

# دانشور

## پزشکی

## تأثیر فراورده گیاهی SIM5 بر سلول‌های مونونوکلئر جداشده از مغز استخوان بیماران مالتیپل میلوما

نویسندگان: رؤیا یارائی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا جلالی ندوشن<sup>۲</sup>، جلال‌الدین شمس<sup>۳</sup>، شقایق تاجیک<sup>۴</sup>

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

E-mail: ryaraee@yahoo.com

\* نویسنده مسئول: رؤیا یارائی

### چکیده

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

مواد و روش‌ها: باقی‌مانده 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 مالتیپل میلوما، 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 نمونه سالم و سرطانی متفاوت است و اثر توکسیک آن متمرکز بر سلول سرطانی است؛ لذا این فراورده برای مطالعه بیشتر بسیار باارزش محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: SIM5، مغز استخوان، مالتیپل میلوما، تکثیر سلولی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و چهارم-شماره ۱۲۶  
دی ۱۳۹۵

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

## مقدمه

سرطان که حاصل رشد بی‌رویه و بدخیم سلول‌های بدن است، از معضلات جدی جوامع امروزی است و در بین آن‌ها بدخیمی‌های خونی دسته بزرگی از بیماری‌های خونی هستند که اهمیت ویژه‌ای دارند (۱). مالتیپل میلوما از جمله 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 (۷-۸)؛ 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 درباره اثر دارویی گیاهان روی رده‌های سلولی سرطان ریه، پستان و... انجام گرفته است و نتایج آن‌ها اثرات سایتوتوکسیک داروهای گیاهی را نشان داده است (۹،۸). هرچند مطالعات مربوط به رده‌های سلولی مرحله بسیار مهمی در تحقیقات مربوط به یافتن فراورده‌های ضدسرطانی محسوب می‌شوند، ولی تأیید اثر آن‌ها بر سلول سرطانی که مستقیماً از بدن بیمار به دست آمده باشد، می‌تواند گامی به جلو باشد. یک فراورده گیاهی که جزء اصلی تشکیل‌دهنده آن عصاره مرزنگوش می‌باشد، به نام SIM5، اثرات درخور توجهی از نظر اثرات ضدسرطانی داشته است. بر اساس مطالعات قبلی ما این فراورده دارای اثر توكسیك قوی بر رده‌های سرطانی بوده و در همان شرایط اثر سمی بر روی سلول‌های نرمال ندارد (۱۰) که نشان‌دهنده قدرت افتراق خوبی بین سلول سرطانی و طبیعی است. از بین فراکشن‌های (بخش‌های مختلف ترکیبات از نظر 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 به دست آمده از بیماران مبتلا به سرطان بررسی نشده است.

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

## مواد و روش‌ها

## افراد و نمونه‌ها

این مطالعه (مورد-شاهدی) بر روی سلول‌های جدا شده از نمونه‌های تازه مغز استخوان بیماران که به بیمارستان مصطفی خمینی تهران مراجعه کرده و به دلایل بالینی و تشخیص پزشکی متخصص نیازمند اخذ و بررسی نمونه مغز استخوان بودند، در دو گروه مالتیپل میلوما و گروه شاهد صورت گرفته است (مجوز کمیته اخلاق پزشکی به شماره ۴۱/۱۷۵۲۶۹ تصویب شده در دانشگاه شاهد).

گروه بیماران (مالتیپل میلوما): 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 اولیه این بیماری (درصد پلاسماسل مغز استخوان بیش از ۱۰ درصد و درصد باند گامای الکتروفورز پروتئین سرم بیش از ۲۵ درصد) توسط متخصص پاتولوژی تأیید گردید. این افراد داروهای سرکوبگر ایمنی یا ضدسرطانی مصرف نکرده و سابقه نقص ایمنی نداشته‌اند و از بین نمونه‌های تازه تشخیص داده شده مالتیپل میلوما انتخاب شدند.

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

وزن بین ۱۰ تا ۳۰ کیلودالتون هستند و R10 نامیده می‌شوند.

پس از پایان مدت انکوباسیون ۴۸ ساعته، میکروپلیت ساتریفوژ 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 از جمله 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 فوروزان که ترکیبی آبی‌رنگ و نامحلول است تبدیل می‌کند (۱۲،۱۳). پس از گذشت ۴۸ ساعت مجاورت سلول‌های مونونوکلئار 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 به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک به آرامی تخلیه شد. کریستال‌های موجود در ته هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اسیدی (N ۰/۰۴ 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:

$$\text{درصد فعالیت} = \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های مواجه با SIM5}}{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های بدون SIM5}} \times 100$$

#### سنجش میزان سایتوتوکسیسیته با تست

##### (Lactate dehydrogenase)LDH

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

مراحل کار برای هر فرد شرح داده شد، رضایت‌نامه برای هر یک از مراجعه‌کنندگان تهیه شد و در صورت رضایت، از باقی‌مانده نمونه 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 پرونده افراد گزارش شده است.

#### جداسازی سلول‌های مونونوکلئار و کثرت

باقی‌مانده نمونه مغز استخوان (Bone Marrow Mononuclear Cell-BMMC) با ضدانقباض هپارین مخلوط، در شرایط استریل و زیر هود لامینار به نسبت ۲:۱ با بفر PBS رقیق شد و به آرامی به لوله فالكون استریل محتوی ۲/۵ سی سی محلول فایکول (1.077 g/ml Ficoll-Paque) اضافه شد و با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد ساتریفوژ گردید. حلقه میانی حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای با سمپلر برداشت شد و به لوله فالكون استریل دیگر انتقال داده شد. مجدداً ۲ بار شست‌وشو انجام شد. به رسوب سلولی در آخرین مرحله شست‌وشو ۱ میلی‌لیتر محیط PRMI به همراه ۱۰ درصد FBS اضافه شد و شمارش سلول‌ها با لام تئوبار همراه با تریپان بلو (۰/۴ درصد) انجام گرفت. سپس  $10^4 \times 15$  سلول تک‌هسته‌ای در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ 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 مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی ۰/۴ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 و ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر R10 هستند. برای تهیه فراكشن R10 از سیستم اولترافیلتراسیون آمیکون استفاده شد؛ به طوری که 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

پراکندگی داده‌ها و آزمون T آنالیز شد و برای داده‌های نان پارامتریک از Fisher's test استفاده شد (نرم افزارهای 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 ۷ نفر افراد هرکدام از دو گروه مالتیپل میلوما و شاهد (غیرسرطانی) یک نفر زن و بقیه افراد مرد بودند؛ لذا از نظر جنسیت تفاوت آماری بین دو گروه وجود نداشت. میانگین سن افراد گروه شاهد  $58 \pm 9/7$  و افراد مبتلا به مالتیپل میلوما  $71 \pm 7/0$  سال بود و این تفاوت از لحاظ آماری معنادار بود ( $P < 0.02$ ) طیف سنی گروه کنترل ۴۳ تا ۷۳ و گروه بیمار ۵۸ تا ۷۹ بود.

#### میانگین تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون

##### محیطی

همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود، میانگین گلبول‌های قرمز خون محیطی نیز در گروه بیمار کمتر از گروه کنترل (یا غیرسرطانی) است، این تفاوت از لحاظ آماری معنادار است ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱).

محاسبه کرد. محلول رویی سلول‌های کشت داده شده بعد از ۴۸ ساعت جمع‌آوری شده و ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک و همچنین کنترل‌های لازم در پلیت ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر نیز از محلول کیت LDH (Roche, Germany) به آن‌ها افزوده شد و ۳۰ دقیقه در جای تاریک و در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از این مدت زمان، میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۲ 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 (اضافه کردن تریتون ۱۰۰ به منظور لیز سلول و آزاد شدن LDH به میزان حداکثری) نیز در نظر گرفته شوند. میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل زمینه (Background control) محاسبه شد و از میانگین جذب نوری بقیه کنترل‌ها (low and high control) و تست (exp.value) کسر شد. سپس طبق فرمول، درصد مرگ سلولی (سایتوتوکسیسیته) در وضعیت‌های مختلف به دست آمد.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = (\text{exp.value} - \text{low con} / \text{high con} - \text{low con}) \times 100$$

#### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری، میانگین و

### جدول ۱. میانگین گلبول‌های سفید و قرمز خون محیطی در افراد مورد مطالعه در گروه کنترل و بیماران

#### مالتیپل میلوما

گلبول قرمز		گلبول سفید		
کمترین و بیشترین تعداد	تعداد در میلی‌متر مکعب (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	کمترین و بیشترین تعداد	تعداد در میلی‌متر مکعب (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	
$(3.5-5.1) \times 10^6$	$(4.5 \pm 0.5) \times 10^6$	$(4.5-11.9) \times 10^3$	$(9.07 \pm 2.9) \times 10^3$	گروه کنترل
$(2.2-4.5) \times 10^6$	$(3.5 \pm 0.9) \times 10^6$	$(3.1-12.1) \times 10^3$	$(6.13 \pm 2.6) \times 10^3$	گروه MM
	۰.۰۳		۰.۱۵	P Value

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

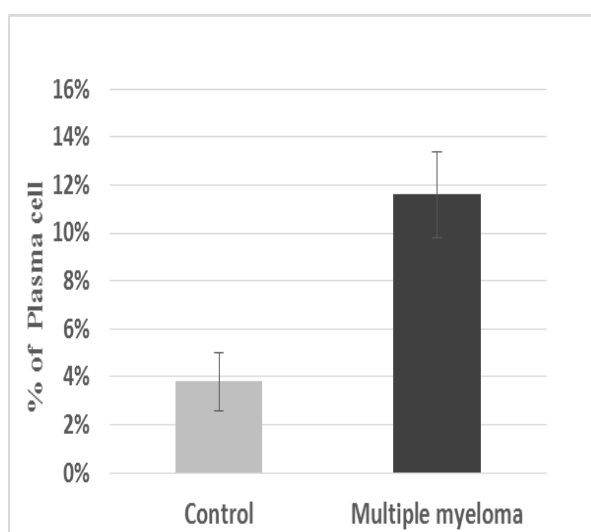
بیشترین و کمترین تعداد	تعداد در میلی‌لیتر	
$(8-15) \times 10^6$	$(11.8 \pm 2.5) \times 10^6$	گروه شاهد
$(5-22) \times 10^6$	$(12 \pm 7.0) \times 10^6$	گروه مالتیپل میلوما
	۰.۶۴	P Value

#### فعالیت حیاتی (MTT) سلول‌ها تحت اثر SIM5

در گروه مالتیپل میلوما، درصد فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان (که حاوی پلاسماسل‌های سرطانی نیز هستند) در حالت مواجهه با ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 حدود ۲۸ درصد کاهش داشته به  $72/3 \pm 15/1$  رسید (در مقایسه با سلول‌های همین بیماران بدون SIM5 یا کنترل) که نشان‌دهنده مرگ‌ومیر سلولی و از نظر آماری نیز معنی‌دار است ( $P < 0.002$ ). در حضور ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 حدود ۱۹ درصد ( $P < 0.01$ )، در حضور R10 حدود ۱۳ درصد کاهش فعالیت مشاهده شد ( $P < 0.02$ ).

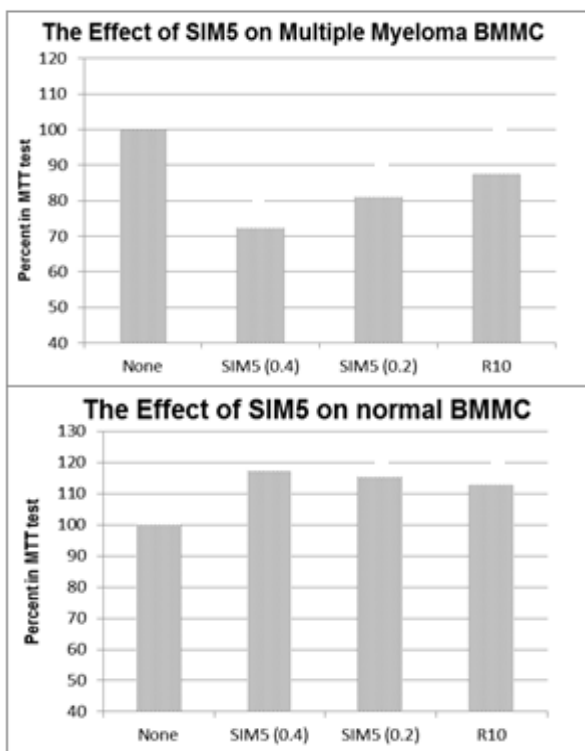
#### درصد پلاسماسل‌ها و تعداد سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان

درصد پلاسماسل‌ها در مغز استخوان در گروه کنترل بین ۲ تا ۵ درصد متغیر بود، درحالی‌که در تمامی افراد گروه بیمار بالاتر از ۱۰ درصد مشاهده گردید (بین ۱۰ تا ۱۵ درصد). میانگین درصد پلاسماسل‌ها در گروه کنترل  $3/8 \pm 1/2$  درصد و در گروه بیمار  $11/6 \pm 1/8$  درصد بوده (نمودار ۱) این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.000$ ).



نمودار ۱. میانگین درصد پلاسماسل‌های مغز استخوان در دو گروه مالتیپل میلوما و گروه شاهد (غیرسرطانی). لام نمونه مغز استخوان تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین انجام شد و درصد پلاسماسل‌ها تعیین گردید. اختلاف از لحاظ آماری معنادار است ( $P < 0.05$ ).

سلول‌های تک‌هسته‌ای از نمونه 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 ۹۸ درصد نبود و سپس تعداد سلول‌ها شمارش و محاسبه تعداد سلول‌های مونونوکلئر به‌ازای هر میلی‌لیتر آسپیره مغز استخوان انجام شد. تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای به‌دست‌آمده از هر میلی‌لیتر مغز استخوان، در دو گروه تفاوت معنادار از لحاظ آماری نداشت (جدول ۲).



نمودار ۲. درصد فعالیت حیاتی سلول‌ها تحت اثر SIM5

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

**سایتوتوکسیسیته سلول‌ها (در تست LDH)**  
پس از کشت و انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان گروه بیمار و شاهد در حضور SIM5 و R10 و بدون هیچ کدام از این موارد (کنترل برای هر گروه)، سوپرناتانت جمع‌آوری و آنزیم LDH آزاد شده در محیط کشت سنجیده شد، سپس طبق فرمول درصد سایتوتوکسیسیته محاسبه گردید.  
میانگین جذب خوانده شده در کشت بدون SIM5 (کنترل بدون دارو) در بیماران مالتیپل میلوما و گروه شاهد (غیرسرطانی) به ترتیب  $0.871 \pm 0.056$  و  $0.888 \pm 0.072$  است که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (جدول ۳).

سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان هر دو گروه جدا شدند و  $15 \times 10^4$  سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه به مدت ۴۸ ساعت و به صورت تیمار با دارو و بدون دارو در چاهک‌های جداگانه کشت داده شد. میانگین این تست به صورت درصد فعالیت محاسبه شد. ستاره نشان‌دهنده معنادار بودن می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

ولی همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان در گروه غیربیمار وقتی در معرض  $0.4$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 قرار داشتند، نه تنها کاهش نداشت، بلکه افزایش داشته و میانگین آن به  $117.2 \pm 4.6$  رسید که نسبت به سلول‌های بدون SIM5، افزایش فعالیت به میزان ۱۷ درصد را نشان می‌داد که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بود ( $P < 0.000$ ). در غلظت  $0.2$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 و R10 نیز نتایج مشابهی دیده شد، به ترتیب افزایش فعالیت به میزان ۱۵ درصد ( $P < 0.02$ ) و ۱۲ درصد ( $P < 0.04$ ).

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

PValue <sup>a</sup>	R10 $0.6$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	PValue <sup>a</sup>	SIM5 $0.2$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	PValue <sup>a</sup>	SIM5 $0.4$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	بدون SIM5	
( $0.044$ )	$0.16 \pm 1.10$	( $0.255$ )	$0.23 \pm 1.02$	( $0.012$ )	$0.08 \pm 1.04$	$0.07 \pm 0.89$	مالتیپل میلوما
( $0.007$ )	$0.06 \pm 0.76$	( $0.014$ )	$0.08 \pm 0.75$	( $0.002$ )	$0.15 \pm 0.64$	$0.05 \pm 0.87$	غیرسرطانی
	$0.008$		$0.050$		$0.000$	$0.697$	P Value <sup>b</sup>

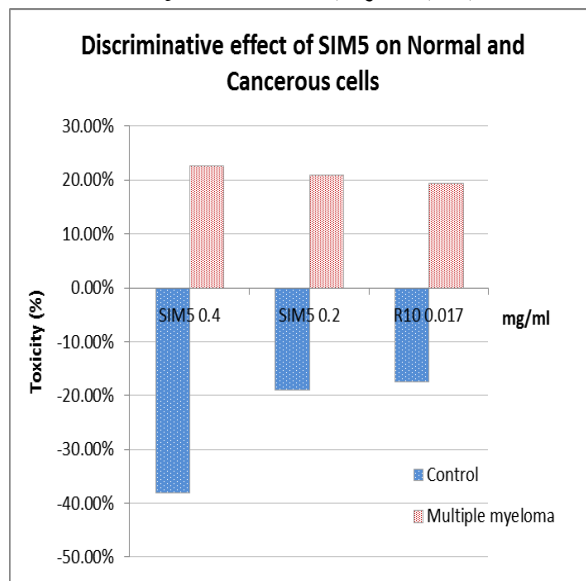
<sup>a</sup> مقایسه با کنترل همان گروه یعنی کشت سلول‌های فاقد SIM5  
<sup>b</sup> مقایسه دو گروه سرطانی و غیرسرطانی در شرایط مشابه کشت

از طرف دیگر، حضور SIM5 (۰.۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در سلول‌های افراد غیرسرطانی نه تنها موجب مرگ‌ومیر سلولی نشده، بلکه این سلول‌ها نسبت به کنترل خود (یعنی همان سلول‌ها بدون SIM5)، مرگ‌ومیر کمتری دارند که از نظر آماری معنی‌دار است ( $P < 0.002$ ). کاهش مرگ‌ومیر بر اساس فرمول این تست باید به صورت منفی گزارش شود و لذا در این حالت  $38/1 -$  درصد مرگ سلولی رخ داده است (نمودار ۳). غلظت  $0/2$  و  $0/4$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 و فراکشن R10 نیز اثر مشابهی داشته‌اند؛ یعنی به ترتیب  $17/5 -$  درصد ( $P < 0.014$ ) و  $19 -$  درصد ( $P < 0.007$ ) مرگ‌ومیر سلولی (نمودار ۳).

باتوجه به 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 از نظر آماری نشان می‌دهند (نمودار ۳)؛ درحالی‌که بدون SIM5 تفاوت معنی‌داری نداشتند.

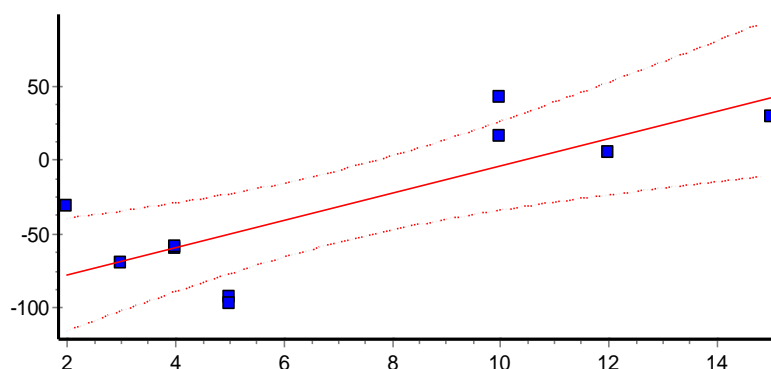
باتوجه به اینکه سلول‌های سرطانی در این بیماران پلاسماسل هستند، هم‌بستگی بین درصد پلاسماسل مغز استخوان و میزان توکسیسیته بررسی شد و مشاهده شد که هم‌بستگی بسیار قوی ( $R=0.79, P < 0.0067$ ) بین این دو متغیر وجود دارد و با افزایش تعداد پلاسماسل‌ها سایتوتوکسیسیته افزایش می‌یابد. همان‌طور که در نمودار ۴ دیده می‌شود، تا زمانی که درصد پلاسماسل‌ها در محدوده طبیعی است، توکسیسیته هم دیده نمی‌شود؛ ولی در افراد مبتلا که دارای پلاسماسل سرطانی فراوان هستند، توکسیسیته به میزان زیادی روی می‌دهد.

در گروه سرطانی، غلظت ۰.۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 موجب افزایش آزادشدن LDH از سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان (حاوی پلاسماسل‌های سرطانی) شده و میانگین جذب به  $1/045 \pm 0/072$  رسیده است (جدول ۳). این تفاوت طبق فرمول برابر  $22/6$  درصد مرگ‌ومیر سلولی یا سایتوتوکسیسیته است ( $P < 0.012$  نسبت به کنترل بدون SIM5) (نمودار ۳).



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

سلول‌ها از مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل میلوما و افراد کنترل (غیرسرطانی) به تعداد  $15 \times 10^4$  در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد، سپس مایع رویی هر چاهک جمع‌آوری شد. برطبق کیت میزان مرگ سلولی در هر دو گروه (در غلظت ۰.۴، ۰.۲ از SIM5 و ۰.۰۱۷ از R10) محاسبه و به صورت درصد توکسیسیته نسبت به سلول‌های فاقد دارو گزارش شد. ستاره نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف می‌باشد ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۴. 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

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 (۱۴) 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 به دلایل 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 با توجه به جداسازی سلول‌های مونونوکلئر، به نظر نمی‌رسد تأثیری بر یافته‌های ما داشته باشد. دو گروه از نظر جنسیت تفاوت معنی‌داری نداشتند؛ ولی میانگین سن در گروه شاهد بیش از گروه سرطانی بود. البته هر دو گروه از افراد با سنین بالا تشکیل شده بود و از آنجاکه سطح پایه پارامترهای اندازه‌گیری شده مثل فعالیت حیاتی در تست MTT یا مرگومیر قبل از اضافه کردن دارو یا حتی سطح اولیه IL-2 در هیچ مورد بین دو گروه اختلاف معناداری نشان نداد، باعث می‌شود اختلاف سن را به عنوان عاملی که اثر جدی در این

مطالعات قبلی در مورد فراورده SIM5 اثرات ضدسرطانی آن را بر روی رده‌های سرطانی مختلف (از جمله رده‌های لنفوئید) نشان داده است و در عین حال اثر توکسیکی بر لنفوسیت‌ها یا سایر سلول‌های سالم دیده نشده است (۱۰). طبق مطالعات قبلی IC50 برای SIM5 حدود ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است (در این مطالعه از دو غلظت ۰/۴ و ۰/۲ استفاده شد) و یکی از مؤثرترین فراکشن‌های این فراورده (بر اساس مطالعات قبلی) که R10 است (ترکیبات با وزن مولکولی تقریبی بین ۱۰ تا ۳۰ کیلو دالتون) برای این مطالعه انتخاب شد (۱۴).

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 رده 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 تا به حال در رده‌های سرطانی مشاهده شده بر سلول سرطانی به دست آمده از بدن بیمار



نمی‌شود، بلکه افزایش فعالیت نیز روی می‌دهد (حدود ۱۲ تا ۱۷ درصد افزایش فعالیت). از آنجاکه اکثریت قابل توجه سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان لنفوسیت و باقی‌مانده آن‌ها نیز معمولاً مونوسیت‌ها هستند، این نتیجه با یافته‌های قبلی مبنی بر قدرت تقویت سلول‌های ایمنی توسط این فراورده (که در موش انجام شده بود) سازگار است.

در مجموع می‌توان به این نکته اشاره کرد که این فراورده دارای اثرات توکسیک بر مجموعه حاوی سلول‌های سرطانی (که تازه از بدن بیماران خارج شده‌اند) بوده؛ ولی برای مجموعه فاقد سلول سرطانی توکسیک نیست. با توجه به اینکه این فراورده از گیاهان قابل خوردن 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 دانشکده 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.

تست‌ها داشته باشد محسوب نکنیم.

در این مطالعه در نمونه سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل میلوما 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 نشان‌دهنده اثر ضدسرطانی SIM5 باشد. مطالعات دیگری نیز از نمونه مغز استخوان بیماران برای بررسی اثر داروها استفاده کرده‌اند (۱۶). البته لازم به ذکر است که در مجموعه سلول‌های مونونوکلئر مغز استخوان، سلول‌های سالم نیز حضور دارند؛ ولی هم‌بستگی قوی ( $r=0.79$ ) که بین میزان مرگ‌ومیر و درصد پلاسماسل‌ها (سلول‌های سرطانی در مالتیپل میلوما) 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 نه تنها کاهش فعالیت سلولی دیده

4. Armirage JO, Longo DL. *Harrison's principles of internal medicine*. 16th ed. USA. McGraw-Hill companies, 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. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2003; 46(2): 139-63.

8. Ruan WJ, Lai MD, Zhou JG. Anticancer effects of chine 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 Effect 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, Cernele P, Podgornik H. Evaluation of multiple myeloma cell apoptosis in primary bone marrow samples. *Clinical laboratory*. 2013; 59(3-4): 389-95.

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

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

Roya Yaraee<sup>1\*</sup>, Mohammadreza Jalali Nadoushan<sup>2</sup>, Jalaeddin Shams<sup>3</sup>, Shaghayegh Tajik<sup>4</sup>

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.