

اثر سولفور موستارد و سیکلوفسفامید بر بقاء سلولی در محیط کشت و نقش پیش گیرانه ویتامین E

کاظم احمدی^۱ Ph.D. و فاطمه عرب سلمانی^۲ B.Sc.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^{«عج»} - دانشکده پزشکی - گروه ایمنولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی تهران - ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۹/۱۴

تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۱۱/۵

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۱۱/۱۸

خلاصه

مقدمه: ماکروفاژهای صفاقی موش در آزمایشگاه برای مدتی زنده می‌مانند. پس از آن تعداد سلول‌های زنده به دلیل کاهش محیط کشت، سوبسترا یا تولید فاکتورهای مهار کننده و اثر توکسیک نیتریک اکساید کاهش می‌یابد. عوامل آلیکله کننده نظیر سولفور موستارد و سیکلوفسفامید با توجه به غلظت مورد استفاده بر سیستم ایمنی و عملکرد ماکروفاژها اثر مهاری دارند. لذا، هدف از این مطالعه تعیین اثر ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت بر دوام بقاء سلول‌های ماکروفاژی در حضور سولفور موستارد و سیکلوفسفامید بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه ابتدا موش‌ها را بیهوش نموده و مقدار ۵ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) سرد را به داخل صفاقی تزریق و پس از ماساژ، با کمک پیپت پاستور تعدادی از سلول‌های صفاقی جمع‌آوری گردید. سلول‌ها را سه بار شسته و پس از شمارش سوسپانسیون سلولی به تعداد لازم تهیه شد. تعداد $10^5 \times 1$ سلول در حجم ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها ۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شده و پس از آن به منظور حذف سلول‌های غیر ماکروفاژی سه بار با PBS گرم شسته شدند. مجدداً به سلول‌ها، محیط کشت کامل حاوی لیپوپلی ساکارید (LPS=۳) در حضور یا غیاب سیکلوفسفامید، سولفور موستارد و ویتامین E اضافه شد و در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. دوام بقاء سلولی پس از مخلوط کردن با ترین بلو شمارش شد. نیتريت به عنوان اندیکاتوری از نیتريك اكساید بروش گريس اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد، مرگ سلولی با افزایش غلظت سیکلوفسفامید و یا سولفور موستارد افزایش می‌یابد ($P<0/02$)، در حالی که در حضور ویتامین E تعداد سلول‌های مرده کاهش کمتری دارد ($P<0/2$)، ویتامین E توانست با تمام غلظت‌های سیکلوفسفامید و سولفور موستارد در ایجاد مرگ سلولی مقابله کند ولی این مقابله در غلظت‌های بالای سولفور موستارد کمتر بود. ویتامین E همچنین باعث کاهش ترشح نیتريك اكساید در محیط کشت در حضور سیکلوفسفامید و سولفور موستارد شد. در حضور ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید مقدار نیتريت ۵۲۰ نانو مول بوده در حالی که در حضور ویتامین E مقدار آن به ۴۱۰ نانو مول (۲۱/۱۵) درصد کاهش یافته است ($P<0/05$). ویتامین E توانسته در مقابل تمام غلظت‌های سولفور موستارد مانع اثر افزایشی آن بر ترشح نیتريك اكساید شود. ولی با افزایش غلظت سولفور موستارد، اثر ویتامین E کاهش یافته است، به طوری که در غلظت ۸۰ و ۱۶۰ میکرو مول اثر ویتامین E معنی دار نبود ($P<0/07$).

بحث: مرگ سلول‌های ماکروفاژی موش در مدت زمان آنکوباسیون در محیط کشت در حضور سیکلوفسفامید و یا سولفور موس‌تارد می‌تواند وابسته به ترشح نیتریک اکساید باشد. ویتامین E با کاهش ترشح نیتریک اکساید می‌تواند باعث افزایش بقاء سلول‌های ماکروفاژی و کاهش مرگ سلولی شود.

واژه‌های کلیدی: بقاء سلول، ویتامین E، مرگ سلول، سولفور موس‌تارد و سیکلوفسفامید

مقدمه

سیکلوفسفامید یکی از داروهای گروه الکیله کننده است که در سطح وسیعی به عنوان داروی ضدسرطان استفاده می‌شود [۱]. نظر به این که سرطان با تکثیر لجام گسیخته سلولی همراه است، بنابراین سیکلوفسفامید احتمالاً از طریق مهار تکثیر سلول عمل می‌کند. نیتروژن موس‌تارد که از عوامل الکیله کننده است نیز دارویی ضدسرطان است. اما سولفور موس‌تارد (گاز خردل) که در سولفور با نیتروژن موس‌تارد متفاوت است به دلیل خاصیت طاول‌زایی به عنوان یک گاز جنگی مورد استفاده بوده است.

نتایج تجربی و کلینیکی اثرات دوگانه از سیکلوفسفامید را در پاسخ ایمنی نشان می‌دهد [۲]. سیکلوفسفامید باعث ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی و جینی موش [۳، ۴، ۵ و ۶]، سلول‌های ریه و تیموس رت [۷ و ۸] می‌شود. هرچند این دارو دارای خاصیت ضدسرطان خوبی است و باعث کاهش حجم تومور می‌شود ولی دوز اضافه آن معمولاً ضعیفی را در مکانیسم‌های دفاعی میزبان ایجاد می‌کند. این ضعف معمولاً منجر به مهار پاسخ‌های ایمونولوژی و اغلب باعث رشد عفونت‌های فرصت‌طلب و بعضی مواقع باعث بروز رشد دوباره سرطان می‌شود [۹ و ۱۰]. بنابراین یکی از مکانیسم‌هایی که برای سیکلوفسفامید تعریف می‌شود مرگ سلولی است. هرچند مرگ سلولی ناشی از سیکلوفسفامید را به مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) نسبت می‌دهند [۳، ۴، ۵ و ۶]، ولی نمی‌توان سایر مکانیسم‌ها، نظیر مرگ ناشی از توکسیسیته را نادیده گرفت. در این رابطه گفته شده که نیتریک اکساید می‌تواند علاوه بر خواص آنتی‌باکتریالی و سرطانی بر خود ماکروفاژها نیز اثر سایتوتوکسی سیتی [۱۱] و یا کاهش بقاء عمر داشته باشد [۱۲، ۱۳ و ۱۴]. بنابراین تولید نیتریک اکساید علاوه بر اثرات سایتوتوکسیکی و سایتواستاتیک علیه میکروارگانیسم‌های مهاجم و سلول‌های سرطانی اثرات سمی روی سلول تولید کننده و یا سلول‌های مجاور آن دارد. سولفور موس‌تارد نیز

باعث افزایش نیتریک اکساید سنتتاز و سیکلو اکسیژناز - ۲ در نمونه‌های پوستی به دست آمده از موش‌هایی شده که به طور پوستی با گاز خردل تماس داشتند [۱۵]. همچنین مهار کننده تولید نیتریک اکساید (L-NAME) NitroArginine Methylester با یک مکانیسم مستقل از مهار نیتریک اکساید از اثرات سایتوتوکسی سیتی سولفور موس‌تارد جلوگیری نموده است [۱۶]. در حالی که ال-تیو سیترولین { L-Thio Citrulline (L-TC) } آنالوگ دیگری از آرژنین ضمن مهار تولید نیتریک اکساید باعث حفاظت سلول‌های نرونی در محیط کشت شده است [۱۶]. از طرفی به نظر می‌رسد، سلول‌های پلی‌مورفو نوکلر خط اول مسؤولیت آسیب بافتی پس از دریافت عوامل الکیله کننده نظیر سولفور موس‌تارد و سیکلوفسفامید را داشته باشند. در این رابطه Levitt [۱۷] ثابت کرده که غلظت‌های پایین سولفور موس‌تارد حدود ۱۰۰-۲۵ میکرومولار منجر به تحریک اولیه سلول‌های پلی‌مورفو نوکلر در بدن موش شده به طوری که این سلول‌ها بعداً در محیط کشت در پاسخ به محرک‌های سلولی انفجار تنفسی قوی‌تری خواهند داشت. البته تحقیق فوق نشان داده که سولفور موس‌تارد در دوزهای بالاتر (۱۰۰-۵۰ میکرومولار) باعث آپوپتوزیس در این سلول‌ها می‌شود.

مطالعات نشان داده است که اکسیدانت‌هایی نظیر رادیکال‌های آزاد عامل آسیب سلولی و سوق دادن سلول‌های منونوکلر، لنفوسیت‌ها و سلول‌های ماکروفاژی U937 به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) می‌باشند [۱۸]. Chow و همکاران [۱۹] نیز نشان داده‌اند که متابولیت‌های نیتریک اکساید نظیر نیتريت و نیترات عامل ایجاد مت هموگلوبینمیا بوده و احتمالاً از طریق اتصال به بعضی آمین‌ها باعث تشکیل نیتروز آمین‌های کارسینوزیک می‌شوند. ویتامین E یک آنتی اکسیدانت است که باعث شکار رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکساید می‌شود [۲۰]. مطالعات کومار نشان داده که