5}} \times ۱۰۰$$

سنجش میزان سایتوتوکسیسیته با تست LDH(Lactate dehydrogenase)

لاکتات دهیدروژناز یا LDH یک آنزیم سیتوزولی پایدار است و از سلول‌های لیزشده رها می‌شود و بر اساس آن می‌توان درصد سایتوتوکسیسیتهٔ سلول‌ها را

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

محاسبه کرد. محلول رویی سلول‌های کشت‌داده‌شده بعد از ٤٨ ساعت جمع‌آوری شده و ٥٠ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک و همچنین کنترل‌های لازم در پلیت ریخته شد و ٥٠ میکرولیتر نیز از محلول کیت LDH (Roche, Germany) به آن‌ها افزوده شد و ٣٠ دقیقه در جای تاریک و در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از این مدت‌زمان، میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول‌موج ٤٩٢ نانومتر خوانده شد. در این تست باید چاهک‌های کنترل زمینه (فقط حاوی محیط کشت) و کنترل‌های پایین (تراوش خودبه‌خودی آنزیم از سلول بدون هیچ تیماری) و کنترل بالا (اضافه‌کردن تریتون ١٠٠ به‌منظور لیز سلول و آزادشدن LDH به‌میزان حداکثری) نیز در نظر گرفته شوند. میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل زمینه (Background control) محاسبه شد و از میانگین جذب نوری بقیهٔ کنترل‌ها (low and high control) و تست (exp.value) کسر شد. سپس طبق فرمول، درصد مرگ سلولی (سایتوتوکسیسیته) در وضعیت‌های مختلف به‌دست آمد.

% Cytotoxicity = (exp.value - low con / high con - low con) × 100

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری، میانگین و پراکندگی داده‌ها و آزمون T آنالیز شد و برای داده‌های نان‌پارامتریک از Fisher`s test استفاده شد (نرم‌افزارهای Excel و Graph pad Prism 5). مبنای معنی‌دار بودن اختلافات $P< 0.05$ در نظر گرفته شده است.

نتایج

داده‌های دموگرافیک گروه بیمار و شاهد

از ٧ نفر افراد هرکدام از دو گروه مالتیپل‌میلوما و شاهد (غیرسرطانی) یک نفر زن و بقیهٔ افراد مرد بودند؛ لذا ازنظر جنسیت تفاوت آماری بین دو گروه وجود نداشت. میانگین سن افراد گروه شاهد ٩/٧±٥٨ و افراد مبتلا به مالتیپل‌میلوما ٧/٠±٧١ سال بود و این تفاوت ازلحاظ آماری معنادار بود ($P<0.02$) طیف سنی گروه کنترل ٤٣ تا ٧٣ و گروه بیمار ٥٨ تا ٧٩ بود.

میانگین تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون محیطی

همان‌طور که در جدول ١ دیده می‌شود، میانگین گلبول‌های قرمز خون محیطی نیز در گروه بیمار کمتر از گروه کنترل (یا غیرسرطانی) است، این تفاوت ازلحاظ آماری معنادار است ($P<0.05$) (جدول ١).

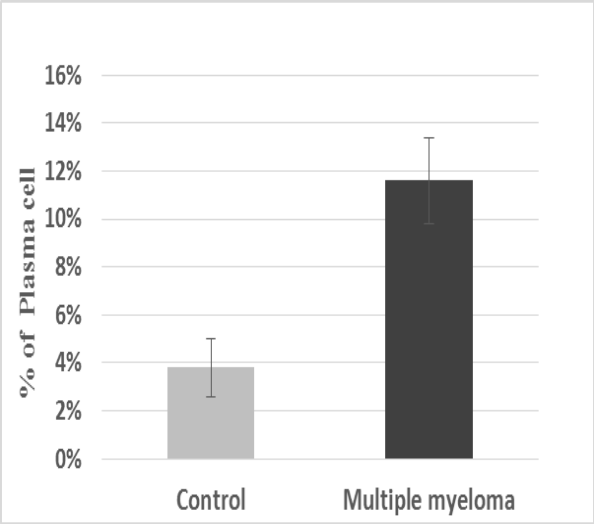
جدول ١. میانگین گلبول‌های سفید و قرمز خون محیطی در افراد موردمطالعه در گروه کنترل و بیماران مالتیپل‌میلوما

	گلبول سفید		گلبول قرمز	
	تعداد در میلی‌متر مکعب (میانگین ± انحراف معیار)	کمترین و بیشترین تعداد	تعداد در میلی‌متر مکعب (میانگین ± انحراف معیار)	کمترین و بیشترین تعداد
گروه کنترل	(٩.٠٧±٢.٩)×١٠^٣	(٤.٥-١١.٩)×١٠^٣	(٤.٥±٠.٥)×١٠^٦	(٣.٥-٥.١)×١٠^٦
گروه MM	(٦.١٣±٢.٦)×١٠^٣	(٣.١-١٢.١)×١٠^٣	(٣.٥±٠.٩)×١٠^٦	(٢.٢-٤.٥)×١٠^٦
P Value	٠.١٥		٠.٠٣	

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

درصد پلاسماسل‌ها و تعداد سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان

درصد پلاسماسل‌ها در مغز استخوان در گروه کنترل بین ۲ تا ۵درصد متغیر بود، درحالی‌که در تمامی افراد گروه بیمار بالاتر از ۱۰درصد مشاهده گردید (بین ۱۰ تا ۱۵درصد). میانگین درصد پلاسماسل‌ها در گروه کنترل ۱/۲±۳/۸درصد و در گروه بیمار ۱/۸±۱۱/٦درصد بوده (نمودار ۱) این تفاوت ازنظر آماری معنی‌دار بود (P<0.000).



نمودار ۱. میانگین درصد پلاسماسل‌های مغز استخوان در دو گروه مالتیپل‌میلوما و گروه شاهد (غیرسرطانی).

لام نمونهٔ مغز استخوان تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین انجام شد و درصد پلاسماسل‌ها تعیین گردید. اختلاف ازلحاظ آماری معنادار است (P<0.05).

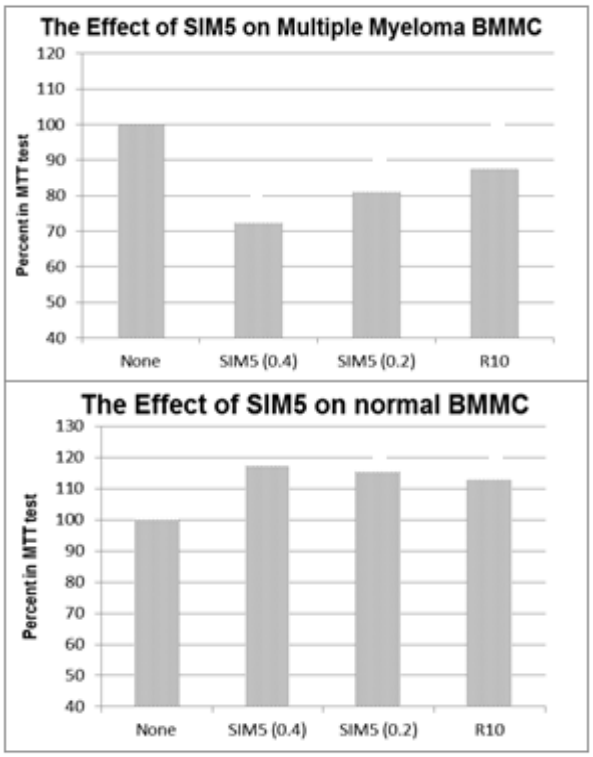
سلول‌های تک‌هسته‌ای از نمونهٔ مغز استخوان (BMMC) گروه بیمار و شاهد جدا شد. حیات سلولی در هر دو گروه با رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی گردید که هیچ‌کدام کمتر از ۹۸درصد نبود و سپس تعداد سلول‌ها شمارش و محاسبهٔ تعداد سلول‌های مونونوکلئر به‌ازای هر میلی‌لیتر آسپیرهٔ مغز استخوان انجام شد. تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای به‌دست‌آمده از هر میلی‌لیتر مغز استخوان، در دو گروه تفاوت معنادار ازلحاظ آماری نداشت (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان (BMMC) در هر میلی‌لیتر آسپیرهٔ مغز استخوان

	تعداد در میلی‌لیتر	بیشترین و کمترین تعداد
گروه شاهد	(۱۱.۸±۲.۵)×۱۰^٦	(۸-۱۵)×۱۰^٦
گروه مالتیپل‌میلوما	(۱۲±۷.۰)×۱۰^٦	(۵-۲۲)×۱۰^٦
P Value	۰.٦٤	

فعالیت حیاتی (MTT) سلول‌ها تحت اثر SIM5

در گروه مالتیپل‌میلوما، درصد فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان (که حاوی پلاسماسل‌های سرطانی نیز هستند) در حالت مواجهه با ٤/ ۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 حدود ۲۸درصد کاهش داشته به ۱۵/۱±۷۲/۳ رسید (در مقایسه با سلول‌های همین بیماران بدون SIM5 یا کنترل) که نشان‌دهندهٔ مرگ‌ومیر سلولی و ازنظر آماری نیز معنی‌دار است (P<0.002). در حضور ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 حدود ۱۹درصد (P<0.01)، در حضور R10 حدود ۱۳درصد کاهش فعالیت مشاهده شد (P<0.02).



نمودار ۲. درصد فعالیت حیاتی سلول‌ها تحت اثر SIM5

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان هر دو گروه جدا شدند و ۱۰۴×۱۵ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه به‌مدت ۴۸ ساعت و به‌صورت تیمار با دارو و بدون دارو در چاهک‌های جداگانه کشت داده شد. میانگین این تست به‌صورت درصد فعالیت محاسبه شد. ستاره نشان‌دهندهٔ معناداربودن می‌باشد ($P<0.05$).

ولی همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان در گروه غیربیمار وقتی در معرض ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 قرار داشتند، نه‌تنها کاهش نداشت، بلکه افزایش داشته و میانگین آن به ۱۱۷/۲±۴/۶ رسید که نسبت به سلول‌های بدون SIM5، افزایش فعالیت به میزان ۱۷درصد را نشان می‌داد که ازلحاظ آماری نیز معنی‌دار بود ($P<0.000$). در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 و R10 نیز نتایج مشابهی دیده شد، به‌ترتیب افزایش فعالیت به‌میزان ۱۵درصد ($P<0.02$) و ۱۲درصد ($P<0.04$).

باتوجه‌به اینکه در حضور SIM5، کاهش چشمگیر فعالیت یا به‌عبارتی مرگ‌ومیر سلولی در سلول‌های افراد سرطانی و افزایش فعالیت حیاتی در گروه غیرسرطانی دیده می‌شود، تفاوت بین فعالیت حیاتی دو گروه بیش از ۴۵درصد بوده، به‌طور واضح ازنظر آماری معنادار است ($P<0.000$).

سایتوتوکسیسیتهٔ سلول‌ها (در تست LDH)

پس از کشت و انکوباسیون ۴۸ساعتهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان گروه بیمار و شاهد در حضور SIM5 و R10 و بدون هیچ‌کدام از این موارد (کنترل برای هر گروه)، سوپرناتانت جمع‌آوری و آنزیم LDH آزادشده در محیط کشت سنجیده شد، سپس طبق فرمول درصد سایتوتوکسیسیته محاسبه گردید.

میانگین جذب خوانده‌شده در کشت بدون SIM5 (کنترل بدون دارو) در بیماران مالتیپل‌میلوما و گروه شاهد (غیرسرطانی) به‌ترتیب ۰/۸۷۱±۰/۰۵۶ و ۰/۸۸۸±۰/۰۷۲ است که ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (جدول ۳).

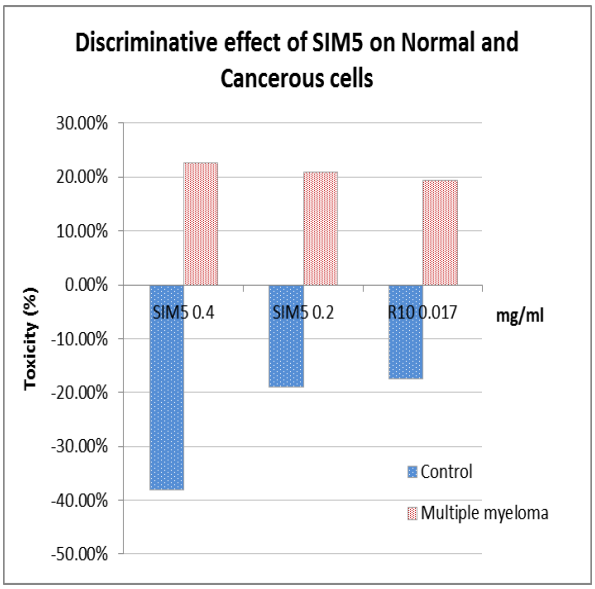
جدول ۳. تأثیر SIM5 بر رهاسازی LDH از سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان در محیط کشت

	بدون SIM5	SIM5 ۰.۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	PValue[a]	SIM5 ۰.۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	PValue[a]	R10 ۰.۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	PValue[a]
مالتیپل‌میلوما	۰.۰۷±۰.۸۹	۰.۰۸±۱.۰۴	(۰.۰۱۲)	۰.۲۳±۱.۰۲	(۰.۲۵۵)	۰.۱۶±۱.۱۰	(۰.۰۴۴)
غیرسرطانی	۰.۰۵±۰.۸۷	۰.۱۵±۰.۶۴	(۰.۰۰۲)	۰.۰۸±۰.۷۵	(۰.۰۱۴)	۰.۰۶±۰.۷۶	(۰.۰۰۷)
P Value[b]	۰.۶۹۷	۰.۰۰۰		۰.۰۵۰		۰.۰۰۸	

[a] مقایسه با کنترل همان گروه یعنی کشت سلول‌های فاقد SIM5
[b] مقایسهٔ دو گروه سرطانی و غیرسرطانی در شرایط مشابه کشت

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

در گروه سرطانی، غلظت ۰.٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 موجب افزایش آزادشدن LDH از سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان (حاوی پلاسماسل‌های سرطانی) شده و میانگین جذب به ۱/۰٤٥±۰/۰۷۲ رسیده است (جدول ۳). این تفاوت طبق فرمول برابر ۲۲/٦درصد مرگ‌ومیر سلولی یا سایتوتوکسیسیته است (P<0.012 نسبت به کنترل بدون SIM5) (نمودار ۳).



نمودار ۳. درصد سایتوتوکسیسیتهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان تحت اثر SIM5

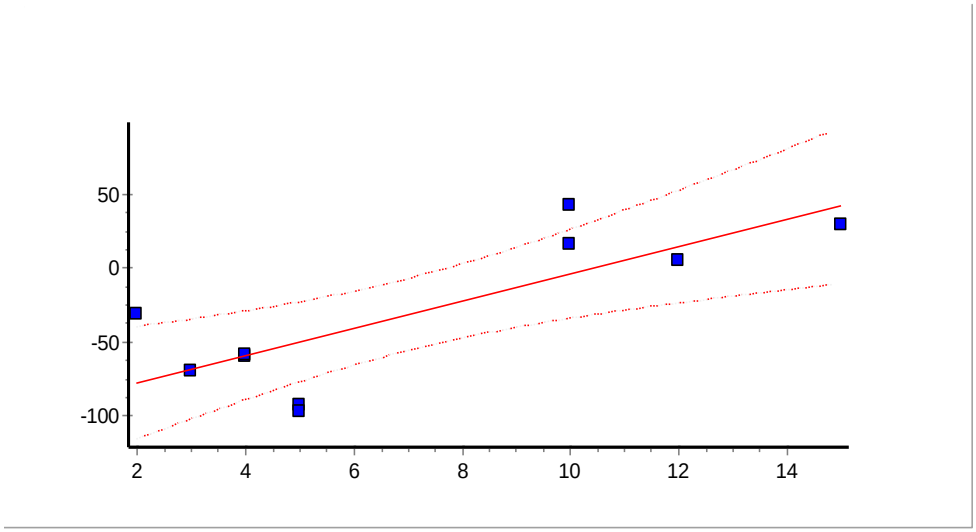
سلول‌ها از مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل‌میلوما و افراد کنترل (غیرسرطانی) به‌تعداد 15×10^4 در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه به‌مدت ٤۸ ساعت کشت داده شد، سپس مایع رویی هر چاهک جمع‌آوری شد. برطبق کیت میزان مرگ سلولی در هر دو گروه (در غلظت ۰.٤، ۰.۲ از SIM5 و ۰.۰۱۷ از R10) محاسبه و به‌صورت درصد توکسیسیته نسبت به سلول‌های فاقد دارو گزارش شد. ستاره نشان‌دهندهٔ معناداربودن اختلاف می‌باشد (P<0.05).

از طرف دیگر، حضور SIM5 (۰.٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در سلول‌های افراد غیرسرطانی نه‌تنها موجب مرگ‌ومیر سلولی نشده، بلکه این سلول‌ها نسبت به کنترل خود (یعنی همان سلول‌ها بدون SIM5)، مرگ‌ومیر کمتری دارند که ازنظر آماری معنی‌دار است (P<0.002). کاهش مرگ‌ومیر بر اساس فرمول این تست باید به‌صورت منفی گزارش شود و لذا در این حالت ۳۸/۱- درصد مرگ سلولی رخ داده است (نمودار ۳). غلظت ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 و فراکشن R10 نیز اثر مشابهی داشته‌اند؛ یعنی به‌ترتیب ۱۷/۵- درصد (P<0.014) و ۱۹- درصد (P<0.007) مرگ‌ومیر سلولی (نمودار ۳).

باتوجه‌به افزایش مرگ‌ومیر در گروه سرطانی و کاهش آن در گروه غیرسرطانی توسط SIM5، تأثیر آن در دو گروه معکوس یکدیگر است، اختلاف آشکار و معنی‌دار ازنظر آماری نشان می‌دهند (نمودار ۳)؛ درحالی‌که بدون SIM5 تفاوت معنی‌داری نداشتند.

باتوجه‌به اینکه سلول‌های سرطانی در این بیماران پلاسماسل هستند، هم‌بستگی بین درصد پلاسماسل مغز استخوان و میزان توکسیسیته بررسی شد و مشاهده شد که هم‌بستگی بسیار قوی(R=0.79, P<0.0067) بین این دو متغیر وجود دارد و با افزایش تعداد پلاسماسل‌ها سایتوتوکسیسیته افزایش می‌یابد. همان‌طور که در نمودار ٤ دیده می‌شود، تا زمانی که درصد پلاسماسل‌ها در محدودهٔ طبیعی است، توکسیسیته هم دیده نمی‌شود؛ ولی در افراد مبتلا که دارای پلاسماسل سرطانی فراوان هستند، توکسیسیته به‌میزان زیادی روی می‌دهد.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017



نمودار ٤. هم‌بستگی بین درصد پلاسماسل مغز استخوان و میزان توکسیسیته در حضور SIM5 0.4. محور افقی درصد پلاسماسل‌ها و محور عمودی میزان توکسیسیته را نشان می‌دهد

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات قبلی درمورد فراوردهٔ SIM5 اثرات ضدسرطانی آن را بر روی رده‌های سرطانی مختلف (ازجمله رده‌های لنفوئید) نشان داده است و درعین‌حال اثر توکسیکی بر لنفوسیت‌ها یا سایر سلول‌های سالم دیده نشده است (۱۰). طبق مطالعات قبلی IC50 برای SIM5 حدود ۰/٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است (در این مطالعه از دو غلظت ۰/٤ و ۰/۲ استفاده شد) و یکی از مؤثرترین فراکشن‌های این فراورده (براساس مطالعات قبلی) که R10 است (ترکیبات با وزن مولکولی تقریبی بین ۱۰ تا ۳۰ کیلودالتون) برای این مطالعه انتخاب شد (١٤).

رده‌های سلولی سرطانی که در مطالعات اولیه مورد آزمایش قرار می‌گیرند با سلول‌های سرطانی موجود در بدن بیماران تفاوت‌هایی دارند و بعضاً ممکن است ماده‌ای که در شرایط in vitro بر ردهٔ سرطانی مؤثر است بر سلول سرطانی در بدن تأثیر کمتر یا متفاوتی داشته باشد؛ به‌ویژه که این سلول‌ها در ریزمحیط مناسب برای سلول‌های سرطانی در مغز استخوان بیماران رشد کرده‌اند (۱۵)؛ لذا اولین هدف این مطالعه این بود که تأثیر توکسیک SIM5 که تابه‌حال در رده‌های سرطانی مشاهده شده بر سلول سرطانی به‌دست‌آمده از بدن بیمار نیز بررسی گردد. البته در آزمایشات متعدد قبلی نیز با استفاده از سلول‌های مونونوکلئر خون انسان یا لنفوسیت‌های طحال موش نشان داده شده بود که SIM5 برای سلول‌های طبیعی توکسیک نیست (١٤) که در این مطالعه بررسی مجدد این نکته نیز روی سلول‌های مغز استخوان صورت گرفت.

در این مطالعه یک گروه شاهد در نظر گرفته شد که متشکل از افرادی بودند که به‌دلایل مختلف نیاز به بررسی بالینی مغز استخوان داشتند؛ ولی نهایتاً مشکل پاتولوژیک مرتبط با سرطان (یا نقص ایمنی یا سایر موارد مرتبط) دیده نشد و اکثراً دچار کم‌خونی در سطح گلبول قرمز بودند که باتوجه‌به جداسازی سلول‌های مونونوکلئر، به‌نظر نمی‌رسد تأثیری بر یافته‌های ما داشته باشد. دو گروه ازنظر جنسیت تفاوت معنی‌داری نداشتند؛ ولی میانگین سن در گروه شاهد بیش از گروه سرطانی بود. البته هر دو گروه از افرادِ با سنین بالا تشکیل شده بود و ازآنجاکه سطح پایهٔ پارامترهای اندازه‌گیری‌شده مثل فعالیت حیاتی در تست MTT یا مرگ‌ومیر قبل از اضافه‌کردن دارو یا حتی سطح اولیهٔ IL-2 در هیچ مورد بین دو گروه اختلاف معناداری نشان نداد، باعث می‌شود اختلاف سن را به‌عنوان عاملی که اثر جدی در این

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

تست‌ها داشته باشد محسوب نکنیم.

در این مطالعه در نمونه‌سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل‌میلوما که حاوی بخش عمده‌ای از سلول‌های سرطانی است، هم کاهش فعالیت بر اساس تست MTT و هم افزایش مرگ‌ومیر بر اساس تست LDH مشاهده گردید که می‌تواند نشان‌دهندهٔ اثر ضدسرطانی SIM5 باشد. مطالعات دیگری نیز از نمونهٔ مغز استخوان بیماران برای بررسی اثر داروها استفاده کرده‌اند (١٦). البته لازم به ذکر است که در مجموعه‌سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان، سلول‌های سالم نیز حضور دارند؛ ولی هم‌بستگی قوی (r=0.79) که بین میزان مرگ‌ومیر و درصد پلاسماسل‌ها (سلول‌های سرطانی در مالتیپل‌میلوما) دیده شد، نشان می‌دهد که وقوع توکسیسیته ارتباط قوی با میزان حضور سلول‌های سرطانی دارد و در شرایطی که درصد پلاسماسل‌ها طبیعی است، هیچ مرگ‌ومیری مشاهده نمی‌شود. از طرف دیگر، SIM5 در افراد گروه شاهد هیچ تأثیر توکسیکی بر سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان در محیط کشت نداشته و حتی نسبت به کنترل خود مرگ‌ومیر کمتری نیز داشتند.

نتایج فوق با تست MTT (مربوط به فعالیت حیاتی سلول) نیز تأیید شد و علاوه بر آن مشاهده گردید که در افراد گروه شاهد نه‌تنها کاهش فعالیت سلولی دیده نمی‌شود، بلکه افزایش فعالیت نیز روی می‌دهد (حدود ١٢ تا ١٧درصد افزایش فعالیت). ازآنجاکه اکثریت قابل‌توجه سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان لنفوسیت و باقی‌ماندهٔ آن‌ها نیز معمولاً مونوسیت‌ها هستند، این نتیجه با یافته‌های قبلی مبنی‌بر قدرت تقویت سلول‌های ایمنی توسط این فراورده (که در موش انجام شده بود) سازگار است.

درمجموع می‌توان به این نکته اشاره کرد که این فراورده دارای اثرات توکسیک بر مجموعهٔ حاوی سلول‌های سرطانی (که تازه از بدن بیماران خارج شده‌اند) بوده؛ ولی برای مجموعهٔ فاقد سلول سرطانی توکسیک نیست. باتوجه‌به اینکه این فراورده از گیاهان قابل‌خوردن در رژیم غذایی انسان منشأ گرفته است، این یافته‌ها گام بزرگی در به‌کارگیری آن در بیماران سرطانی بر اساس مطالعات بیشتر خواهد بود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد می‌باشد. با تشکر از پرسنل بیمارستان مصطفی خمینی و کارشناس گروه ایمنی‌شناسی، آقای جمالی و سایر کسانی که در اجرای این طرح یاری رساندند.

منابع

1. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. (2010) Recent advances in cancer therapy: an overview. Current Pharmaceutical Design. 16(1): 3-10.
2. Heider U, Fleissner C, Zavrski I, Kaiser M, Hecht M, Jakob C, Sezer O. Bone markers in multiple myeloma. European Journal of Cancer. 2006; 42(11): 1544-53.
3. Silvestris F, Lombardi L, De Matteo M, Bruno A, Dammacco F. Myeloma bone disease: pathogenetic mechanisms and clinical assessment. Leukocyte Research. 2007; 31(2): 129-38.
4. Armirage JO, Longo DL. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. USA. McGraw-Hill componies,Inc. 2005: 641-655.
5. Bierman J, Harris N, Armitage JO. Cecil textbook of medicine. 22nd ed. California. Elsevir Inc. 2004: 1174-1183.
6. Nooka A, Lonial S. Sequential or combination therapy for multiple myeloma. Expert Reviews in Hematology. 2012; 5(5): 533-45.
7. Slavin S, Morecki S, Weiss L, Or R. Immunotherapy of hematologic malignancies and metastatic solid tumors in experimental animals and man. Critcal Reviews in Oncology/Hematology. 2003; 46(2): 139-63.

8. Ruan WJ, Lai MD, Zhou JG. Anticancer effects of chines herbal medicine, science or myth. Journal of Zhejiang University Science. 2006; 7(12): 1006-14.
9. Ranga RS. A herbal medicine for treatment of lung cancer. Molecular Cell 2005; 280 (1-2): 125-33.
10. Yaraee R, Ghazanfari T, Shams JAD, Esmaeili M. Jamali D. The Eeffect of herbal extract SIM5 on lymphoma cell lines and blood mononuclear cells. Daneshvar Medicine 2008; 15(73): 73-78.
11. Yaraee R, Kamalinejad M, Ghazanfari T, Eghtedardoost M. Discriminative Effect of SIM5 and its fractions on normal and cancerous lymphocytes. The 17th national & 5th International Conference of Biology of Iran. 2012.
12. Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity. Methods in Molecular Medicine. 2005; 110: 69-78.
13. Morgan DML. Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. Methods in Molecular Medicine. 1998; 79: 179-83.
14. Yaraee R. , Kamalinejad M., Rajabian T. Eghtedardoost, M , Jamali D. Comparison of toxic effects of SIM5 and its fractions on normal resting, activated and cancerous cells. daneshvarmed. 2016; 24(125):1-12.
15. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Görgün GT, Roccaro AM, Anderson KC, Ghobrial IM. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. Immunological Reviews. 2015 Jan; 263(1): 160-72.
16. Rebersek K, Cernelc P, Podgornik H. Evaluation of multiple myeloma cell apoptosis in primary bone marrow samples. Clinical laboratory. 2013; 59(3-4): 389-95.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 16:20 IRST on Thursday November 23rd 2017

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
24th Year, No.126
December 2016-January 2017

Received: 22/10/2016
Last revised: 07/12/2016
Accepted: 14/12/2016

Daneshvar(medicine) shahed University/ 24th year/2016-2017 /NO.126

The effect of SIM5 on bone marrow-derived mononuclear cells of multiple myeloma patients

Roya Yaraee[1*], Mohammadreza Jalali Nadoushan[2], Jalaleddin Shams[3], Shaghayegh Tajik[4]

1. Associate Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Professor of Pathology, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor of Hematology and Oncology, Mostafa Khomeini Hospital, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Asthma and Alergy Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: ryaraee@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: Cancers are among the serious problems in communities. In recent years, herbal products have been very promising regarding their anti-tumor and immunomodulatin potentials. SIM5, a herbal preparation, has had good results in discriminating between cancerous cell lines and normal cells, but have not examined directly on patients cells yet. In this study, bone marrow mononuclear cells from cancerous and non-cancerous samples were used to study the effects of SIM5.

Materials and Methods: Remained bone marrow samples of multiple myeloma patients (7 cases) and individuals who clinically needed bone marrow examination, but finally were diagnosed with no serious pathologic conditions in their leukocytes (7 cases) were considered as control group. Mononuclear cells were isolated and cultured with SIM5 and R10 fraction. After 48 h incubation, toxicity was assessed using LDH release test and vital activity with MTT test.

Results: Cell toxicity with SIM5 was observed only in multiple myeloma samples and not in control group samples. There was a strong correlation between toxicity and the number of plasma cells in bone marrow mononuclear cells. SIM5 induced a decrease in vital activity of cancerous cells but an increase in the normal bone marrow samples.

Conclusion: SIM5 has distinct effects on normal and cancerous cells, and its toxic effect is focused on the latter. Therefore, it possesses the properties of an ideal product to be studied more seriously.

Keywords: SIM5, Bone Marrow, Multiple myeloma, Cell proliferation.