

اثر سینرژیک اینترفرون گاما با داروهای شیمی درمانی روی KE-37

جواد آراسته^۱، علی اکبر پورفتح‌اله^۲، دکتر سیدمحمد مؤذنی^۱، مسعود سلیمانی^۲

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون شناسی

چکیده

استفاده همزمان از مواد مؤثر بر پاسخ‌های بیولوژیک و داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی باعث افزایش کارایی و کاهش اثرات جانبی روشهای درمانی سرطان می‌گردد. هر چند مکانیسم دقیق واکنش بین این دو دسته از داروها به خوبی روشن نیست. اینترفرون گاما یکی از مدولاتورهای بیولوژیک می‌باشد که باعث افزایش تمایز و کاهش تکثیر سلولهای سرطانی می‌گردد و با داروهای ضد سرطان اثر سینرژیک دارد.

در این تحقیق با استفاده از رده سلولی KE-37 منتج شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع T به بررسی اثر هم‌افزایی اینترفرون گاما با بعضی از داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی پرداختیم.

ابتدا رده سلولی مذکور در فلاسک سلول کشت داده شد و سپس به پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای منتقل گردید. دزهای مختلف داروهای وین کریستین، متیل پردنیزولون و دونوروپیسین به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و میزان ۱۰۰ IU/ml اینترفرون گاما به محیط کشت سلولها در فواصل زمانی مختلف (ساعات صفر، ۸، ۳۶ و ۶۰) اضافه شد. اثر سینرژیک این داروها و اینترفرون گاما با استفاده از بررسی میزان تکثیر سلولها با روش سنجش MTT ارزیابی گردید. نتایج بدست آمده، مؤید اثر سینرژیک اینترفرون گاما با وین کریستین، متیل پردنیزولون و دونوروپیسین می‌باشد. بدین ترتیب که اینترفرون گاما اثر سیتوتوکسیک و یا سیتواستاتیک داروهای مذکور را افزایش داده و این افزایش از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$) علاوه بر این اضافه کردن اینترفرون گاما در ساعات ۳۶ و ۶۰ نسبت به ساعات صفر و ۸ پس از اضافه نمودن دارو در جلوگیری از رشد و تکثیر سلولها مؤثرتر می‌باشد ($P < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: اینترفرون گاما، رده سلولی، شیمی‌درمانی

مقدمه

را با افزایش کارایی و کاهش اثرات جانبی و سمی پیشنهاد می‌کند. مکانیسم واکنش این تعدیل کننده‌های بیولوژیک با خودشان و با عوامل شیمی‌درمانی هنوز به طور کامل روشن

شیمی‌درمانی ترکیبی به طور شایع در درمان لوسمی استفاده می‌شود. کاربرد تعدیل کننده‌های پاسخ بیولوژیک در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی روش درمانی جدیدی

نشده است.

در این تحقیق از رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T انسانی شامل ، KE-37 که از بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد جدا شده است [۴] استفاده گردید، این رده سلولی از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه شد.

ج) کشت سلول

ابتدا رده سلولی KE-37 در محیط کشت RPMI 1640 (Sigma) حاوی ۱۰۰ U/ml پنی سیلین (Sigma) و ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین (Sigma) و ۱۰ درصد FCS (جهاد دانشگاهی) در فلاسک کشت سلول (Nunc) و در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شد. بعد از کشت سلول زمانی که تعداد سلولها به حد مورد نظر رسید انتقال سلول از فلاسک به پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول (Nunc) انجام گردید، بدین ترتیب که به هر چاهک پلیت کشت سلول ۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰^۶ cell/ml اضافه شد. غلظت‌های مختلف داروهای متیل پردنیزولون (Upjohn)، وین کریستین (Gedeon Richter LTD) و دونورویسین (Farmitalia carlo erba) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. از هر دارو ۶ غلظت دارویی انتخاب گردید، بدین ترتیب که برای متیل پردنیزولون از غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۲۵۰، ۱۲۵۰، ۲ و ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر (با ضریب رقت ۵)، وین کریستین از غلظت‌های ۲۵۰، ۶۲/۵، ۱۵/۵، ۳/۹، ۰/۹۵ و ۰/۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر (با ضریب رقت ۵) و دونورویسین از غلظت‌های ۱۰، ۲/۵، ۰/۶۲۵، ۰/۱۵۵، ۰/۳۵ و ۰/۰۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (با ضریب رقت ۴) مورد استفاده قرار گرفت [۵].

د) سنجش MTT

به منظور بررسی تأثیر ترکیب IFN-γ و داروهای شیمی درمانی بر سلولهای سرطانی به روش سنجش MTT،

IFN-γ نیز یکی از این تعدیل کننده‌های بیولوژیک است که دارای فعالیت ضد تکثیری و خاصیت تمایزی روی سلولهای لوسمی می‌باشد و همچنین با عوامل ضد لوسمی اثر سینرژیک دارد [۱].

ایتترفرون گاما گلیکوپروتئینی مونومر با وزن مولکولی ۲۵-۲۰ کیلو دالتن و با خصوصیات چند عملکردی (Multifunctional) است که از سلولهای T و سلولهای NK (Natural Killer cell) ترشح می‌شود. IFN-γ در ابتدا توسط فعالیت ضد ویروسی آنها در دهه ۱۹۶۰ شناسایی شد. طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی در مورد IFN-γ بصورت In vitro مشاهده شده که عبارتند از:

فعالیت ضد تکثیری روی سلولهای توموری بصورت In vitro و در مدل‌های حیوانی، القاء آنتی‌ژن‌های MHC کلاس ۱ و ۲، القاء سنتز و ترشح TNF، IL-2، IFN-α و IFN-β، فعال کردن ماکروفاژها، القاء ترشح ایمنوگلوبولین توسط سلولهای B و افزایش تکثیر و بلوغ سلول B، افزایش فعالیت سلولهای NK، تنظیم فعالیت‌های سیتوکاین‌ها از طریق القاء سنتز سیتوکاین و سینرژیسیم (Synergism) با سیتوکاین‌ها. فعالیت IFN-γ از طریق واکنش با گیرنده ویژه سطح سلول صورت می‌گیرد، تعداد گیرنده‌های سطح سلول معمولاً کم بوده و در اکثر موارد از چند صد تا چند هزار در هر سلول می‌باشد [۳ و ۲].

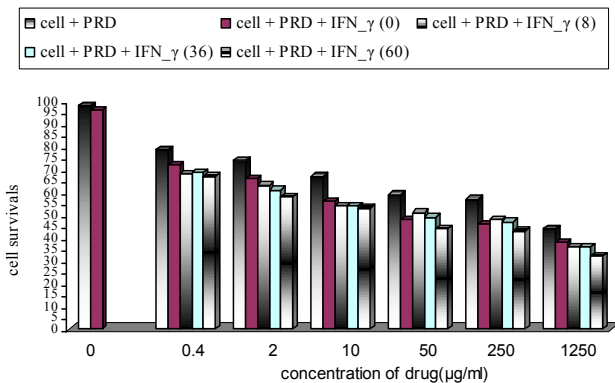
مواد و روش‌ها

الف) تهیه محلول MTT

۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT (Sigma) در ۱۰ میلی‌لیتر PBS حل شد و با فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل گردید. این محلول تا زمان استفاده در فریزر ۲۰°C- نگهداری گردید.

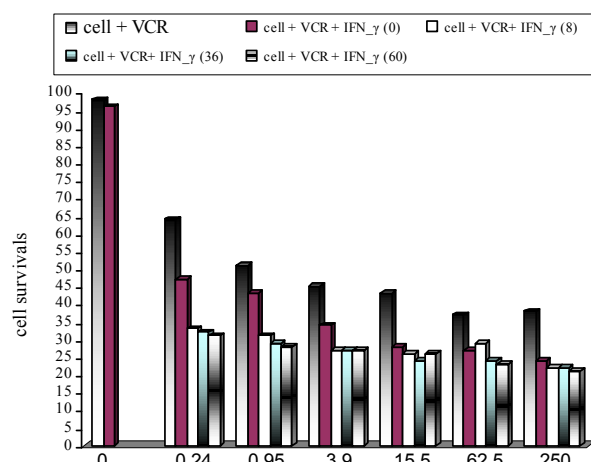
ب) رده سلولی مورد استفاده

هر میلی لیتر روی این رده سلولی نشاندهنده کاهش بیشتر درصد سلولهای زنده (Viability) می باشد ($P < 0.05$) و همچنین میزان LC_{50} (غلظتی از دارو که سبب مرگ ۵۰ درصد سلولها می گردد) در مورد این دارو حدود ۱۲۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه تأثیر فاصله زمانی بر اثر هم افزایی $IFN-\gamma$ و متیل پردنیزولون در رده سلولی KE-37

اثر $IFN-\gamma$ با داروی وین کریستین با غلظت های ۰/۲۴ ، ۰/۵۹ ، ۳/۹ ، ۱۵/۵ ، ۶۲/۵ ، ۲۵۰ میلی لیتر بر روی این رده سلولی نیز مشخص شد که سبب افزایش فعالیت سیتوتوکسیستی این دارو بر سلولهای سرطانی می شود . ($P < 0.05$) و میزان LC_{50} در مورد این دارو حدود ۱۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (نمودار ۲).



بعد از انتقال ۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به هر چاهک پلیت کشت سلول، ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف دارو و ۱۰۰ IU/ml اینترفرون گاما (Boehringer - GmbH) در ساعات صفر ، ۸ ، ۳۶ و ۶۰ به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید (تست ها به صورت دوتایی مورد آزمایش قرار گرفت). چاهکی که تنها شامل محیط کشت و فاقد سلول بود به عنوان Blank دستگاه الیزا ریدر انتخاب شد. چاهکهایی که فقط شامل سوسپانسیون سلولی بودند به عنوان کنترل انتخاب شدند و چاهکهائی که شامل سوسپانسیون سلولی و $IFN-\gamma$ بود جهت بررسی اثر $IFN-\gamma$ بر سلولهای لوسمیک استفاده شد.

سپس پلیت های کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. مدت زمان انکوباسیون چهار روز انتخاب شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک پلیت کشت سلول ، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و به مدت ۶ ساعت انکوبه گردید. سپس به هر چاهک حدود ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (۰/۴ N HCl) اضافه کرده و محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط شدند. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت [۶].

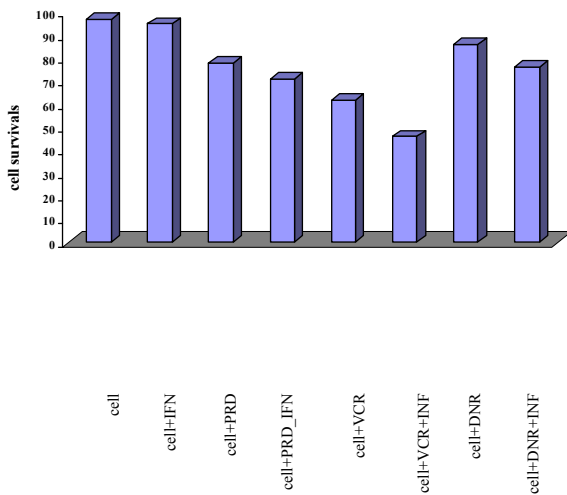
نتایج

نتایج حاصل از تأثیر $IFN-\gamma$ بر رده سلولی KE-37 نشان داد که $IFN-\gamma$ به تنهایی تأثیر چندانی بر رده سلولی مذکور ندارد . ولی در مورد اثر ترکیبی $IFN-\gamma$ با داروهای متیل پردنیزولون ، وین کریستین و دونوروبیسین بر روی این رده سلولی نتایج زیر بدست آمد :

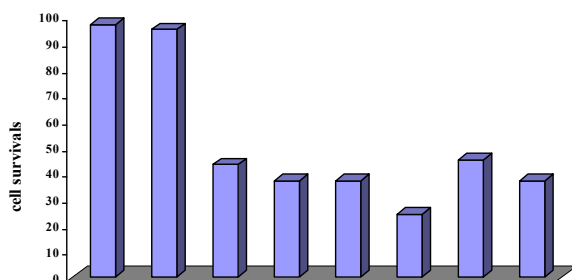
تأثیر $IFN-\gamma$ با داروی متیل پردنیزولون با غلظت های ۱۲۵۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰ ، ۱۰ ، ۲ و ۰/۴ میکروگرم در

نمودار ۳- مقایسه تأثیر فاصله زمانی بر اثر هم‌افزایی IFN- γ و دونوروبیسین در رده سلولی KE-37

در مقایسه ای که بین غلظت های پایین داروهای متیل پردنیزولون (0/4 μ g/ml)، وین کریستین (24 μ g/ml) و دونوروبیسین (0/0095 μ g/ml) و همچنین غلظت های بالای متیل پردنیزولون (1250 μ)، وین کریستین (250 μ g/ml) و دونوروبیسین (10 μ g/ml) از نظر میزان تأثیر بر روی این رده سلولی صورت گرفت، نتایج بدست آمده نشان داد که داروی وین کریستین چه هنگامی که به تنهایی و چه همراه با IFN- γ استفاده می شود نسبت به متیل پردنیزولون و دونوروبیسین باعث کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده می گردد (نمودارهای ۴ و ۵).



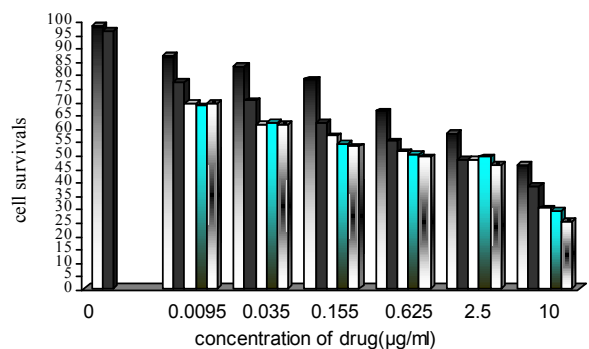
نمودار ۴- مقایسه غلظت های بالای متیل پردنیزولون، وین کریستین و دونوروبیسین بر رده سلولی KE-37



نمودار ۲- مقایسه تأثیر فاصله زمانی بر اثر هم‌افزایی IFN- γ و وین کریستین در رده سلولی KE-37
تأثیر IFN- γ با داروی دونوروبیسین با غلظت های 10، 2/5، 0/625، 0/155، 0/035 و 0/0095 میکروگرم در هر میلی لیتر نیز نتایج مشابهی بدست آمد و مشخص شد که این اثر سینرژیک باعث کاهش درصد سلولهای زنده می گردد که از لحاظ آماری این کاهش معنی دار می باشد ($P < 0.05$) و میزان LC_{50} در مورد این دارو نیز 0/95 میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (نمودار ۳).

Legend for Figure 5:

- cell + DNR
- cell + DNR + IFN $_{\gamma}$ (0)
- cell + DNR + IFN $_{\gamma}$ (8)
- cell + DNR + IFN $_{\gamma}$ (36)
- cell + DNR + IFN $_{\gamma}$ (60)



تشکیل کلنی سلول‌های HL60 همچنین سلول‌های پروژنیاتور CML را مهار می‌کند [۷].

Elias و همکاران نیز عنوان کردند که رشد سلول HL 60 همچنین در حضور $\text{IFN-}\gamma$ و 5-FU کاهش می‌یابد [۹]. Margolin و همکاران نیز نشان دادند که همانند 5-FU، سیتوتوکسیستی سیس پلاتین (Cisplatin) در محیط *In vitro* همراه به IFN افزایش می‌یابد [۱۰].

Yoneda و همکاران عنوان کردند که اینترفرون با داروهایی مانند بلنومایسین (Bleomycin)، آدریامایسین (Adriamycin) و وین کریستین، با تأثیر روی غلظت داخل سلولی آنها واکنش می‌دهند [۱۱].

نتایج حاصل از آزمایشات ما نیز حاکی است که ترکیب $\text{IFN-}\gamma$ با داروهای مورد تحقیق باعث کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده می‌گردد که این اثر $\text{IFN-}\gamma$ بر داروهای متیل پردنیزولون، وین کریستین و دونوروبیسین ممکن است از طریق افزایش غلظت داخل سلولی این

داروها و یا از طریق تعدیل و تنظیم فعالیت آنزیم‌های مربوط به متابولیسم این داروها صورت گیرد.

نتایج دیگر نشان داد که اضافه کردن $\text{IFN-}\gamma$ در ساعات زمانی ۳۶ و ۶۰ پس از کشت نسبت به زمانی که $\text{IFN-}\gamma$ بلافاصله و ۸ ساعت بعد اضافه می‌شود، کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده مشاهده می‌گردد. این نتایج با یافته‌های آقای Novelli و همکاران هماهنگ است آنها در مطالعه‌ای که بر روی رده‌های سلولی ژورکت (Jurkat)، PF382 و ST4 (رده‌های سلولی T بدخیم) (Malignant T-cell lines) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مجاورت این سلول‌ها با داروهای شیمی‌درمانی آنتی‌بلاستیک (Antiblastic) اتوپسید، سیس پلاتین، سیتارابین (Cytarabin) و دائونومایسین (Daunomycine) باعث افزایش تعدیلی بیان

cell
cell+IFN
cell+PRD
cell+PRD_IFN
cell+VCR
cell+VCR+INF
cell+DNR
cell+DNR+INF

نمودار ۵- مقایسه غلظت‌های پایین متیل پردنیزولون، وین کریستین و دونوروبیسین بر رده سلولی KE-37

همچنین نتایج نشان داد که اضافه کردن $\text{IFN-}\gamma$ در ساعات زمانی ۳۶ و ۶۰ پس از کشت نسبت به زمانی که بلافاصله و ۸ ساعت بعد اضافه می‌شود کاهش بیشتری در درصد سلولهای زنده مشاهده می‌گردد ($P < 0.05$) (نمودارهای ۱ و ۲ و ۳).

بحث

تحقیق در مورد اثرات ضد لوسمی $\text{IFN-}\gamma$ در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی در حال بررسی است. کافکا

(Kafka) و همکاران نشان دادند که فعالیت Ara-c (سیتوزین آرابینوزید) (Cytosine arabinoside) روی سلولهای HL60 و سلولهای پروژنیاتور (Chronic granulocytic leukemia) CGL (لوسمی گرانولوسیتی مزمن) توسط $\text{IFN-}\gamma$ تقویت می‌گردد [۷]. همچنین هاریسون (Harrison) و همکاران به این نتیجه رسیدند که پاسخ سلول‌های لوسمیک P388 موشی به ترکیب $\text{IFN-}\gamma$, Ara-C, بیشتر از Ara-C به تنهایی می‌باشد [۸].

کافکا و همکاران همچنین اثر ترکیبی قابل توجهی را وقتی $\text{IFN-}\gamma$ همراه با FU-5 (5-Fluorouracil) استفاده می‌شد، مشاهده کردند این ترکیب نشان داد که به صورت سینرژیک، تکثیر و

باعث افزایش بیان گیرنده IFN- γ در سطح سلول‌های KE-37 می‌شوند و هر چه از مجاورت این داروها با این سلول‌ها می‌گذرد بیان این گیرنده افزایش می‌یابد، بنابراین در زمانی که IFN- γ را در ساعات ۳۶ و ۶۰ اضافه می‌کنیم کاهش بیشتری در درصد سلول‌های زنده مشاهده می‌کنیم که این کاهش در ساعت ۶۰ پس از کشت به خوبی نشان داده شده است.

گیرنده IFN- γ در سطح این سلول‌ها می‌شود و هر چه زمان مجاورت این داروها با سلول‌ها بیشتر باشد میزان بیان گیرنده IFN- γ نیز بیشتر می‌شود به طوری که در ۷۲ ساعت پس از کشت، بیشترین میزان بیان این گیرنده وجود دارد [۱۲]. همچنین عنوان کردند که توانایی IFN- γ به القاء تکثیر یا آپتوز به بیان کم یا زیاد این گیرنده بستگی دارد [۱۳]. بنابراین شاید بتوان اینگونه اظهار نظر کرد که داروهای متیل پردنیزولون، وین کریستین و دونوروبیسین

منابع

- [1] Kafka M., Dvilansky A., Nathan I. Mechanism of interaction between interferon gamma and antineoplastic agent on the differentiation of HL-60 promyelocytic cells. *Exp. Hematol.*, 18(3): 153-8, 1990.
- [2] Drexler H.G., Zaborski M., Quentmeier H. Interferon-gamma induced proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Br. J. Haematol.*, 98: 699-710, 1997.
- [3] Watson R.B., Galvani D.W., Nash J.R., Cawley J.C. Gamma interferon receptor expression in haemic malignancies *Leuk. Res.*, 14: 657-660, 1990.
- [4] Carrel S. Monoclonal antibodies against idiotypic determinant (s) of the T cell receptor from HPB/All cells induce IL-2 production in jurkat cells without apparent evidence of binding. *Eur. J. Immunol.*, 16: 823-8, 1986.
- [5] Kaspers G.J.L. In vitro drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood. *Br. J. Cancer*, 64: 469-474, 1991.
- [۶] سلیمانی م.، پورفتح‌اله ع.، مؤذنی س. م. و کاویانی س. مقایسه روش‌های محرومیت از رنگ‌پذیری و رنگ‌سنجی تترازولیوم (MTT assay) جهت بررسی اثرات داروهای سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی. مجله پژوهشی حکیم، شماره ۳، دور اول، زمستان ۱۳۷۷.
- [7] Kafka M., Nathan I., Dvilansky A. New combination of 5-fluorouracil and interferon- γ effective against human myeloid leukemia in vitro. *Anticancer Res.*, 9: 1037-1040, 1989.
- [8] Harrison S.D., Evaluation of combinations of interferons and cytotoxic drugs in murine tumor models in vivo. *J. Biol. Response Mod.*, 9: 395-400, 1990.
- [9] Elias L., Crissman H.A. Interferon effect upon the adenocarcinoma 38 and HL-60 cell lines: antiproliferative responses and synergistic interaction with halogenated pyrimidine antimetabolites. *Cancer Res.*, 48: 4868-4873, 1988.
- [10] Pinedo H.M., Longo D.L., Chabner B.A. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers*, annual 15, Amsterdam: Elsevier, 1994.
- [11] Yoneda K., Yamamoto T., Osaki T. Enhanced cytotoxicity of antineoplasics by interferon. *Nippon Gan Chiryō Gokkaiishi*, 25: 77-84, 1990.
- [12] Novelli F., Allion A., Bernabei P., Rigamonti L., Forni G. Antitumor chemotherapy drugs up-modulate interferon gamma receptor on

human malignant T cells. *Cancer Detect. Prev.*, 21(2): 191-5, 1997.

[13] Novelli F.,. Envionmental signals influencing

expression of the IFN-gamma receptor on human T cells control whether IFN-gamma promotes proliferation or apoptosis. *J. Immunol.*, 152(2): 496-504, 1994.