جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸
صفحات: ۴-۱

تاثیر ویروس روبلا (سوش RA 27/3) بر میزان همانندسازی DNA و تکثیر سلول‌های سرطان گلیوبلاستومای انسانی

شهرام زهتابیان* *MSc*

چکیده

اهداف. هدف این مطالعه، بررسی اثر مستقیم ویروس روبلا (سوش RA27/3) در کاهش همانندسازی و در نتیجه، کاهش تقسیمات میتوزی سلول‌های تومور سرطان گلیوبلاستوم انسانی (A-127) بود.

مواد و روش‌ها. ابتدا سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی و رده سلول‌های Hela در شرایط آزمایشگاهی و محیط DMEM با ۱۰٪ سرم آلبومین جنینی درغیاب ویروس به‌صورت فناناپذیری تکثیر یافتند. سپس بذر ویروسی تهیه و تیتر آن به روش میکروتیتر تعیین گردید. با تاثیر ویروس روبلا بر سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما، تغییرات تکثیر جمعیت سلولی در مقایسه با کنترل، به‌روش بررسی میزان استفاده از ۵- برومو-۲- دئوکسی اوریدین (به‌جای نوکلئوتید تیمیدین)، در ژنوم مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها. در سلول‌های آلوده به ویروس روبلا، بعد از جذب ویروس و شروع همانندسازی به‌ترتیب طی زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساعت، میزان جذب و مشارکت BrdU معادل ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۴۵، ۰/۵ و ۰/۶ ثبت گردید. در مقایسه با نمونه کنترل سلولی (بدون آلودگی ویروسی)، کاهش جذب این ماده که شاخص کاهش همانندسازی است، در ۶، ۸ و ۱۰ ساعت پس از آلودگی به ویروس، به‌ترتیب ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ کاهش را آشکار می‌سازد.

نتیجه‌گیری. ویروس روبلا توانایی بارزی در کاهش میزان همانندسازی و تکثیر سلول‌های سرطانی داشت، به‌صورتی‌که طی چند روز اولیه آلودگی، بدون تاثیرات لیز سلولی، به‌تدریج میزان همانندسازی و در نتیجه تکثیر و تقسیم سلولی را کاهش می‌دهد؛ لذا می‌توان از این ویروس به‌صورت تزریق مستقیم در بافت سرطانی یا به‌صورت سیستماتیک و تزریق عمومی در کاهش میزان تکثیر سلول‌های سرطانی بهره گرفت.

کلیدواژه‌ها: ویروس روبلا، سلول‌های گلیوبلاستوما، همانندسازی DNA، تکثیر سلولی

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۷، پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۵/۱۸

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران benjaminsh43@yahoo.com

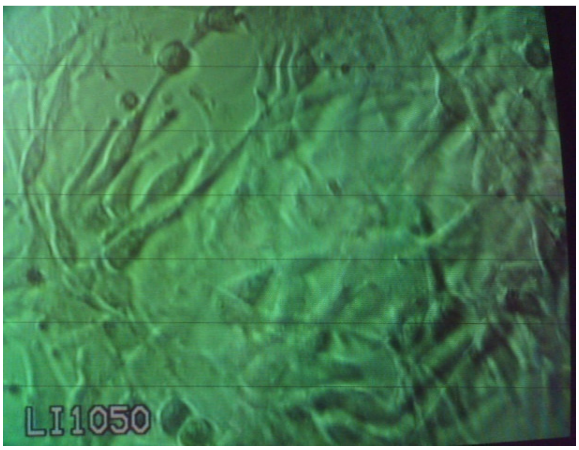
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

بررسی‌های گسترده روی گلیوبلاستوم یا آستروسیتوم بدخیم نشان می‌دهد که این نئوپلاسم‌ها، ۷۵٪ تومورهای گلیال بالغین را تشکیل داده و معمولاً در نیمکره‌های مغزی، مخچه و ساقه مغز یا طناب نخاعی با شدت‌های متفاوت مشاهده می‌شوند. شایع‌ترین علایم و نشانه‌های این نئوپلاسم‌ها تشنج، سردرد و نقایص عصبی متمرکز مرتبط با محل آناتومیک ضایعه و در نهایت مرگ است [۱]. درمان این نئوپلازی به‌صورت رایج با اعمال جراحی شروع و با شیمی درمانی ادامه می‌یابد که به‌طور معمول کلیه این اقدامات درمان قطعی نبوده و در واقع طول عمر بیمار را افزایش می‌دهند. لذا تحقیقات گسترده‌ای به‌منظور معرفی درمان‌های جدید برای این تومورها انجام گرفته است. تحقیقات اخیر استفاده از ویروس اختصاصی و مناسب در درمان مستقیم این ضایعات را پیشنهاد می‌کنند [۴، ۵، ۶]. امروزه با استفاده از ویروس‌ها می‌توان ضایعات را به‌صورت کاملا اختصاصی (گیرنده و ضدگیرنده) و نظام‌مند مورد هدف قرار داد، به‌صورتی‌که نهایتاً با ورود ویروس به سلول‌های در حال تقسیم میزان تقسیمات میتوز کاهش یابد [۷، ۸]. به این منظور، امروزه تزریق مستقیم ویروس سرخک، ویروس هرپس سیمپلکس و رتروویروس‌های نوترکیب برای کاهش میزان تقسیم سلول‌های توموری گلیوبلاستوما مورد استفاده و کاربرد قرار گرفته است [۳، ۴، ۵]. نقش ویروس روبلا در ایجاد تظاهرات مختلف در سیستم عصبی مرکزی با مکانیزم کاهش میزان تقسیمات میتوزی در سلول‌های در حال رشد و تقسیم به‌خصوص سلول‌های عصبی در بافت جنینی به اثبات رسیده است که عوارضی مانند عقب‌ماندگی ذهنی، میکروسفالی، کری عصبی و غیره را به دنبال دارد [۲، ۳]. بنابراین، کاهش تقسیمات سلولی احتمالا می‌تواند سلول‌های در حال تقسیم سرطانی را نیز مهار کند و با توجه به اینکه احتمال استفاده از روش یادشده طول عمر بیمار را افزایش می‌دهد، لذا زمان کافی برای جراحی، شیمی‌درمانی و سایر درمان‌ها را فراهم می‌آورد. بنابراین، باید مطالعات وسیع‌تری در امر تاثیر متقابل این ویروس‌ها بر سلول‌های عصبی گلیوبلاستوما به‌طور مستقیم در کشت سلولی و در شیشه انجام گیرد.

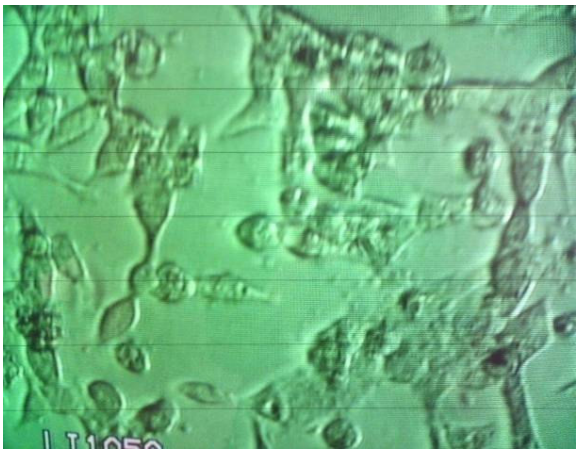
مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های گلیوبلاستوما و هلا: سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی A-127 و رده سلول‌های هلا از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و رده‌های سلولی یادشده در محیط DMEM (حاوی FBS ۱۰٪ همراه با پنی‌سیلین ۵۰u/ml و استرپتومایسین ۵۰µg/ml) در محیط ۵٪ دی‌اکسیدکربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. کشت اولیه در فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ml انجام گرفت و پس از کامل شدن و تهیه تک‌لایه مناسب، با استفاده از تریپسین، سوسپانسیونی از سلول‌های گلیوبلاستوما و هلا تهیه شد (شکل ۱).



شکل ۱) کشت سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی A-12 در فلاسک ۲۵میلی‌لیتری حاوی محیط DMEM

کشت ویروس و تهیه بذر ویروسی: نمونه ویروس به تک‌لایه سلول‌های هلا منتقل شد و پس از مرحله جذب و نفوذ ویروس، با اضافه نمودن محیط DMEM در انکوباتور ۳۳ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار گرفت. به‌تدریج، پس از ۸-۷ تا ۱۴ روز با ظهور علایم CPE (سلول‌ها کروی شده و از یکدیگر و همچنین از سطح فلاسک جدا می‌گردند، در این حالت سلول‌های معلق در مایع کشت سلولی در نهایت لیز شده و ویروس‌ها در محیط کشت رها می‌شوند) بذر ویروسی تهیه شد. سپس مقدار ویروس به روش میکروتیتراسیون سنجش شد و مشاهده CPE، در پلیت ۹۶چاهکه و تهیه رقت سریال از $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ از سوسپانسیون ویروسی همراه با FBS ۲٪ در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن طی ۱۴ روز انجام گرفت (شکل ۲).



شکل ۲) کشت ویروس در سلول‌های گلیوبلاستوما و ظهور اثرات سایتوپاتیک

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سنجش تکثیر و همانندسازی DNA سلول‌های گلیوبلاستوما: پس از کشت مجدد سلول‌های گلیوبلاستوما در فلاسک‌های کشت سلولی و تهیه سوسپانسیون سلولی با استفاده از تریپسین، سلول‌ها شمارش و در حجم یکسان به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه الایزا انتقال یافتند. پس از گذشت ۲ روز، تک‌لایه سلولی مناسب و یکنواختی در اکثر چاهک‌ها تشکیل شد. بعد از سه بار شست‌وشوی چاهک‌ها با بافر فسفات، سوسپانسیون ویروسی به تک‌لایه سلول‌های گلیوبلاستوما اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سوسپانسیون باقیمانده از سطح سلول‌ها برداشته شد و بعد از شست‌وشو با بافر فسفات، ۱۰µl محیط کشت DMEM ۱۰٪ به هر چاهک اضافه گردید. سپس، ۱۰µl BrdU به هر چاهک "سلول آلوده به ویروس" و چاهک کنترل (حاوی سلول‌های بدون آلودگی ویروسی) اضافه شد و پلیت‌های کشت سلول به‌مدت ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند.

به‌ترتیب و پس از طی هر یک از زمان‌های ذکر شده، محیط حاوی BrdU از سطح تک‌لایه چاهک‌ها تخلیه شد و با اضافه نمودن ۲۰۰µl محلول تثبیت‌کننده به هر چاهک، سلول‌ها تثبیت شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد، محلول تثبیت‌کننده از چاهک‌ها حذف و محلول نوکلئاز برای هضم نسبی DNA و دسترسی آنتی‌بادی BrdU به هر چاهک اضافه شد.

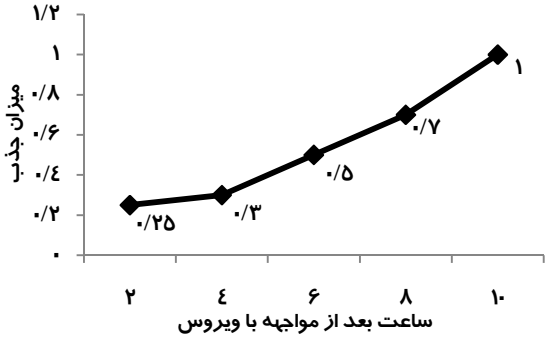
در مرحله بعد، ۱۰۰µl محلول کار ضدBrdU-POD به چاهک‌های سلولی اضافه شد و به‌مدت ۹۰ دقیقه در حرارت ۲۵ درجه قرار گرفت. سپس، محلول ضدBrdU-POD از چاهک‌های سلولی حذف و ۳ بار با بافر شست‌وشو داده شد. با اضافه نمودن محلول سوبسترای ABTS به هر چاهک، پلیت‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در انتها، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵nm با استفاده از دستگاه الایزا ریدر قرائت شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: میزان همانندسازی ژنوم سلول در کشت سلول‌های گلیوبلاستومای فاقد آلودگی ویروسی (کنترل منفی) در میکروپلیت‌های استاندارد از طریق روش الایزا و تعیین میزان جذب نوری در نمونه‌ها مشخص شد. در این مرحله آنتی‌برومودئوکسی‌یوریدین حاوی پروکسیداز به ژنوم اتصال می‌یابد و سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند که شدت رنگ ایجادشده برابر با میزان همانندسازی DNA است. تعیین میزان همانندسازی ژنوم در سلول‌های سرطانی آلوده به ویروس نیز در میکروپلیت‌های استاندارد حاوی کشت سلول‌های گلیوبلاستومای آلوده و با روش الایزا انجام گرفت. بعد از لیز سلول‌ها، آنتی‌برومودئوکسی‌یوریدین به DNA متصل شد. افزایش یا کاهش جذب نوری در سلول‌های لیزشده، معرف میزان شرکت برومودئوکسی‌یوریدین در همانندسازی ژنوم است.

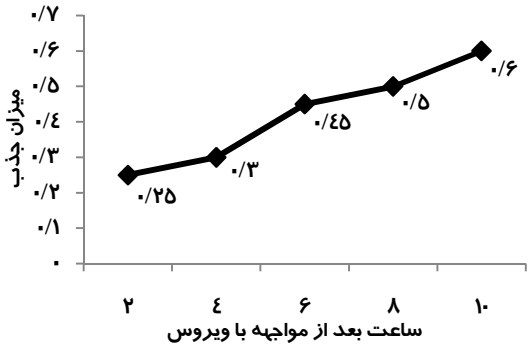
در انتها، اطلاعات حاصل از سلول‌های آلوده با نمونه‌های کنترل منفی مقایسه و افزایش یا کاهش همانندسازی در مجاورت ویروس مشخص شد.

نتایج

بیشترین میزان جذب نوری مربوط به نمونه‌های بدون آلودگی ویروسی بود و طی زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساعت، میزان جذب از ۰/۲۵ به ۱ افزایش یافت که بیانگر نفوذ BrdU به داخل ژنوم سلولی و افزایش همانندسازی طی زمان است (نمودار ۱). همچنین، در سلول‌های آلوده به ویروس روبلا طی زمان کشت، بعد از جذب ویروس و طی زمان ۴ ساعت از آلودگی ویروسی، میزان جذب نوری هر دو نمونه معادل ۰/۲۵ بود که تفاوتی در میزان جذب BrdU در سلول‌های آلوده به ویروس و کنترل مشاهده نشد که بیانگر آن است که در این زمان ویروس هنوز تاثیر قابل‌توجهی از لحاظ تداخل با فاکتورهای سلولی و کاهش روند همانندسازی نداشته است (نمودار ۲). اما طی ۴ ساعت پس از عفونت، کاهش جذب نوری قابل‌سنجشی رخ داد. در زمان‌های ۶، ۸ و ۱۰ ساعت پس از عفونت، جذب نوری به ترتیب برابر ۰/۴۵، ۰/۵ و ۰/۶ بود و با توجه به نمودار کنترل، جذب نوری در زمان‌های ۶، ۸، ۱۰ ساعت به‌ترتیب به میزان ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۴ کاهش یافت.



نمودار ۱) میزان جذب BrdU در سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی بدون آلودگی ویروسی



نمودار ۲) میزان جذب BrdU در سلول‌های آلوده به ویروس روبلا

بحث

افزایش تکثیر و تقسیم میتوز، همراه با کاهش تمایز در انواع سلول‌های نئوپلاسم، سیمای بارز سلول‌های سرطانی است که در نهایت سبب ایجاد بافت پیش‌رونده بدخیم می‌شود. یکی از عوامل مهم در این مرحله، کاهش رشد و تکثیر سلول‌های نئوپلاسم است که هدف نهایی تمامی درمان‌های مختلف برای کنترل سرطان است. البته لازم به یادآوری نیست که استفاده از شیمی‌درمانی و اشعه، تاثیر مهلکی بر تمامی سلول‌ها از جمله بافت‌های سالم و غیرهدف در کاهش میزان رشد به جا می‌گذارد. به‌طوری‌که در این درمان‌ها با افزایش طول عمر بیمار، انواع اثرات جانبی شدید ایجاد می‌شود که نهایتاً سیستم دفاعی و کنترلی بدن را مختل می‌نماید [۹]. استفاده از پاتوژن‌های طبیعی برای درمان نئوپلاسم، روش و تکنیک جدیدی است که طی چند سال گذشته گسترش یافته است. ویروس‌ها با دارا بودن توانایی بالقوه در کاهش رشد سلولی، ابزار بسیار مناسبی برای دستیابی به این هدف هستند. تزریق موضعی ویروس و ورود آن به سلول نئوپلاسم با استفاده از سوش‌های ویروسی ضعیف‌شده مانند سوش ویروس روبلای سازش‌یافته به سرما (با رشد طبیعی در ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رشد ناقص در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) تاثیر بارزی در کاهش رشد سلولی دارد. همچنین، استفاده از ویروس‌های جهش‌یافته که بالقوه خاصیت بیماری‌زایی نسبی خود را به سبب جهش در جایگاه‌های نوکلئوتیدی موثر در پاتوژنز ویروس از دست داده‌اند، دستیابی به این هدف را تحقق می‌بخشد.

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی A-127 در شرایط آزمایشگاهی مناسب و محیط کشت سلولی همراه با FBS ۱۰٪ به‌صورت فناناپذیر تکثیر می‌یابند و با تاثیر ویروس روبلا روی این سلول‌های سرطانی، میزان تکثیر و همانندسازی جمعیت سلولی، یعنی میزان مشارکت ماده BrdU (که به‌جای باز تیمیدین در همانندسازی وارد واکنش می‌گردد) در همانندسازی ژنوم سلول سرطانی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. ویروس روبلا (سوش RA 27/3) بدون ایجاد لیز سلولی واضح، به‌تدریج میزان تکثیر و تقسیم سلولی را کاهش می‌دهد. با توجه به اینکه ویروس واکسن روبلا، تاثیرات جانبی شدیدی برای فرد بیمار و سالم ایجاد نمی‌کند، لذا می‌توان از ویروس روبلای ضعیف‌شده (مورد استفاده در واکسن) به‌صورت تزریق مستقیم در بافت سرطانی یا به‌صورت نظام‌مند و تزریق عمومی برای کاهش نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی بهره برد.

نتیجه‌گیری

بر پایه نتایج این مطالعه و با توجه به تاثیر مستقیم ویروس‌ها و عفونت‌های ویروسی خاص طی نئوپلازی و تداخل این ویروس‌ها با مکانیزم سلول‌های سرطانی در جهت جلوگیری از تکثیر بی‌رویه آنها، این روش درمانی را می‌توان همراه با درمان‌های رایج (شیمی‌درمانی و پرتودرمانی) برای کاهش و کنترل تکثیر بی‌رویه سلولی و افزایش بقای بیمار به‌کار بُرد.

منابع

1- Anderson S. Pathology of nervous system. London: Churchill Livingstone; 2002. p. 2166-70.

2- David M, Peter M. Hawley field's virology. 4th ed. New York: Williams & Wilkins; 2001. p. 2399-460.

3- Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Edward Arnold; 1998. p. 309-24.

4- Liu C, Sarkaria JN, Petell CA, Paraskevakou G, Zollman PJ. Combination of measles virus virotherapy and radiation therapy has synergistic activity in the treatment of glioblastoma multiform. Clin Cancer Res. 2007;13(23):7155-65.

5- Allen C, Vongpunsawad S, Nakamura T, James CD, Schroeder M. Retargeted oncolytic measles strains entering via the EGFRvIII receptor maintain significant antitumor activity against gliomas with increased tumor specificity. Cancer Res. 2006;66(24):11840-50.

6- Hiraoka K, Kimura T, Logg CR, Tai CK, Lawson GW, Kasahara N. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model. Cancer Res. 2007;67(11):5345-53.

7- Todo T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. Front Biosci. 2008;13:2060-4.

8- Yeung SN, Tufaro F. Replicating herpes simplex virus vector for cancer gene therapy. Expert Opin Pharmacother. 2000;1(4):623-31.

9- Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma results of a phase I trial. Gene Ther. 2000;7(10):815-6.