بررسی اثر آپوپتوتیک و میزان کشندگی داروی All Trans Retinoic Acid (ATRA) روی سلول‌های میوم انسانی در محیط کشت سلولی*

طراوت فاخری[1]؛ هما بدری[2]*؛ علی مصطفایی[3]؛ حمیدرضا محمدی‌مطلق[3]؛ منصور رضایی[4]؛ انیس‌الدوله نانکلی[1]

چکیده

زمینه: لیومیوم شایع‌ترین نئوپلاسم زنان سنین باروری است. قدم اول در کنترل این تومور درمان طبی است. در حال حاضر پرکاربردترین دارو در درمان میوم رحمی، آگونیست‌های هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) هستند. علایم شبه‌یائسگی و پوکی استخوان و برگشت اندازه تومور به دنبال قطع مصرف، از مهم‌ترین عوارض این داروهاست. این مطالعه با هدف بررسی اثر آپوپتوتیک و میزان کشندگی داروی ATRA به‌عنوان دارویی با اثرات برگشت‌ناپذیر روی سلول‌های میوم انسانی انجام شد.

روش‌ها: نمونه‌ها، سلول‌های میوم به‌دست‌آمده از زنان مبتلا به میوم رحمی بستری در بیمارستان امام رضا کرمانشاه بودند. سلول‌ها پس از انجام مراحل آماده‌سازی و شمارش توسط لام نئوبار به‌مدت 24 ساعت کشت داده شدند. سپس به 2 گروه کنترل (محیط کشت بدون دارو) و گروه مواجهه یافته با ATRA با غلظت‌های صعودی، تقسیم و به‌مدت 72 ساعت در محیط کشت باقی ماندند. در ادامه از روش‌های تانل (TUNEL) و LDH به‌ترتیب برای اندازه‌گیری آپوپتوز و میزان کشندگی استفاده شد. در نهایت نتایج در دو گروه با هم مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اثر آپوپتوتیک ATRA به‌طور معناداری بیش از گروه کنترل است ($P<0/001$). میزان کشندگی در گروه ATRA بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0/002$).

نتیجه‌گیری: نتایج فوق از این فرضیه که احتمالاً مسیر اسیدرتینوئیک از مسیرهای اصلی دخیل در پاتوژنز لیومیوم رحمی است، حمایت می‌کند. احتمالاً از طریق این مسیر می‌توان علاوه بر توقف رشد میوم، آن‌را از بین برد.

کلیدواژه‌ها: میوم، ATRA، آپوپتوزیس، کشت سلولی

«دریافت: 1391/12/16 پذیرش: 1392/5/29»

1. گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

3. مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

4. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت و عضو مرکز تحقیقات توسعه اجتماعی و ارتقاء سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، سرخه‌لیژه، بیمارستان امام رضا، گروه زنان و زایمان، تلفن: 0831-4276301

Email: hbadri994@gmail.com

*** این مقاله منتج از پایان‌نامه دانشجویی خانم هما بدری جهت اخذ درجه دکترای تخصصی رشته زنان و زایمان از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.**

مقدمه

لیومیوم شایع‌ترین نئوپلاسم زنان سنین باروری و اولین اندیکاسیون هیسترکتومی در زنان می‌باشد (1). اغلب میوم‌ها بدون علامتند اما بیش از 20 درصد موارد با منوراژی و درد لگنی و علایم ادراری- تناسلی تظاهر می‌یابد (2). میوم رحمی علت 10 درصد موارد نازایی و در 3-1 درصد موارد، تنها علت نازایی می‌باشد (3). در زنان با لیومیوم شدیداً علامت‌دار ممکن است جهت رهایی از علایم، نیاز به هیسترکتومی باشد (4).

گرچه علت دقیق فیبروم‌ها ناشناخته است، اما علل شناخته‌شده شامل فاکتورهای هورمونی، عوامل ژنتیکی و فاکتورهای رشد هستند (5). میوم‌ها تومورهای با منشأ سلول عضله صاف با رشد منوکلونال هستند. نشان داده شده که 40 درصد موارد از نظر کروموزومی غیرطبیعی هستند (6). بد تنظیمی ماتریکس خارج سلول در میوم در مقایسه با میومتر اطراف به‌خوبی نشان داده شده است (7). نقش هورمون‌ها نیز در رشد میوم کاملاً شناخته شده است. از آن‌جا که پروژسترون و استروژن آغازگر رشد میوم هستند، به‌همین دلیل میوم قبل از بلوغ نادر است و بیشترین شیوعش در خلال سال‌های تولیدمثل دیده می‌شود و بعد از یائسگی پسرفت می‌کند (8 و 9). تجمع استرادیول در سلول‌ها و در نتیجه تنظیم افزایشی گیرنده‌های استروژن و پروژسترون و افزایش حساسیت به استروژن باعث رشد میوم می‌شود به‌همین‌دلیل میوم در خلال سیکل قاعدگی رشد بیشتری دارد. فاکتورهای رشد شامل پروتئین‌ها یا پلی‌پپتیدهای تولیدشده موضعی به‌وسیله سلول‌های عضله صاف و فیبروبلاست‌ها هستند که تکثیر سلول‌ها را کنترل می‌کنند (10).

لیومیوم‌ها وابسته به استروژن و پروژسترون هستند اما هورمون‌های جنسی فقط رشد را آغاز می‌کنند، لذا داروهای آگونیست هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) به‌عنوان داروهای رایج در درمان میوم از طریق القاء هیپوگنادیسم، تومورها را از بین نمی‌برند. بنابراین زمانی که سلول‌های میومی مجدداً با هورمون‌های جنسی مواجه شوند به‌سرعت رشد می‌کنند. سایر داروهای هورمونی نیز اثرات کوتاه‌مدت دارند. آنالیز میکرواسی در لیومیوم‌های انسانی نیز ظهور برخی ژن‌های اسید رتینوئیک را نشان می‌دهند (11 و 12) که مطرح‌کننده نقش احتمالی اسید رتینوئیک در پاتوژنز لیومیوم است.

رتینوئیدها داروهایی از خانواده ویتامین A هستند که رشد طبیعی سلول، تمایز سلولی و مرگ سلولی در مراحل تکامل جنینی و بافت‌های اصلی بدن در سایر مراحل زندگی را کنترل می‌کنند. اثر رتینوئیدها روی سلول‌ها به‌وسیله گیرنده‌های داخل هسته‌ای در هر سلول تنظیم می‌شود. دو کلاس اصلی گیرنده‌ها، شامل گیرنده‌های اسید رتینوئیک (RAR ,Retinoic acid receptor) و اسید رتینوئید (RXR, retinoic x receptor) هستند. هر کلاس نیز دارای ساب تایپ‌هایی است. در حال حاضر داروهای رتینوئیدی در درمان سرطان‌های مختلف مثل سرطان پوست، ریه، پستان، تخمدان، مثانه، کلیه و سرطان‌های سر و گردن و... به‌کار می‌رود. اهمیت یافتن درمان‌های قطعی میوم با توجه به شیوع بالای تومور در زنان سنین باروری و نیز موربیدیتی‌های ناشی از آن بیش از پیش آشکار می‌شود.

آترا (فرم ترانس اسیدرتینوئیک) یک داروی کموتراپی (آنتی‌نئوپلاستیک و سیتوتوکسیک) است.کاربردهای شایع آترا، درمان لوکمی میلوبلاستیک حاد و لوکمی پرومیلوستیک حاد است. این دارو به‌صورت خوراکی (کپسول 10 میلی‌گرمی) و موضعی (در درمان آکنه یا راش‌های خاص) مصرف می‌شود. با توجه به این مسأله که میوم در گروه تومورها قرار دارد و بنابراین داروهای شیمی درمانی باید قادر به از بین بردن آن باشند، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آپوپتوتیک و میزان کشندگی داروی ATRA بر روی سلول‌های میوم انسانی در محیط کشت سلولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های میوم از زنان مبتلا به میوم رحمی کاندید جراحی، بستری در بیمارستان امام رضای شهر کرمانشاه به‌دست آمد. ابتدا جهت تأیید خوش‌خیم بودن، تکه‌ای از نمونه میوم به‌دست‌آمده طی میومکتومی در محلول فرمالین به واحد پاتولوژی ارسال شد. پس از تأیید خوش‌خیم بودن، باقیمانده نمونه میوم توسط محلول PBS، استریل و منجمد شد و بلافاصله طی نیم ساعت به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه منتقل گردید.

در آزمایشگاه کشت سلول، نمونه‌های میوم به قطعات 1-0/5 میلی‌متری تقسیم و سپس با آنزیم کلاژناز 2mg/ml در درجه حرارت 37?C انکوباژ تیمار شد. بعد از آن سلول‌ها به‌مدت 3 ساعت روی شیکر و سپس زیر هود لامینار و تحت شرایط استریل با کمک مش از قطعات بافتی جدا شدند. در نهایت مایع رویی حاصله (supernatant) که حاوی سلول‌های میوم بود در سانتریفوژ با دور 450xg به‌مدت 10 دقیقه درون فالکون مخصوص قرار گرفت. رسوب حاصله که حاوی سلول‌های میوم بود درون فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل شد. فلاسک مذکور حاوی محیط کشت DMEM-F12 و FCS10% بود. فلاسک درون انکوباتور37?C درجه با 5 درصد CO2 به‌مدت10 روز قرار گرفت. طی این مدت، هرچند روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و ناخالصی‌ها وگلبول‌های قرمز و سایر مواد زاید خارج شده و محیط کشت تغذیه‌ای جهت کمک به تکثیر سلول‌ها ایجاد شد. بعد از 10 روز که تعداد سلول‌ها (confluency) به حد 90-80 درصد سطح فلاسک یعنی حدود25cm3 رسیدند، به‌کمک تریپسین از سطح فلاسک جدا شدند. پس از سانتریفوژ، رسوب حاصله با محیط کشت جدید به‌صورت سوسپانسیون درآورده شد و در چاهک 96 خانه‌ای به تعداد 5000 (5×103) سلول در هر چاهک کشت داده شد. قبل از مواجهه با دارو به‌مدت 24 ساعت سلول‌ها در محیط مذکور قرار داشتند. شمارش سلول‌ها به‌کمک لام نئوبار انجام شد. پس از 24 ساعت سلول‌ها با غلظت موردنظر از داروی ATRA به‌صورت 3 چاهک تحت تیمار قرار گرفتند. چندین چاهک نیز به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. این چاهک‌ها فقط محیط کشت حاوی FCS دریافت می‌کردند و با دارو تیمار نشدند. جهت بررسی میزان مرگ سلولی، سلول‌های کنترل را به دو گروه تقسیم کردیم: گروه اول، کنترل پایین و گروه دوم، کنترل بالا. در گروه کنترل پایین، مایع رویی چاهک کنترل برداشته شد و تعداد سلول در هر چاهک به‌طور غیرمستقیم از طریق میزان LDH آزاد شده از سلول‌های مرده محاسبه گردید. در گروه کنترل بالا به چاهک‌های کنترل، ماده‌ای به نام تریتون 100-x اضافه گردید و به‌مدت نیم‌ساعت در انکوباتور 37 درجه قرار داده شد. این کار باعث لیز سلول‌ها شد لذا میزان حداکثر LDH آزادشده از این طریق اندازه‌گیری گردید. در ادامه میزان سیتوتوکسیسیتی از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد سیتوتوکسیسیتی} = \frac{\text{جذب نمونه - جذب کنترل پایین}}{\text{جذب کنترل بالا- جذب کنترل پایین}}$$

برای بررسی میزان آپوپتوز از روش تانل (TUNEL) استفاده شد. این رنگ‌آمیزی طی مراحل انکوباسیون چاهک‌های پلیت با محلول تازه ساخته شده فیکساسیون به‌مدت یک‌ساعت در دمای اتاق جهت فیکس کردن سلول‌ها، انکوباسیون سلول‌ها با محلول Blocking به‌مدت 10 دقیقه در دمای اتاق، انکوباسیون با محلول Permeabilisation بر روی یخ، اضافه کردن مخلوط واکنش تانل (شامل 50 میکرولیتر محلول آنزیم و 450 میکرولیتر محلول Label) به‌میزان 50 میکرولیتر به هر چاهک به‌مدت 60 دقیقه در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد با رطوبت بالا و به دور از نور انجام گردید. به دنبال هر کدام از مراحل فوق، عمل شستشوی سلول‌ها با بافر PBS انجام شد. در نهایت از نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ فلوروسانس در طول موج‌های 500-450 و 565-515 نانومتر عکسبرداری شد. سپس 4 میدان دید از هر نمونه به شکل تصادفی انتخاب شد و درصد سلول‌های آپوپتوزی در نمونه‌ها به درصد سلول‌های آپوپتوزی در کنترل‌ها به‌عنوان شاخص آپوپتوزی محاسبه شد. میانگین شاخص آپوپتوزی و میزان مرگ سلولی در گروه ATRA با گروه کنترل با استفاده از نرم‌افزار SPSS مقایسه شد.

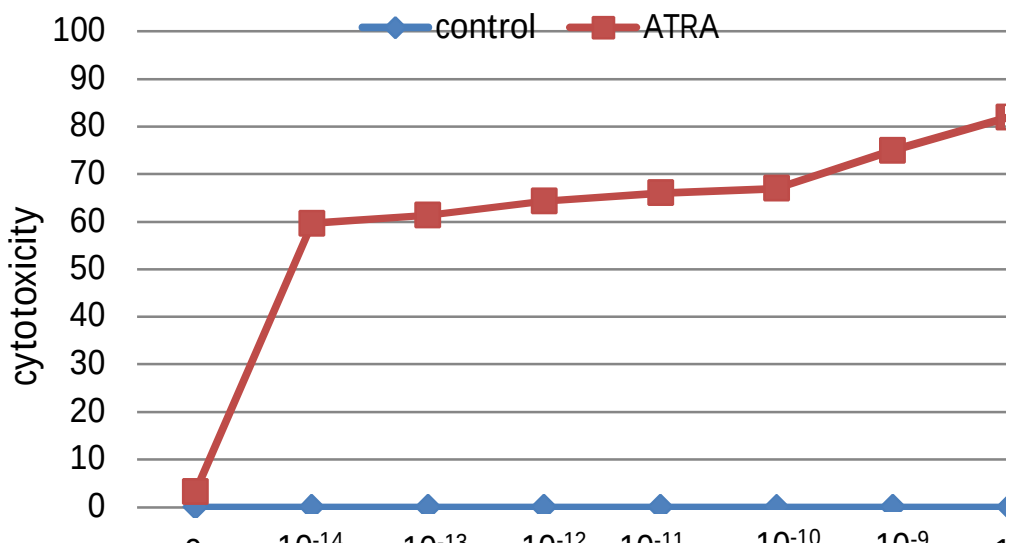
یافته‌ها

پس از 72 ساعت، اثرات کشندگی داروی ATRA نسبت به گروه کنترل بررسی شد. بر اساس نتایج، یک اثر وابسته به دوز در قدرت کشندگی دارو دیده می‌شود

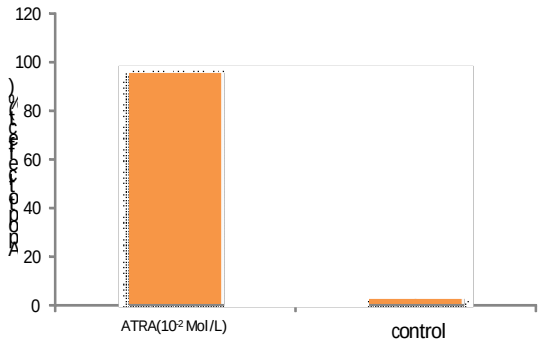
(نمودار 1). میزان کشندگی سلول‌های میوم انسانی در گروه آترا و کنترل، **72** ساعت پس از اضافه کردن دارو با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA مقایسه شد. نتایج تفاوت معناداری در میزان تأثیرگذاری دارو نشان می‌دهد **(P=0/002)** (جدول **1**). نتایج نشان داد که میزان کشندگی وابسته به دوز بوده و با افزایش میزان غلظت دارو، میزان کشندگی نیز افزایش یافته است **(نمودار 1).** همچنین مقایسه گروه کنترل با گروه ATRA نشان می‌دهد که میزان آپوپتوز در گروه ATRA به‌طور معنادار بیشتر از گروه کنترل است **(P≤0/001)** (جدول **1**) **(نمودار 2).**

جدول 1- مقایسه اثر آپوپتوتیک و میزان کشندگی **72** ساعت پس از اضافه کردن داروی آترا با گروه کنترل

	گروه دارویی	میزان مرگ سلولی	P value
LDH72	ATRA	**53/78±11/28**	**0/002**
	کنترل	**20/33**	
TUNELL	ATRA	**93/19±1/09**	**<0/001**
	کنترل	**3/1±0/1**	



نمودار1- مقایسه اثر کشندگی ATRA با گروه کنترل



نمودار 2- مقایسه اثر آپوپتوتیک داروی آترا بر روی سلول‌های میوم انسانی با گروه کنترل

بحث

در مطالعه حاضر، اثرات ATRA در القاء مرگ سلولی در سلول‌های میوم انسانی کشت‌شده در محیط کشت سلولی بررسی شد. در میوم انسانی، آنالیز میکروآسی ظهور برخی ژن‌های میسر اسید رتینوئیک را نشان داده‌اند **(9-12)**. این یافته‌ها نشان می‌دهد که مسیر اسید رتینوئیک ممکن است در پاتوژنز لیومیوم نقش داشته باشد. بر این اساس، اهمیت کلینیکی رتینوئیدها در جلوگیری و درمان سرطان به‌خوبی نشان داده شده است **(13)**. آزمایش مدل‌های حیوانی **(14)**، مدل‌های سلولی **(15)**، مطالعات اپیدمیولوژیک **(16)** و کارآزمایی‌های بالینی **(17)** از ارتباط قوی استفاده از رتینوئیدها در جلوگیری و درمان سرطان حمایت می‌کند، زیرا رتینوئیدها رشد و تمایز سلول‌های بدخیم و طبیعی را تنظیم می‌کنند. رتینوئیدتراپی با موفقیت در درمان سرطان‌های مختلف شامل لکوپلاکی **(18 و 19)** دیسپلازی سرویکس **(20)** و سرطان پستان **(21 و 22)** استفاده شده است، اما نقش رتینوئیک اسید در لیومیوم انسانی هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. در اولین مقالات ارایه‌شده در مورد اثر ATRA روی میوم، تفاوتی در پاسخ‌دهی یا الگوی بروز گیرنده‌های اسید رتینوئیک بین عضلات صاف طبیعی و لیومیوم دیده نشد **(23)**.

ATRA تکثیر سلول‌ها را از طریق اتصال به گیرنده‌های هسته‌ای مهار می‌کند **(24 و 25)** و آپوپتوز را القاء می‌کند **(26)**. در مطالعه کنونی اثر آپوپتوزیس داروی ATRA بر روی سلول‌های کشت داده‌شده میوم انسانی به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود. در مطالعات قبلی دیده شده که استفاده از لیگاند اختصاصی گیرنده رتینوئیک اسید می‌تواند باعث کاهش تعداد میوم‌های بزرگ از طریق افزایش آپوپتوز شود. از طرفی مسیر رتینوئیک اسید یکی از مسیرهای داخل سلولی دخیل در بسیاری از پروسه‌های بیولوژیک شامل تمایز، تکثیر و آپوپتوز است **(27)**.

نتیجه‌گیری

در مطالعه کنونی، اثر آپوپتوتیک داروی ATRA نسبت به گروه کنترل روی سلول‌های میوم کشت‌شده به‌طور معناداری بالاتر بود. نتایج فوق از این فرضیه که احتمالاً مسیر اسید رتینوئیک از مسیرهای اصلی دخیل در پاتوژنز لیومیوم است حمایت می‌کنند.

References

1. Berek JS. Berek and Novak's Gynecology. 15th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
2. Marino JL, Eskenazi B, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Gavoni N, et al. Uterine leiomyoma and menstrual cycle characteristics in a population-based cohort study. Hum Reprod . 2004;19:2350-5.
3. Kolankaya A, Arici A. Myomas and assisted reproductive technologies: when and how to act? Obstet Gynecol Clin North Am. 2006;33:145-52.
4. Malik M, Mendoza M, Payson M, Catherino WH.Curcumin, a nutritional supplement with antineoplastic activity, enhances leiomyoma cell apoptosis and decreases fibronectin expression. Fertil Steril. 2009;91(5 Suppl):2177-84
5. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. Environ Health Perspect. 2003;111(8):1037-54.
6. Hashimoto K, Azuma C, Kamiura S, Kimura T, Nobunaga T, Kanai T, et al. Clonal determination of uterine leiomyomas by analyzing differential inactivation of the X-chromosome-linked phosphoglycerokinase gene. Gynecol Obstet Invest. 1995;40(3):204-8.
7. Leppert PC, Baginski T, Prupas C, Catherino WH, Pletcher S, Segars JH. Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. Fertil Steril. 2004;82 Suppl 3:1182-7.
8. Englund K, Blanck A, Gustavsson I, Lundkvist U, Sj?blom P, Norgren A, et al. Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(11):4092-6.
9. Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. Hum Reprod. 1999;14(11):2844-50.

10. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. Fertil Steril. 2007;87(4):725-36.
11. Tsibris JC, Segars J, Coppola D, Mane S, Wilbanks GD, O'Brien WF, et al. Insights from gene arrays on the development and growth regulation of uterine leiomyomata. Fertil Steril. 2002;78(1):114-21.
12. Arslan AA, Gold LI, Mittal K, Suen TC, Belitskaya-Levy I, Tang MS, et al. Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. Hum Reprod. 2005;20(4):852-63.
13. Wilson AC, Meethal SV, Bowen RL, Atwood CS. Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. Expert Opin Investig Drugs. 2007;16(11):1851-63.
14. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, et al. Cell proliferation effect of GnRH agonist on pathological lesions of women with endometriosis, adenomyosis and uterine myoma. Hum Reprod. 2010;25(11):2878-90.
15. Wang Y, Matsuo H, Kurachi O, Maruo T. Down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis by gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured uterine leiomyoma cells. Eur J Endocrinol. 2002;146(3):447-56.
16. Zaitseva M, Vollenhoven BJ, Rogers PA. Retinoids regulate genes involved in retinoic acid synthesis and transport in human myometrial and fibroid smooth muscle cells. Hum Reprod. 2008;23(5):1076-86.
17. Boettger-Tong H, Shipley G, Hsu CJ, Stancel GM. Cultured human uterine smooth muscle cells are retinoid responsive. Proc Soc Exp Biol Med. 1997;215(1):59-65.
18. Gorsky M, Epstein JB. The effect of retinoids on premalignant oral lesions: focus on topical therapy. Cancer. 2002;95:1258-64
19. Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. Cochrane Database Syst Rev. 2004;6:15–16
20. Lengfelder E, Saussele S, Weisser A, Buchner T, Hehlmann R. Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2005;56:261-74
21. Decensi A, Serrano D, Bonanni B, Cazzaniga M, Guerrieri-Gonzaga A. Breast cancer prevention trials using retinoids. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2003;8:19-30
22. Shen Q, Brown PH. Novel agents for the prevention of breast cancer: targeting transcription factors and signal transduction pathways. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2003;8:45-73
23. Kang JL, Wang DY, Wang XX, Yu J. Up-regulation of apoptosis by gonadotrophin-releasing hormone agonist in cultures of endometrial cells from women with symptomatic myomas. Hum Reprod. 2010;25(9):2270-5.
24. Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. Curr Drug Metab. 2003;4(1):1-10.
25. Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. Cell Mol Life Sci. 2010;67(9):1423-45.
26. Szondy Z, Reichert U, Fésüs L. Retinoic acids regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. Cell Death Differ. 1998;5(1):4-10.
27. Malik M, Webb J, Catherino WH. Retinoic acid treatment of human leiomyoma cells transformed the cell phenotype to one strongly resembling myometrial cells. Clin Endocrinol (Oxf). 2008;69(3):462-70.