مجلـه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۲, شمـــاره‌ی ۹۴, آذر و دی ۱۳۹۳, صفـحات ۲۲ تا ۳۳

بررسی اثر داروی ضد سرطانی پومالیدومید بر فعالیت حیاتی و القای آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان

شقایق تاجیک[۱]، دکتر محمد رضا جلالی ندوشن[۲]، دکتر جلال الدین شمس[۳]، دکتر رویا یارایی[۴]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده‌ی پزشکی، گروه ایمونولوژی ryaraee@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۱۱/۲۰ پذیرش: ۹۳/۴/۹

چکیده

زمینه و هدف: *پومالیدومید (Pomalidomide) - ترکیبی از دو داروی لنالیدومید (Lenalidomide) و تالیدومید (Thalidomide) - از جدیدترین داروهای ضد سرطانی می‌باشد. این دارو سبب القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود و چند مطالعه نیز حاکی از اثر ناچیز سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سالم خون محیطی است. با این حال از تاثیر توکسیک داروی پومالیدومید بر سلول‌های سالم مغزاستخوان که حاوی سلول‌های مهم ایمنی نیز هستند، هنوز اطلاع چندانی‌در دست نیست. در این مطالعه تاثیر داروی پومالیدومید بر سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *نمونه‌ها از افرادی است که با وجود نیاز به بررسی مغزاستخوان از لحاظ بالینی، نهایتا مشکل پاتولوژیک خاصی در لکوسیت‌های آن‌ها تشخیص داده نشد. از باقیمانده‌ی نمونه آسپیراسیون مغزاستخوان، سلول‌های تک‌هسته‌ای جداسازی شد. نیمی از سلول‌های تک‌هسته‌ای هر فرد با داروی پومالیدومید (با غلظت نهایی $10\mu M$) و نیمی دیگر بدون دارو (به‌عنوان گروه کنترل) کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون کشت سلولی، میزان فعالیت حیاتی (MTT) و میزان القای آپوپتوز (با رنگ‌آمیزی فلورسنت اتیدیوم بروماید و اکریدین اورنج) در سلول‌ها بررسی شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از کشت سلولی نشان داد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌های تک هسته‌ای مغزاستخوان در حضور داروی پومالیدومید افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ($P<0/05$). ولی میزان القای آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت.*

نتیجه‌گیری: *پومالیدومید تا حدودی سبب تحریک حیات و فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای مغزاستخوان سالم در بهبود و بقای آن‌ها می‌شود و علاوه برآن بر خلاف سایر داروهای ضد سرطانی هیچ اثر توکسیک یا القای آپوپتوزی روی این سلول‌ها نمی‌گذارد. بنابراین به نظر می‌رسد پومالیدومید می‌تواند داروی مناسبتری جهت اجتناب از اثرات جانبی داروهای ضد سرطانی روی سلول‌های سالم باشد.*

واژگان کلیدی: ***پومالیدومید، MTT، آپوپتوز، مغز استخوان، سلول‌های تک‌هسته‌ای***

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
۲- دکترای تخصصی پاتولوژی، استاد دانشگاه شاهد، تهران
۳- دکترای تخصصی هماتولوژی و انکولوژی، استادیار دانشگاه شاهد، تهران
۴- دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه شاهد، تهران

مقدمه

تالیدومید (Thalidomide) و آنالوگ‌های آن، از جمله داروهای مهم ضد سرطانی هستند. اثر درمانی داروی تالیدومید اولین بار با القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی و تنظیم منفی بیان مولکول‌های چسبان توصیف شد (۲و ۱). تالیدومید به‌عنوان یک عامل ضد توموری (ضد آنژیوژنز قوی) و ضد التهابی اثرات مفیدی را نشان داده است. آنالوگ‌های تالیدومید از داروهای جدید ضد سرطانی بوده، معروف به داروهای ایمونومدولاتوری یا IMiD (Immunomodulatory Drugs) هستند. پومالیدومید (Pomalidomide) جدیدترین نسل IMiD ها و ترکیبی از دو داروی لنالیدومید (Lenalidomide) و تالیدومید (Thalidomide) می‌باشد که سبب القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی و مهار آنژیوژنز می‌شود (۳و ۲). در مطالعه‌ای روی رده‌های سلولی لوسمی ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) کودکان نیز افزایش القای آپوپتوز و کاهش تکثیر سلول سرطانی در حضور داروی پومالیدومید مشاهده شده است (۴و ۳).

پومالیدومید نسبت به داروهای نسل قبل خود اثر ضدالتهابی بیشتری داشته، از طرف دیگر اثر سایتوتوکسیک کمتری بر سلول‌های سالم خون محیطی دارد (۸-۵). در مطالعاتی دیگر نیز نشان داده شد که داروی پومالیدومید بر سلول‌های خون محیطی ($TCD4^+$، $TCD8^+$) سبب القای سایتوکاین‌های IL2 و IFNγ از سلول Th1 و نیز IL5 و IL10 از Th2 می‌شود (۱۱-۹). در عین حال این دارو تاثیر توکسیک بر سلول‌های سرطانی مغز استخوان مبتلایان به مالتیپل میلوما داشته، سبب افزایش آپوپتوز این سلول‌ها می‌گردد (۷).

در بافت مغز استخوان سلول‌های مهم از جمله سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز سلول‌های خونی مختلف و سلول‌های بالغ ایمنی دیده می‌شوند. بخش مهمی از سلول‌های ایمنی موجود در مغزاستخوان در سلول‌های تک هسته‌ای آن حضور دارند. سلول‌های سرطانی در مالتیپل‌میلوما نیز پلاسماسل‌ها هستند که در مغزاستخوان حضور فراوانی دارند و آن‌ها نیز جزو سلول‌های تک‌هسته‌ای قرار می‌گیرند. با وجود چند مطالعه محدود روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون، تاکنون تاثیر توکسیک داروی پومالیدومید بر سلول‌های سالم و غیرسرطانی مغزاستخوان انجام نشده است. به دلیل اهمیت سلول‌های ایمنی موجود در مغزاستخوان (به‌ویژه سلول‌های تک‌هسته‌ای) به نظر می‌رسد بررسی تاثیر داروی پومالیدومید بر سلول‌های سالم (غیر سرطانی) مغزاستخوان پیش از ورود به خون محیطی قابل اهمیت باشد. لذا ما در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر داروی پومالیدومید را بر سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده از مغزاستخوان بررسی کنیم.

روش بررسی

تهیه‌ی دارو: داروی پومالیدومید (Pomalidomide) از شرکت آمریکایی Sigma Alderich (P0018) به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. دارو در DMSO ۰/۰۲درصد حل شد و با محیط کشت ۱۰ درصد RPMI-FBS به غلظت نهایی 10 میکرومول مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌گیری و انتخاب بیماران: پس از اخذ مجوز کمیته‌ی اخلاق پزشکی (به شماره 41/175269 تصویب شده در دانشگاه شاهد) جهت اجرای این طرح تحقیقاتی، افرادی که به بیمارستان مصطفی خمینی تهران مراجعه کرده و شرایط زیر را داشتند به عنوان افراد مورد مطالعه انتخاب شدند. افرادی که داروهای سرکوبگر ایمنی مصرف نکرده‌اند و یا سابقه‌ی عفونت یا بیماری نقص ایمنی نداشته‌اند در این مطالعه قرار گرفتند. این افراد به دلیل علایم کم‌خونی و یا مشکوک به سرطان خون، نیاز به بررسی آسپیراسیون مغزاستخوان داشتند. پس از بررسی آزمایشات مشخص شد خوشبختانه این افراد از لحاظ پاتولوژیک مغزاستخوان سالم بوده و مورد تایید متخصص پاتولوژی و انکولوژی قرار گرفتند، بنابراین به‌عنوان گروه نرمال در این مطالعه در نظر گرفته شدند. برای هر یک

از این افراد پرسش‌نامه و رضایت‌نامه تهیه شد. اطلاعات مربوط به شمارش سلول‌های خون محیطی از آزمایشات و پرونده‌ی بیمارستانی آن‌ها استخراج شد. محدوده‌ی سنی این افراد ۴۵ تا ۸۰ سال و تعداد آن‌ها ۱۴ نفر (۹ مرد و ۵ زن) بود. مراحل کار برای آن‌ها شرح داده شد و در صورت رضایت، از باقیمانده‌ی نمونه‌ی مغزاستخوان آن‌ها جهت انجام این پژوهش استفاده شد.

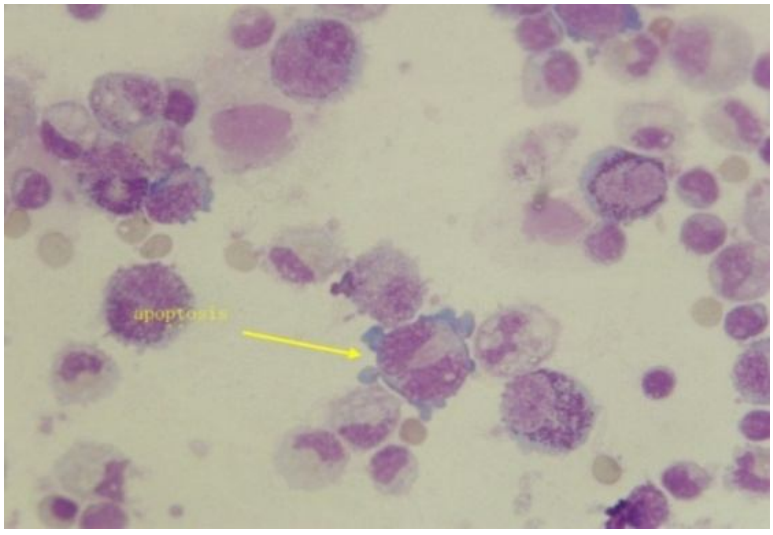
جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای از مغزاستخوان و کشت سلول‌ها: در انجام این پژوهش فقط از باقیمانده نمونه‌ی مغزاستخوانی که پزشک متخصص به دلیل نیاز بالینی تهیه نموده بود، استفاده شده است و نمونه‌ی جداگانه‌ای از افراد گرفته نشد. با این حال پس از اخذ رضایت نامه، نمونه‌ی آسپیراسیون مغز استخوان افراد مورد مطالعه تهیه گردید. سپس باقیمانده ی نمونه با ضد انعقاد هپارین مخلوط شد و در شرایط استریل و زیر هود لامینار به نسبت ۲:۱ با بافر PBS (PH=7.2) رقیق شد. محلول رقیق شده روی ۳ میلی‌لیتر محلول فایکول (Ficoll-Paque 1/077g/ml) به آرامی اضافه شد و با دور 2000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای 18 درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید (۱۳و ۱۲). حلقه‌ی بالایی محلول فایکول که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای بود و بر اساس تفاوت گرادیانت در این لایه قرار گرفته بودند، با سمپلر برداشته شد و به لوله‌ی فالکون استریل دیگر انتقال داده شد و 2بار با PBS مجددا در دور 1500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه شستشو انجام شد. سلول‌های هدف در این مطالعه کل سلول‌های تک هسته‌ای (مونونوکلئر) مغزاستخوان بود که پس از سانتریفوژ بالای محلول فایکول 1077 قرار گرفته بودند. سایر سلول‌ها (شامل پلی مورفونوکلئر و گلبول قرمز و ...) که زیر محلول فایکول قرار گرفته بودند، از مراحل انجام این مطالعه حذف شدند. به رسوب سلولی که فقط حاوی سلول‌های تک هسته‌ای بود، در آخرین مرحله‌ی شستشو ۱ میلی‌لیتر محیط ۱۰درصد RPMI-FBS اضافه شد. برای شمارش درصد سلول‌های زنده از رنگ تریپان بلو استفاده شد. بعد از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای، 15×10^4 سلول در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شد.

سنجش تحریک تکثیر سلولی با MTT (-3): 4,5Dimethylthiazilyl-2,5 diphenyltetrazoliumbromid

برای بررسی اثر تحریکی داروی پومالیدومید بر تکثیر و فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان افراد مورد مطالعه از تست MTT(Sigma) استفاده گردید. این آزمون بر اساس احیای MTT به نمک‌های رنگی فورمازان به کمک آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده تدوین شده است. 15×10^4 سلول تک‌هسته‌ای در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. به چاهک‌های ردیف تست ۱۰ میکرولیتر داروی پومالیدومید با غلظت ۱۰ میکرومول اضافه شد، ولی چاهک‌های ردیف کنترل تنها حاوی محیط کشت و سلول بودند (برای هر تست ۵ چاهک اختصاص یافت). حجم نهایی محیط در همه‌ی چاهک‌ها به 200 میکرولیتر رسید و پس از پایان انکوباسیون ۴۸ ساعته تست MTT انجام شد. بدین صورت که پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از MTT، پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شدند و سپس مایع رویی هر چاهک تخلیه شده و به رسوب حاصل (MTT در سلول‌های زنده به کریستال‌های فورمازان تبدیل می‌شود) ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اسیدی اضافه گردید که کریستال‌ها را حل کرده و جذب نوری هر چاهک در طول موج 492 نانومتر با الایزا ریدر ثبت گردید.

سنجش آپوپتوز سلول‌ها: آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌ها به‌طور نرمال و خودبخود یا توسط عوامل خارجی از جمله داروها جهت حفظ شرایط هموستازی سلول‌ها رخ می‌دهد (۴). پس از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان، در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه

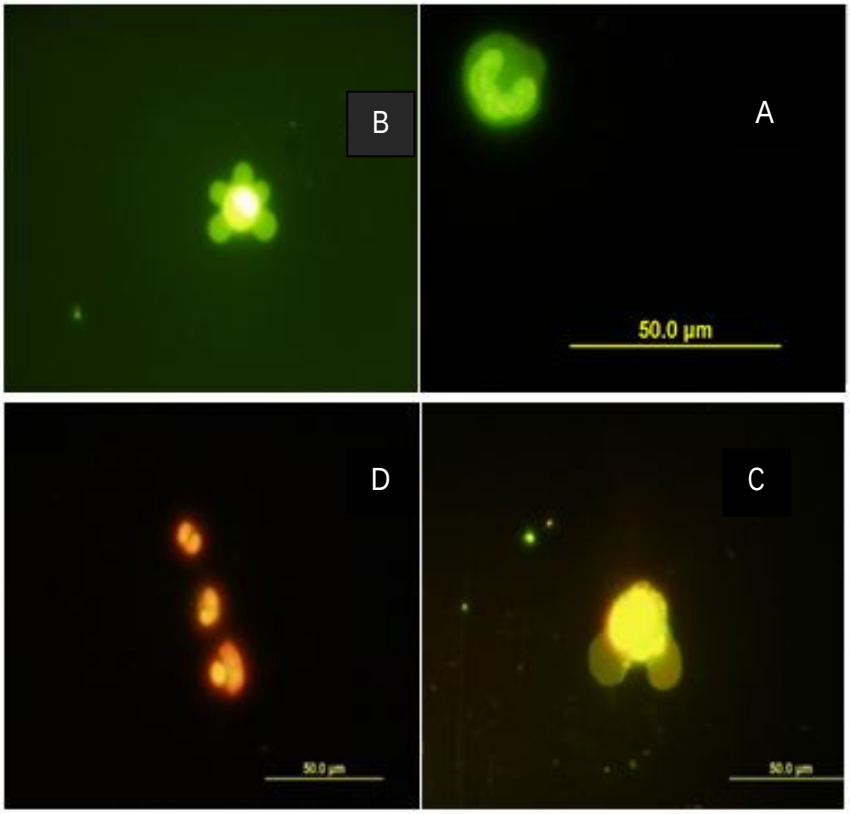
15×10^4 سلول ریخته شد. سپس به چاهک‌های ردیف تست 10 میکرولیتر داروی پومالیدومید با غلظت نهایی ۱۰ میکرومول اضافه شد درحالی‌که چاهک‌های ردیف کنترل تنها حاوی محیط کشت و سلول بودند (برای هر تست ۵ چاهک اختصاص یافت). حجم نهایی محیط کشت در همه چاهک‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر رسید و پس از پایان انکوباسیون ۴۸ ساعته تست آپوپتوز انجام شد. مایع رویی هر چاهک را برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به سلول‌های ته هر چاهک اضافه شد. برای بررسی آپوپتوز، ابتدا تعدادی از سلول‌های هر چاهک به‌طور جداگانه روی لام ریخته شد سپس توسط دستگاه سایتوسپین (Shandon Cytospin 4) با دور 540rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌ها با متانول فیکس و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکپ نوری شمارش شدند. شمارش سلول‌هایی که آپوپتوز شده بودند با مرفولوژی هسته‌ی چروکیده و کروماتین متراکم، غشای سیتوپلاسمی حبابی و کاهش حجم سلول به‌صورت درصد گزارش شد (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی آپوپتوز با رنگ گیمسا. سلول تک هسته‌ای مغز استخوان پس از ۴۸ ساعت کشت در مواجه با داروی پومالیدومید. سلول آپوپتوز شده با هسته‌ی چروکیده و جدار سیتوپلاسمی حبابی شکل توسط رنگ آمیزی گیمسا؛ بزرگنمایی 100X

بقیه‌ی سلول‌های هر چاهک با تست دقیق‌تر دیگری برای سنجش آپوپتوز یعنی با رنگ‌های فلورسنت آکریدین اورنج (Sigma 46065) و اتیدیوم بروماید (Sigma A 8097) رنگ آمیزی گردید. بدین‌ترتیب که ۹ میکرولیتر از سلول‌های هر چاهک با ۱ میکرولیتر مخلوط رنگ‌های آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) ترکیب و یک قطره بین لام و لامل قرار داده شد و ۳۰۰ سلول توسط میکروسکپ فلورسنت شمارش گردید و به‌صورت درصد گزارش شد (۱۴و ۴). آکریدین‌اورنج جذب سلول‌های زنده و غیر زنده شده با فلورسنت سبز درحالی‌که اتیدیوم بروماید تنها جذب سلول‌های غیرزنده شده و با فلورسنت قرمز مشخص گردید. بنابراین سلول‌ها در رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم بروماید بر حسب شرایط هسته‌ای و مورفولوژیکی طبقه‌بندی شدند: سلول زنده دارای هسته سبز یکنواخت، مرحله‌ی اولیه آپوپتوز دارای هسته سبز با غشای

سیتوپلاسمی حبابی شکل، مرحله‌ی نهایی آپوپتوز دارای هسته قرمز یا نارنجی با کروماتین قطعه قطعه و غشای سیتوپلاسمی حبابی و سلول نکروز دارای هسته قرمز یا نارنجی یکنواخت می‌باشند (۴) (شکل ۲).



شکل ۲: سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان پس از ۴۸ ساعت کشت در مواجه با داروی پومالیدومید با رنگ آمیزی فلورسانت آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید. A) سلول در مرحله‌ی زنده با جذب رنگ آکریدین اورنج و دارای هسته سبز یکنواخت. B) سلول در مرحله‌ی اولیه آپوپتوز با جذب رنگ‌های آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید دارای هسته‌ی سبز ولی با غشای سیتوپلاسمی حبابی شکل. C) سلول در مرحله‌ی نهایی آپوپتوز با جذب رنگ‌های آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید و دارای هسته‌ی نارنجی با کروماتین قطعه قطعه با غشای سیتوپلاسمی حبابی شکل و در حال تبدیل به نکروز شدن. D) سلول‌ها در مرحله‌ی نکروز شدن با جذب رنگ اتیدیوم بروماید و دارای هسته قرمز یکنواخت

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری، میانگین و پراکندگی داده‌ها و آزمون T Test استفاده گردید. در بررسی نتایج از نرم‌افزار Graphpad Prism استفاده شد. حدود اطمینان ۹۵ درصد و مبنای معنی‌دار بودن اختلافات $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

شرایط فیزیولوژیک افراد مورد مطالعه: میانگین سن افراد مورد مطالعه ۱۱±۶۲ سال بود و نتیجه‌ی شمارش سلول‌های خون محیطی آن‌ها به‌صورت زیر می‌باشد: میانگین تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در هر میلی‌متر مکعب خون محیطی، در محدوده نرمال بود. در حالی‌که به دلیل علایم کم خونی در این افراد، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در هر میلی‌متر مکعب خون محیطی کمتر از محدوده‌ی نرمال را

نشان داد. همچنین میانگین درصد تعداد پلاسما سل‌های مغز استخوان این افراد نیز در محدوده‌ی نرمال بود (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات فیزیولوژیک حاصل از نتایج آزمایشات و پرونده‌ی افراد مورد مطالعه

	تعداد گلبول‌های قرمز خون محیطی	تعداد گلبول‌های سفید خون محیطی	درصد پلاسماسل نمونه‌ی مغزاستخوان
میانگین± انحراف معیار	* (۳/۸±۰/۲) ×۱۰^{۶}	* (۷/۴±۳/۲) ×۱۰^{۳}	۳% ±۱
محدوده‌ی نرمال	(۴/۵ - ۶) ×۱۰^{۶}	(۵/۲ - ۱۱) ×۱۰^{۳}	۱% - ۵

**** تعداد شمارش سلول‌ها در هر میلی‌متر مکعب خون می‌باشد.***

جدول ۲: شمارش و حیات سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان افراد مورد مطالعه قبل از کشت سلولی

	تعداد سلول‌های تک هسته‌ای در هر میلی‌لیتر مغزاستخوان	درصد حیات سلولی با رنگ‌آمیزی تریپان بلو
میانگین± انحراف معیار	(۹±۳/۲) ×۱۰^{۶}	۹۹%±۱

جدول ۳: میزان درصد آپوپتوزیس سلول‌های تک هسته‌ای مغزاستخوان افراد مورد مطالعه

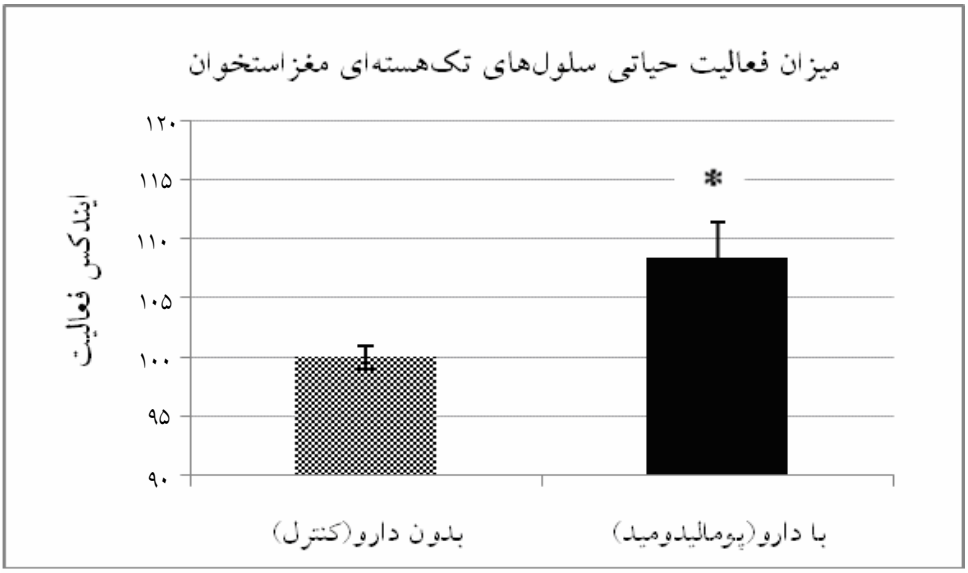
	درصد آپوپتوز سلول‌ها با رنگ‌آمیزی گیمسا		درصد آپوپتوز سلول‌ها با رنگ‌آمیزی فلورسنت	
	بدون دارو	با دارو	بدون دارو	با دارو
میانگین± انحراف معیار	۱۲%±۳	۱۰%±۲	۸%±۳	۶%±۲

شمارش سلولی: تعداد سلول‌های تک هسته‌ای به دست آمده از هر میلی‌لیتر نمونه مغزاستخوان (BMMNC) Bone Marrow Mononuclear Cells در افراد مورد مطالعه متفاوت بود. حداقل شمارش این سلول‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه‌ی مغزاستخوان 7×10^{6} و حداکثر $13/3\times10^{6}$ سلول به‌دست آمد. میانگین حیات سلولی پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای مغزاستخوان بر اساس رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو محاسبه شد که در هیچکدام کمتر از ۹۸ درصد نبود (جدول ۲).

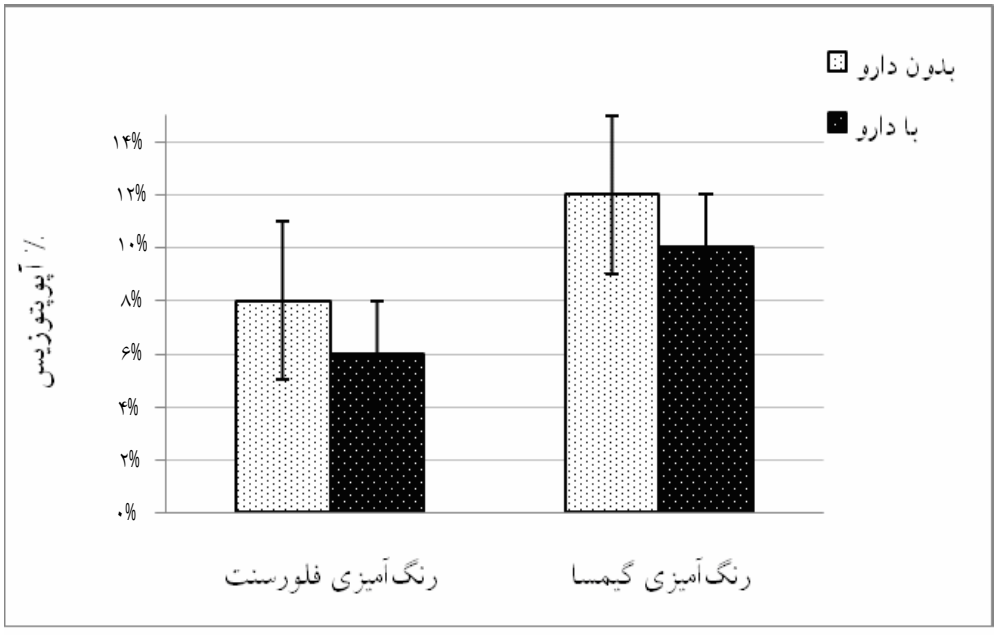
میزان فعالیت حیاتی سلولی (MTT): نتایج حاصل از MTT و آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای افراد مورد مطالعه به‌صورت میانگین ۵ چاهک میکروپلیت 96 خانه‌ای در نظر گرفته شد. میزان جذب نوری به‌دست آمده از فعالیت حیاتی سلول‌ها (MTT) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در گروه کنترل و دارو به دست آمد و نتایج با استفاده از فرمول زیر به‌صورت ایندکس فعالیت محاسبه شد:

۱۰۰× (میانگین جذب نوری سلول‌های بدون دارو / میانگین جذب نوری سلول‌های مواجه با دارو)

بدین‌ترتیب فعالیت حیاتی سلول‌ها به‌صورت ایندکس فعالیت در حضور پومالیدومید، ۸ درصد افزایش داشت که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱: تاثیر داروی پومالیدومید بر فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان. سلول‌های تک‌هسته‌ای از مغزاستخوان افراد مورد مطالعه گرفته و کشت داده شد (15×10^4 cell/well). داروی پومالیدومید به نیمی از سلول‌ها اضافه شد و نیمی دیگر بدون دارو به‌عنوان گروه کنترل کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها با تست MTT در هر دو گروه سلول‌ها سنجیده شد. نتایج به‌صورت ایندکس فعالیت نمایش داده شد ($P<0/05$) .



نمودار ۲: تاثیر داروی پومالیدومید بر میزان القای آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان. سلول‌های تک‌هسته‌ای از مغزاستخوان افراد مورد مطالعه گرفته و کشت داده شد (15×10^4 cell/well). داروی پومالیدومید به نیمی از سلول‌ها اضافه شد و نیمی دیگر بدون دارو به‌عنوان گروه

کنترل کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون میزان درصد آپوپتوز سلول‌ها با رنگ آمیزی گیمسا و نیز رنگ‌آمیزی فلورسنت اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید در هر دو گروه سلول‌ها سنجیده شد که در هیچ کدام از لحاظ آماری معناداری نبود.

سنجش آپوپتوز سلولی با رنگ‌آمیزی گیمسا: پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌های هر چاهک روی لام ریخته و با سایتوسپین سانتریفوژ شد سپس با اتانل فیکس و با گیمسا رنگ‌آمیزی شد. درصد سلول‌های آپوپتوز شده با میکروسکوپ نوری شمارش شد، نتایج حاصل از میانگین درصد آپوپتوز سلول‌ها در گروه کنترل و دارو مقایسه شد ولی از لحاظ آماری تفاوت معناداری وجود نداشت (P= 0/31) (جدول ۳ و نمودار۲).

سنجش آپوپتوز سلولی با رنگ‌آمیزی فلورسنت اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج: برای بررسی دقیق‌تر اثر سایتوتوکسیک داروی پومالیدومید بر سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان سالم پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌های هر چاهک با رنگ‌های فلورسنت اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج مخلوط و با میکروسکوپ فلورسنت شمارش شد میانگین درصد آپوپتوز سلول‌ها با رنگ‌آمیزی فلورسنت نیز در گروه کنترل و دارو مقایسه شد که از لحاظ آماری تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/۱۲) (جدول ۳ و نمودار ۲).

بحث

پومالیدومید از جمله جدیدترین داروهای ضد سرطانی و مشتق از تالیدومید است. مطالعات محدودی در مورد اثر این دارو بر سلول سرطانی در خون محیطی و رده‌های سلولی انجام شده است ولی از نحوه‌ی اثر این دارو بر سلول‌های سالم موجود در محیط مغزاستخوان که حاوی سلول‌های پیش‌ساز و سلول‌های بالغ ایمنی است اطلاعی در دست نیست. پومالیدومید از تغییرات شیمیایی تالیدومید به‌دست آمده و دارای خاصیت درمانی زیاد با توکسیسیته محدود می‌باشد (۱۶، ۱۵). اغلب داروهای ضدسرطانی دارای اثرات توکسیک بر سلول‌های سالم بیماران هستند. تالیدومید و لنالیدومید (داروهای نسل قبل پومالیدومید) علاوه بر خاصیت توکسیسیته بر سلول‌ها دارای فعالیت ضد آنژیوژنز قوی و تراتوژنیک (در لنالیدومید با اثر کمتر) هستند، به‌طوری‌که در مادران حامله مصرف کننده‌ی تالیدومید منجر به تولد نوزادانی با نقص عضو و ناهنجاری شدید گردید (۱۸، ۱۷). در حالی‌که پومالیدومید بسیار قوی‌تر از تالیدومید و داروهای نسل قبل خود است با اینکه سبب القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی و مهار آنژیوژنز می‌شود ولی در حد مطالعات محدودی که بر مونونوکلئرهای خون انجام شده اثر توکسیک بر سلول‌های غیر سرطانی نمی‌گذارد (۱۱، ۲). از آنجا که سلول‌های هدف داروی پومالیدومید علاوه بر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون، در مغز استخوان نیز حضور دارند، در این مطالعه به تاثیر داروی پومالیدومید بر میزان فعالیت حیات سلولی و القای آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده از مغزاستخوان افرادی که از لحاظ پاتولوژیک سالم بودند، پرداخته شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان هم از این جهت که حاوی سلول‌های حیاتی در پاسخ‌های ایمنی هستند و هم از این جهت که سلول‌های هدف این دارو را (در بیماران سرطانی) شامل می‌شوند اهمیت خاصی دارند.

در این مطالعه سلول‌های تک‌هسته‌ای به‌دست آمده از مغزاستخوان شمارش و تعداد بر حسب میلی‌لیتر حجم نمونه مغزاستخوان محاسبه گردید که بین افراد مختلف تا حدی متفاوت بود؛ ولی تفاوت مشاهده شده در شمارش سلول‌های تک‌هسته‌ای افراد مورد مطالعه در محدوده قابل قبولی بوده که توسط محققین دیگر هم گزارش شده و می‌تواند دلایل زیادی داشته و با شرایط فیزیولوژیک هر فرد با فرد دیگر متغیر باشد. بافت اسفنجی مغزاستخوان دارای حفره‌های متعددی است و می‌تواند تجمع سلول‌ها در این

محیط در حفرهای بیشتر از حفره دیگر باشد. بنابراین در یک محل خاص ممکن است به واسطه‌ی حضور مناطق کاملا هایپرسلولار و یا هایپوسلولار، توزیع سلولی متغیر باشد (۱۹و ۱۴). همچنین تعداد متفاوت سلول‌های تک‌هسته‌ای جداسازی شده از نمونه‌ی مغزاستخوان هر فرد، می‌تواند علاوه بر ویژگی‌های فیزیولوژیک متغیر هر فرد، به نحوه‌ی ورود سوزن و تکنیک آسپیراسیون آن بستگی داشته باشد (۱۹).

تست MTT نشان دهنده‌ی میزان فعالیت حیاتی و تکثیر این سلول‌ها پس از کشت سلولی در محیط آزمایشگاه است. در مطالعه‌ی حاضر، سنجش ایندکس فعالیت حیاتی کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای غیرسرطانی در حضور داروی پومالیدومید در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد. بنابراین پومالیدومید نه تنها سبب حفظ حیات این سلول‌ها شده، بلکه منجر به افزایش فعالیت حیاتی آن‌ها نیز گشته است و این می‌تواند نشان دهنده‌ی یک اثر مثبت تقویت کننده بر این سلول‌ها باشد. از آنجا که بیماران مبتلا به سرطان بعد از شروع داروهای شیمی درمانی، مشکلات ناشی از سرکوب پاسخ ایمنی را دارند، استفاده از دارویی که تا حدی- ولو بسیار محدود- منجر به تقویت سلول‌های ایمنی شود می‌تواند بسیار مفید باشد.

سایر مطالعات در این مورد حاکی از نتایج متفاوتی است مثلا در یک مطالعه بر روی رده‌ی سلولی CT26 کارسینومای کلورکتال موشی در کشت ۷۲ ساعت تحت تاثیر داروهای تالیدومید، لنالیدومید و پومالیدومید، تفاوت معناداری در رشد، تکثیر و فعالیت حیاتی سلول‌ها مشاهده نشد (۲۰) که دلیل آن می‌تواند تفاوت در نوع سلول در مقایسه با مطالعه ما باشد. در حالی‌که در دو مطالعه دیگر که با استفاده از سلول‌های خون محیطی مبتلایان به آنمی میلوفیبروز انجام شده است، تاثیر پومالیدومید بر حفظ فعالیت حیاتی سلول‌ها (در تست MTT) مشاهده شده است (۲۲و ۲۱) که می‌تواند در تایید نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی ما حاکی از این باشد که تاثیر مثبت پومالیدومید روی لکوسیت‌های خون و مغزاستخوان هر دو اتفاق می‌افتد. همچنین سنجش فعالیت حیاتی در بعضی از رده‌های سرطانی مالتیپل میلوما تفاوت معناداری را نشان نداده است که عمدتا به دلیل تفاوت در منشا سلول است (۱۶و ۸، ۷). لذا می‌توان گفت تاثیر افزایش رشد بر لکوسیت‌ها دیده شده است ولی همه انواع سلول‌ها (سرطانی یا غیر سرطانی) تحت تاثیر پومالیدومید افزایش فعالیت یا تکثیر پیدا نمی‌کنند. در عین حال این احتمال وجود دارد که پومالیدومید در عین حال که باعث افزایش فعالیت گروهی از سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان می‌شود، همزمان بر گروهی دیگر از آن‌ها اثر توکسیک داشته، مرگ و میر آن‌ها را افزایش دهد که برای حصول اطمینان از این نکته وقوع آپوپتوز نیز در این سلول‌ها (با دو روش مختلف) و مشاهده با میکرسکوپ بررسی گردید. اختلال در روند فرآیند آپوپتوز می‌تواند تظاهرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین اهمیت و ضرورت شناخت و پیگیری این فرآیند حیاتی می‌باشد (۱۶و ۴). سایر مطالعات انجام شده توسط فلوسایتومتری بر روی رده‌های سلول سرطانی و نیز سلول‌های تک‌هسته‌ای سرطانی مغزاستخوان در مبتلایان به مالتیپل میلوما در حضور پومالیدومید پس از ۷۲ ساعت کشت، افزایش معناداری را در وقوع آپوپتوز نشان داده است (۱۶، ۱۵، ۱۱). در حالی‌که در مطالعه‌ی ما که بر روی سلول‌های سالم انجام شده است، سنجش آپوپتوز سلولی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون کشت، با استفاده از رنگ گیمسا و میکروسکوپ نوری و همچنین با استفاده از رنگ‌های فلورسنت آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید با میکروسکوپ فلورسنت بیانگر این بود که داروی پومالیدومید (10 میکرومول یا همان دز رایج در مطالعات مشابه) اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های سالم کشت داده شده با آن ندارد. این نکته حاکی از این است که اثر توکسیک این دارو عمدتا

متمرکز بر سلول‌های سرطانی است. با توجه به اهمیت این موضوع، مطالعات بیشتر به منظور یافتن مکانیسم دقیق عملکرد این دارو که هنوز بخوبی مشخص نشده است، می‌تواند مفید باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج حاصل از کشت سلولی نشان داد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌های تک هسته‌ای مغزاستخوان افراد مورد مطالعه در حضور داروی ضدسرطانی پومالیدومید افزایش معناداری نسبت به سلول‌های بدون دارو دارد. با این حال میزان القای آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای مغزاستخوان افراد مورد مطالعه در حضور این دارو در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. بنابراین داروی پومالیدومید بر سلول‌های تک‌هسته‌ای مغزاستخوان افرادی که از لحاظ پاتولوژیک سالم محسوب می‌شوند نه تنها تاثیر سایتوتوکسیک نداشته بلکه با افزایش تحریک فعالیت حیاتی این سلول‌ها سبب بهبود و حفظ حیات آن‌ها می‌شود. بدین ترتیب پومالیدومید می‌تواند به‌عنوان یک داروی ضدسرطانی مناسب‌تر (با اثرات جانبی کمتر روی سلول‌های سالم و غیر سرطانی) نسبت به سایر داروهای ضدسرطانی محسوب گشته و مورد استفاده قرارگیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه مستخرج از پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد که بدین وسیله از زحمات کارشناس آزمایشگاه گروه ایمنی‌شناسی پزشکی دانشگاه شاهد جناب آقای جمالی و از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1- Melchert M, List A. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(7): 1489-99.

2- Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010; 24(1): 22-32.

3- Shalapour S, Zelmer A, Pfau M, et al. The thalidomide analogue, CC-4047, induces apoptosis signaling and growth arrest in childhood acute lymphoblastic leukemia cells invitro and invivo. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(18): 5526-32.

4- Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*. 2006; 30(11): 924-32.

5- Lacy MQ. New immunomodulatory drugs in myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2011; 6(2): 120-5.

6- Sedlarikova L, Kubiczkova L, Sevcikova S, Hajek R. Mechanism of immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2012; 36(10): 1218-24.

7- Gorgun G, Calabrese E, Soydan E, et al. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2010; 116(17): 3227-37.

8- Schey S, Ramasamy K. Pomalidomide therapy for myeloma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011; 20(5): 691-700.

9- Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, et al. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(3): 1222-32.

10- Marriott J, Clarke I, Dredge K, Muller G, Stirling D, Dalgleish A. Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF- α and TNFR2 during co-stimulation of both CD4+ and CD8+ T cells. *Clin & Exp Immunol*. 2002; 130(1): 75-84.

11- Lacy MQ, Tefferi A. Pomalidomide therapy for multiple myeloma and myelofibrosis: an update. *Leuk Lymphoma*. 2011; 52(4): 560-6.

12- Ahmadbeigi N, Soleimani M, Mortazavi Y. The efficiency of density gradient for separation of mesenchymal stem cells from bone marrow sample. *Zanjan Unv Med Sci J*. 2011; 19 (77): 62-69.

13- Hernández P, Cortina L, Artaza H, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis*. 2007; 194(2): e52-e6.

14- Hay FC, Westwood OM. Practical immunology 4th edition. UK: Wiley; 2008.

15- Lacy MQ, McCurdy AR. Pomalidomide. *Blood*. 2013; 122(14): 2305-9.

16- Chanan-Khan A, Swaika A, Paulus A, et al. Pomalidomide: the new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2013; 3(9): e143.

17- Bartlett JB, Dredge K, Dalgleish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer***.** 2004; 4(4): 314-22.

18- Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci*. 2011; 122(1): 1-6.

19- Nicholas A, Boon MA, Nicki R, Brian R, Walker JA, Hunter D. Principle And practice of medicine. 20th Edition. UK: Churchill Livingstone; 2006.

20- Liu W, Henry J, Meyer B, Bartlett J, Dalgleish A, Galustian C. Inhibition of metastatic potential in colorectal carcinoma invivo and invitro using immunomodulatory drugs (IMiDs). *Br J Cancer*. 2009; 101(5): 803-12.

21- Moutouh-de Parseval LA, Verhelle D, Glezer E, et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. *J Clin Invest*. 2008; 118(1): 248-58.

22- Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, et al. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4563-9.

The Effect of Anticancer Pomalidomide Drug on Vital Activity and Apoptosis Induction on Bone Marrow Mononuclear Cells

Tajik Sh[1], Jalali-Nadoushan MR[2], Shams J[3], Yaraee R[1]

[1]Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

[2]Dept. of Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

[3]Dept. of Hematology & Oncology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Yaraee R, Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

***E-mail*:** ryaraee@yahoo.com

Received: 9 Feb 2014 **Accepted:** 30 Jun 2014

***Background and Objective*:** Pomalidomide - a combination of Lenalidomide and Thalidomide drugs- is one of the newest anticancer drugs. Pomalidomide induces apoptosis in cancer cells. Furthermore, few studies indicating its relatively low cytotoxic effects on normal peripheral blood cells have been carried out. However, there is yet no information about the effects of Pomalidomide on bone marrow cells that contain important immune cells. In this study, the effect of Pomalidomide on normal bone marrow mononuclear cells was studied.

***Materials and Methods*:** The samples obtained from individuals who clinically needed bone marrow examination, but finally were diagnosed with no serious pathologic conditions in their leukocytes. Remained bone marrow aspirates were obtained and mononuclear cells were isolated. Half of the mononuclear cells were cultured with Pomalidomide (final concentration 10µM) and the remaining half (control group) were cultured with media alone. After 48h incubation, vital activity (MTT) and cell apoptosis induction rates were assessed.

Results: The results showed that the vital activity of bone marrow mononuclear cells cultured in the presence of Pomalidomide increased significantly compared to the control group ($P<0.05$). However, Pomalidomide had no apoptosis induction and the rate of apoptotic cells had no significant difference with control group.

***Conclusion*:** Pomalidomide moderately stimulates the viability (or activity) of normal bone marrow mononuclear cells to improve and maintain them. Also, unlike most anticancer drugs it has no observable toxic effect or apoptosis induction on these cells. So, it may be concluded that Pomalidomide may be more favorable in preventing the side effects of anticancer drugs on normal cells.

Keywords: Pomalidomide, MTT, Apoptosis, Bone marrow, Mononuclear cells