اثرات سیتوژنتیک داروهای متوتروکسات و سیتارابین به تنهایی و توأم بر سلولهای لنفوسیتی بدخیم MOLT-4 در مراحل G1 و G2 چرخه سلولی

پیمان برادربکایی M.Sc.☆، حسین مزدارانی Ph.D.★♦

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر داروهای سیتارابین (ara C) و متوتروکسات (MTX)، که در شیمی درمانی انواع لوسمیها و دیگر سرطانها مورد استفاده دارند، بر مراحل مختلف چرخه سلولی سلولهای بدخیم و نامیرای MOLT-4 به تنهایی و توأم با مشاهده تغییرات کروموزومی در مرحله متافاز سلول.

* **مواد و روشها:** سلولهای نامیرای MOLT-4 در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ همراه با FCS، آنتی بیوتیکها و ال-گلوتامین کشت داده و نگهداری شد. در زمانهای مناسب، سلولها در مرحله G1 و یا مرحله G2 چرخه سلول تحت تأثیر سیتارابین و متوتروکسات با غلظتهای ۱۰۰μmol/L و ۵۰μmol/L به ترتیب در G1 و G2 قرار گرفتند. پس از متوقف کردن سلولها در مرحله متافاز، محصول برداری و تهیه لام میکروسکوپی با روش استاندارد انجام شد. لامها در گیسمای ۵ درصد رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری با درشتنمایی ۱۰۰۰× مورد بررسی قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهد که ara-C و MTX با غلظت ۱۰۰μmol/L در مرحله G1 فراوانی آسیبهای کروموزومی را تا حد زیادی افزایش می‌دهند، گر چه تعداد ناهنجاریهای ایجاد شده به وسیله araC بیشتر از MTX است. همچنین مشاهده شد اثر توأم این داروها در مرحله G1 سلولهای MOLT4 بسیار بیشتر از تأثیر هر یک به تنهایی است.

تأثیر داروها در مرحلهٔ G2 چرخه سلول با غلظت ۵۰μmol/L نیز با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P<0/05$). فراوانی آسیبهای کروماتیدی ایجاد شده به وسیله ara C در مرحله G2 بسیار بیشتر از MTX است. استفاده توأم داروها موجب افزایش قابل توجهی در ناهنجاریهای کروموزومی در مقایسه با مرحله G1 گردید.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج مبین آن است که این داروها بر سلولهای MOLT-4 اثری کلاستوژنیک دارند و در هر مرحله‌ای از چرخه سلول آسیب کروموزومی ایجاد می‌کنند. تأثیر توأم داروهای مورد استفاده در مرحله G1 اثری تجمعی را در مرحله G1 و اثری هم افزایی در G2 ایجاد می‌کند. علت آسیب پذیری بیشتر سلولها در مرحله G2 و حساسیت بیشتر آنها در این مرحله به تیمار دارویی، احتمالاً عدم فرصت کافی سلول برای ترمیم آسیبهای ایجاد شده در DNA و بیان آسیبها در مرحله میتوز به صورت ناهنجاریهای کروماتیدی است.

گل واژگان: مراحل چرخه سلول، ردهٔ سلولی MOLT-4، سیتارابین، متوتروکسات، آسیبهای کروموزومی

مقدمه

سرطان عارضه‌ای است که به علل مختلف از جمله عوامل وراثتی، پرتوهای یونساز، عوامل محیطی و شیمیایی ایجاد می‌شود که طی آن رشد و تکثیر سلولها از کنترل طبیعی خارج می‌شود. برای درمان آن از روشهای مختلفی استفاده می‌شود و به دلیل عدم موفقیت بسیاری از روشهای مورد استفاده هنوز تحقیقات و بررسی‌ها در دستیابی به روش مناسب ادامه دارد. در میان همهٔ روشها، شیمی درمانی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. زیرا علاوه بر استفاده آن به تنهایی، همراه با دیگر روشها از جمله پرتودرمانی، پیوند مغز استخوان و جراحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مکانیزم عمل داروهای شیمی درمانی متفاوت است (۱، ۲) و بیشتر آنها در مرحله خاصی از چرخه سلول بیشترین اثر ژنوتوکسیک یا سیتوتوکسیک را بر جای می‌گذارند (۳). از جمله داروهایی که برای درمان انواع لوسمیها استفاده می‌شود، داروهای سیتارابین و متوتروکسات است (۴). این داروها از داروهایی است که متناسب با مرحله چرخه سلول عمل می‌کند. در عین حال هنوز بازدهٔ مناسب از این داروها حاصل نمی‌شود.

متوتروکسات یک آنتاگونیست اسید فولیک است که به جایگاه کاتالیتیک فعال دی هیدروفولات ردوکتاز[1] متصل می‌شود و در سنتز شکل احیاء شده که واحدهای تک کربنی را قبول می‌کند مداخله می‌نماید. عدم این کوفاکتور مانع سنتز تیمیدیلات نوکلئوتیدهای پورین وابسته آمینه‌های سرین و متیونین می‌شود. لذا موجب توقف سنتز DNA و RNA و پروتئین می‌شود (۵).

ara C یک باز دارندهٔ ترمیم پارگیهای دو رشته DNA[2] است (۶) و نشان داده شده است که فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی را در لنفوسیتهای تابش دیده در مرحله G2 و رده‌های فیبروبلاستی سالم و مشتق شده از سلولهای اتاکسی تلانژکتازی[3] را در مرحله G2 افزایش می‌دهد (۷، ۸). بررسیهای زیادی برای استفاده توأم داروهای مختلف و بهبود تأثیر آنها صورت گرفته است (۲، ۹). و در بسیاری از این مطالعات از ردهٔ سلولی MOLT-4 استفاده شد. برای مثال، تأثیر جنیستین[4] بر چرخهٔ سلول لنفوسیت نرمال و بدخیم MOLT-4 (۱۰)، استوراسپورین[5] در مرحله G2 چرخه سلول سلولی Molt-4 (۱۱) و نیز سینرژیسم بین فلاپیریدول[6] و بسیاری از داروهای شیمی درمانی مورد بررسی قرار گرفت (۹). مشخص شد که کامپتوتسین[7] که یک داروی ممانعت کنندهٔ فعالیت آنزیم توپوایزومراز I می‌باشد بر سلولهای لنفوسیتی بدخیم MOLT-4، HL-60 و L1210 موثر است (۱۲). بررسیهای بیشتر انجام شده با داروهای تنیپوزاید[8] و متانسولفان[9] داد که این داروها بیشترین تأثیر را در مرحلهٔ چرخه سلول اعمال می‌کنند (۳). مطالعات انجام شده به وضوح نشان مبین تأثیر و مکانیزم متفاوت داروهای مختلف به ویژه زمانی که به صورت توأم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در تحقیق حاضر تأثیر داروهای araC و MTX به تنهایی یا به صورت توأم در مراحل G1 و G2 چرخه سلولی سلولهای بدخیم و نامیرای MOLT-4 با بررسی ناهنجاریهای کروموزومی در مرحله میتوز مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

سلولهای نامیرای رده سلولی MOLT-4 از نوع لوسمی حاد لنفوسیت T از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران در فلاسک کشت حاوی RPMI-۱۶۴۰ و ۱۵ درصد سرم جنینی گاو (FCS)[10] تهیه گردید. این سلولها به طور مرتب در چرخه سلولی قرار گرفته و به طور نامحدود تکثیر می‌شوند.

برای کشت این سلولها از محیط RPMI-۱۶۴۰ (Sigma) همراه با ۱۵ درصد FCS(Gibco)، آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین ۱۰۰iu/ml و استرپتومایسین)، ۱۰۰μg/ml وال- گلوتامین استفاده شد. به منظور حفظ رشد نمایی سلولها، سلولها هفته‌ای دوبار پاساژ داده و محیط کشت کامل جدید در اختیار سلولها قرار داده می‌شد.

* تیمار دارویی

از داروهای متوتروکسات (EBEWE) و سیتارابین (UP.John) که در RPMI-۱۶۴۰ فاقد FCS رقیق شده و در دمای ۲۰°c نگهداری شد، برای تیمار سلولها در مراحل G1 و G2چرخه سلول استفاده شد.

تعداد ۱۰۶ سلول در ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت (شمارش با لام نئوبار انجام شد) در ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کامل RPMI-۱۶۴۰ کشت داده شد. درصد زنده بودن سلولهای MOLT-4 به وسیله رنگ تریپان بلو تعیین گردید و در تمامی موارد بیش از ۹۰ درصد بود (۱۳). برای هر آزمایش از دو ظرف کشت استفاده شد. برای بررسی اثر داورها در مرحله G1 سلولهای MOLT-4، ۱۰۰μmol/L به محیط کشت اضافه شد و سلولها به مدت سه ساعت در دمای ۳۷°c انکوباتور در معرض داروها قرار گرفتند. پس از سه ساعت داروها به وسیلهٔ سانتریفیوژ از دسترس سلولها خارج شده و محیط کشت تازه به ظرف کشت افزوده شد. ۲۲/۵ ساعت پس از تیمار سلولها، ۵۰μl کلسمید با غلظت نهایی ۰/۱μg/ml به محیط کشت اضافه شد و ۱/۵ ساعت پس از آن محصول برداری به عمل آمد. در این روش سلولهایی در مرحله متافاز مورد بررسی قرار می‌گیرند که در زمان تیمار داروها در مرحله G1 چرخه سلولی بوده‌اند.

برای مشاهده آسیبها در مرحله G2، سلولهای کشت شده سه ساعت قبل از محصول برداری تحت تأثیر ۵۰μmol/L از هر یک از داروها و یا به صورت توأم قرار گرفتند. برای توقف سلولها در مرحله متافاز از کلسمید با غلظت نهایی ۰/۱μg/mL استفاده شد.

1. Dihydrofolate Reductase
2. Double Strand Break
3. Ataxia Telangiectasia
4. Genistein
5. Staurosporine
6. Flavopiridol
7. Camptothecin
8. Teniposide
9. Methanesulfon
10. Fetal Calf Serum

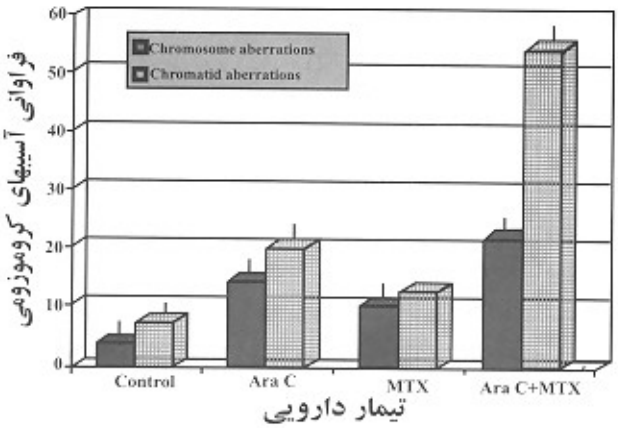
* محصول برداری

پس از توقف سلولها در مرحله متافاز به وسیله کلسمید، محتویات ظرفهای کشت به لوله سانتریفوژ منتقل و به مدت ۸ دقیقه و با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محیط روی سلولها، سلولها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض شوک هیپوتونیک (۰/۰۷۵M KCl) قرار گرفتند. پس از برداشتن KCl با سانتریفیوژ مجدد، سلولها در محلول کارنوی (Carnoy´s Fixative) متشکل از متانول و اسیداستیک گلاسیال (۱:۳) تثبیت شدند. شستشوی مجدد، سلولها در محلول کارنوی متشکل از متانول و اسید استیک گلاسیال (۱:۳) تثبیت شدند. شستشوی سلولها در محل فیکساتیو برای دو بار دیگر تکرار شد. سلولها به صورت معلق سوسپانسیون در محلول فیکساتیو تازه بر روی لامهای سرد و خیس و کاملاً تمیز، پرتاب و در هوای اتاق خشک شد. لامهای تهیه شده در محلول گیمسای ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری معمولی با درشتنمایی ۱۰۰۰× بررسی گردید. برای هر نمونه حداقل تعداد ۱۰۰ سلول متافازی با توزیع مناسب مورد مطالعه قرار گرفت (۱۴). برای بررسی اثر داروها در مرحله G1 انواع آسیبهای کروموزومی (شکست ساده، دی‌سانتریک و حلقه) و برای تأثیر آنها در مرحله G2 انواع آسیبهای کروماتیدی (حذف و تبادل) شمارش و ثبت گردید. محاسبات آماری با استفاده از آزمون کای‌دو (χ^2) انجام شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تأثیر داروهای ara-C و MTX با غلظت ۱۰۰μg/ml در مرحله G1 در جدول ۱ و با غلظت ۵۰μmol/L در مرحله G2 در جدول ۲ خلاصه و مقایسه اثرات مشاهده شده در دو مرحله در شکل ۱ نشان داده شده است.

تعداد آسیبهای کروموزومی و شکستهای کروماتیدی ایجاد شده در سلولهای MOLT-4 پس از تیمار با ara-C تا حد قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های شاهد است، که تفاوت از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P<0/05$). علیرغم استفاده از غلظت کمتر دارو در مرحله G2 فراوانی آسیبهای کروماتیدی مشاهده شده بیشتر از آسیبهای کروموزومی ایجاد شده در G1 بوده است.



نمودار ۱: مقایسه فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی ایجاد شده، در مراحل G1 و G2 چرخه سلول پس از تیمار با ara-C و MTX و ترکیب ara-C+MTX دُز دارویی مورد استفاده در مرحله G1، ۱۰۰μmol/L و در مرحله G2، ۵۰μmol/L بوده است.

نتایج نسبتاً مشابهی از تأثیر داروهای MTX در مراحل G1 و G2 حاصل شد اما در مجموع تعداد آسیبهای کروموزومی مشاهده شده کمتر از تأثیر ara-C بر سلولها MOLT-4 است (جداول ۱ و ۲). اثر توأم داروهای ara-C و MTX با غلظت ۱۰۰μmol/L در مرحله G1 و ۵۰μmol/L در مرحله G2 نشان داد که تعداد آسیبهای ایجاد شده در مرحله G1 ۲۲ و فراوانی آسیبها در مرحله G2 ۵۶ بود که تفاوت از نظر آماری کاملاً معنی دار است ($P<0/001$). بنابراین اگرچه دُز دارویی مورد استفاده در مرحله G1 دو برابر دُز در مرحله G2 بود ولی میزان آسیبها در مرحله G2 بسیار بیشتر بوده است. بنابراین مرحله G2 حساسیت بسیار بیشتری نسبت به مرحله G1 نشان می‌دهد (نمودار ۱).

جدول ۱: فراوانی ناهنجاریهای کروموزمی در سلولهای MOLT-4 ناشی از تیمار با داروهای ara-C و MTX در مرحله G1 چرخه سلول

تیمار دارویی	تعداد متافازهای بررسی شده	آسیبهای کروموزومی			مجموع آسیبها	آندیس میتوزی
		شکاف	شکست ساده	تبادل	SE±	SE±
کنترل	۱۰۰	۱±۱	۲±۱	۰	۳±۱	۶±۰/۱
ara-C ۱۰۰μmol/L	۱۰۰	۱±۰	۱۱±۲	۲±۱	۱۲±۲	۵/۶±۰/۲
MTX ۱۰۰μmol/L	۱۰۰	۱±۱	۷±۱	۲±۱	۱۰±۱	۵/۸±۰/۱
(۱۰۰μmol/L هر یک) ara-C+MTX	۱۰۰	۳±۱	۱۷±۱	۲±۱	۲۲±۲	۴/۷±۰/۳

جدول ۲: فراوانی آسیبهای کروماتیدی در سلولهای MOLT-4 پس از تیمار با ara-C و MTX در مرحله G2 چرخه سلول

تیمار دارویی	تعداد متافازهای بررسی شده	آسیبهای کروماتیدی			مجموع آسیبها	آندیس میتوزی
		شکاف	حذف	تبادل	SE±	SE±
کنترل	۱۰۰	۰	۷±۱	۰	۷±۱	۴/۸±۰/۲
ara-C ۵۰μmol/L	۱۰۰	۲±۱	۱۸±۲	۰	۲۰±۳	۴±۰/۲
MTX ۵۰μmol/L	۱۰۰	۲±۱	۱۱±۱	۰	۱۳±۱	۴/۲±۰/۶
(۵۰μmol/L هر یک) ara-C+MTX	۱۰۰	۵±۱	۵۱±۳	۰	۵۶±۴	۲/۸±۰/۱

بحث

جداول ۱ و ۲ و نیز شکل ۱ نشان می‌دهد که حساسیت کروموزومی سلولهای MOLT-4 به آسیبهای ناشی از ara-C و MTX در مرحله G2 چرخه سلول بیشتر است. آسیبهای کروموزمی ناشی از تغییراتی است که این داروها در مولکول DNA ایجاد می‌کنند، بنابراین احتمالاً وابسته به دُز باشد. از این رو نشان داده شد که افزایش دُز مورد استفاده منجر به آسیبهای بیشتری می‌شود (۱۵، ۱۶). بررسی‌های انجام شده مبین آن است که مرحله G1 چرخه سلول طولانی‌تر از مرحله G2 است (۳ تا ۳/۵ برابر) (۱۷، ۱۸). اگر آسیب اولیه‌ای در مولکول DNA در سلولی در مرحله G2 ایجاد شود، مدت زمان طولانی این مرحله (۱۲-۱۰ ساعت) باعث می‌شود سلول تحت تأثیر فرایندهای ترمیم آسیبهای وارده را ترمیم نماید. اما زمان G2 بسیار کوتاهتراست (۴-۳ ساعت).

بنابراین سلول فرصت کافی برای ترمیم آسیبها نخواهد داشت. در عین حال آسیبهای ایجاد شده در مرحله G1 از این فرصت نیز برخوردارندکه درطی گذر از مراحل دیگر چرخه سلول مانند مرحله S یا مرحله G2 ترمیم شوند.

عدم فرصت کافی برای ترمیم آسیبها می‌تواند یکی از دلایل حساسیت بیشتر سلولها در مرحله G2 به عوامل شیمیایی باشد (۱۷، ۱۸) (نمودار ۱).

اگر اثر مشاهده شده برای تأثیر توأم داروهای ara-C و MTX در مرحله G1 تقریباً معادل اثر هر یک از آنها به تنهایی باشد اثر هم افزایی در نظر گرفته می‌شود (۱۹). چنانکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود میزان آسیبهای کروموزومی ایجاد شده در مرحله G2 با داروی ara-C معادل ۲۰ و MTX معادل ۱۳ می‌باشد، در حالی که استفاده توأم آنها منجر به تعداد آسیبهای معادل ۵۶ گردید و این اثر یک اثر هم افزایی است.

یافته‌های این تحقیق مشابهت زیادی با یافته‌های دیگر محققین مبنی بر استفاده از داروهای مختلف و ردهٔ سلولی MOLT-4 یا استفاده از دیگر سلولها دارد (۵، ۱۰، ۱۹) لذا به وضوح نشان می‌دهدکه اثر این داروها می‌تواند وابسته به مرحلهٔ چرخه سلول باشد (۳).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهدکه داروهای ara-C و MTX هر دو از عوامل مستعد و بالقوه ایجادکنندهٔ ناهنجاریهای کروموزومی هستند. اما تأثیر آنها در مرحله G2 چرخه سلول بیشتر از مرحله G1 است. استفاده توأم این دو دارو در مرحله G1 منجر به ایجاد اثر تجمعی و استفاده توأم آنها در مرحله G2 به ایجاد اثر هم افزایی می‌انجامد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی امور پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از آقای دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله به خاطر حمایت و اظهار نظرهای ارزنده ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Hittleman WN, Cheong N, Shon HY, Lee JS, Tigavd JD, Vadhan-Raj S: Tumorigenesis and tumor response: view from the prematurely condensed chromosome. In: Chromosomal aberrations, Obe G and Natarajam AT (des); 1990; 101-113

2. Zhang R, Christopherson DI: Metabolic effects of thiopurine derivatives againts huamn CCRF-CEM leukemia cells. Int J Biochem and cell Biology; 30: 885-895-1198

3. Giacinata DB, Zbigniew DZ: Campothecin, teniposide, or 4´-(9´-acridiny)-3- methanesulfon- m-anisidide, but not mitoxantrone or Doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S-phase of HL-60 cells. Cancer Res; 1991; 51: 1165-1169

4. Richard LG, Bithell C, Foerster J, Athens W, Lukens J: Wintrobe´s clinical hematology. Vol 2, London: Malvern Ins; 1993; pp: 1854-1993

5. Willimore E, Frank A, Padget K, Tibly M, Austin C: Etoposid targets topoisomerase IIa and IIß in leukemic cells. Molecular pharmacology; 1998; 53: 78-85

6. Iliakis G, Bryant PB: Effect of nucleoside analogues are- A and ara-C on the growth and repair of both potentially lethal damage and DNA double strand breaks in mammalian cells in culture. Anticancer Res, 1983; 3: 143-150

7. Holmberg M, Gumauskas E: The role of short lived DNA lesions in the production of chromosome exchange aberrations: Mutation Res; 1986; 160: 221-229

8. Mozdarani H, Bryant PE: Cytogenic response of normal human and ataxiat elangiectasia G2 cells exposed to X-rays and ara-C. Mutation Res; 1989; 226: 223-228

9. Keith C, Bible S, Cott H, Kau RM: Cytotoxic synergy between flvropiridol and various antinepolastic agents: the importance of sequence of administration cancer. Res; 1997; 57: 3375-3380

10. Traganos F, Ardelt B, Halko N, Bruno S, Darzynkiewics Z: Effects of Genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. Cancer Research; 1992; 52: 6200-6208

11. Traganos F, Gong J, Ardelt B, Darzunkiewicz Z: Effect of staurosporine on MOLT-4 cell progression through G2 and on cytokinesis. J Cellular Physiology. 1994; 158: 535-544

12. Delbino G, Skierski JS, Darsynkiewicz Z: Diverse effects of camptothecin and inhibitor of camptothecin

and inhibitor of topoisomerase I on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-4) and myelogenous (HL60, KG1) leukemic cells. Cancer Research; 1990; 50: 5746-5750
13. Abel G, Schimmer O: Induction of structural chromosome aberrations and sister chromatid exchange in human lymphocyte in vitro by Aristolochic acid. Human Genetics; 1983; 64: 131-133
14. Rooney DE, Czepulkowski BH: Human cytogenetics a practical approach. Vol 2. Oxfrod University Press. 1992; 189-208
15. Little Fiedl G, Colyer SP, Sayer AM, Pufrain RJ: Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed during G0 to four classes of DNA damaging chemical. Mutation Research; 1979; 67: 259-269
16. Mosilova J, Michalova K, Pacovsky V: Induction of sister chromatid exchange by mitomycin C inlymphocytes of toung and old human donors. Nerontology; 1984; 30: 365-370
17. Russell PJ: Genetics; Wesley Longman Inc; California; pp: 1998; 47-58
18. Lewin B: Genes IV; Oxford University Press. 1998;630-655
19. Khilman BA, Anderson HC: Synergistic enhancement of the frequency of chromatid aberrations in cultured human lymphocytes by combination of inhibitors of DNA repair. Mutation Research; 1985; 313-325