مقایسه آپوپتوز در تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌سانان (TVT) قبل و بعد از شیمی درمانی با سولفات وین‌کریستین

یوسف دوستار[1*]، داریوش مهاجری[2]، رامین کفاش الهی[3]

۱. استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۳. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: doustar@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ٨٧/٦/٤، پذیرش نهایی: ٨٩/٣/٨)

چکیده

تومور مقاربتی قابل انتقال یک نئوپلاسم شایع در سگ‌سانان می‌باشد و با آمیزش جنسی و به صورت توده‌های متعدد نئوپلاستیک در دستگاه تناسلی خارجی در هر دو جنس اتفاق می‌افتد. تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌سانان دارای کاریوتایپ ویژه و غیرمعمول بوده و خاستگاه سلول مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد با توجه به نتایج ایمنوفنوتایپینگ، منشأ آنها هیستیوسیت‌ها باشند. در این مطالعه تعداد ۱۰ قلاده سگ که دارای تومور قابل انتقال مقاربتی بودند انتخاب گردید. شیمی درمانی نیز با تزریق وریدی تک دز سولفات وین‌کریستین (۰/۰۲۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن) انجام شد. نمونه‌برداری از تومور، قبل و بعد از شیمی‌درمانی جهت تهیه مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و تانل، برای ارزیابی آپوپتوز انجام شد. در آسیب‌شناسی بافتی، قبل از شیمی درمانی سلول‌های نئوپلاستیک به صورت توده‌های یک دست قابل مشاهده بودند. بعداز شیمی درمانی کاهش سلول‌های نئوپلاستیک از طریق وقوع آپوپتوز قابل مشاهده بود. آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان وقوع آپوپتوز، قبل و بعد از شیمی درمانی نشان داد ($p<۰/۰۰۳$). این مطالعه نشان داد که سولفات وین‌کریستین توانائی القاء آپوپتوز را در سلول‌های نئوپلاستیک تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌سانان دارد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ٤، شماره ۳، پیاپی ۱۵، صفحات: ۸۷٤-۸٦۹
کلید واژه‌ها: تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌ها، سولفات وین کریستین، آپوپتوز

مقدمه

تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌سانان (CTVT) یکی از تومورهای شایع در سگ‌سانان بوده و گسترش جهانی دارد. این تومور برای اولین بار در منطقه‌ای از اروپا بنام هاژارد در سال ۱۸۲۰ تشخیص داده شد و در آن زمان بنام استیگر سارکوما (Sticker's sarcoma) خوانده می‌شد (۳ و ۸). محل رشد تومور مربوط به دستگاه تناسلی سگ‌ها در هر دو جنس نر و ماده می‌باشد، اما به ندرت می‌تواند در سایر قسمت‌های بدن حیوان رخ دهد. کاشته شدن و متاستاز سلول‌های تومورال در مخاط آسیب دیده می‌تواند باعث رشد آن در مخاط دهان، بینی، کام نرم، مخرج و پوست بدن گردد. گسترش توده‌های نئوپلاستیک شایع نبوده ولی در سگ‌های مبتلا به لاغری مفرط و ضعف سیستم ایمنی احتمال وقوع بیشتری دارد (۳).

سلول‌های نئوپلاستیک دارای کاریوتایپ غیرعادی است و مطالعات ایمنوفنوتیپی نشان می‌دهد که احتمالاً تومور منشاء هیستیوسیتیک دارد. رشد این تومور ایمنی سلولی و هومورال را تحریک و حضور سلول‌های ایمنی اعم از لنفوسیت، ماکروفاژ و پلاسماسل‌ها در سیر قهقرائی تومور نقش دارند (۵). برای این تومور درمان‌های متعددی که هرکدام در شرایط خاص می‌تواند مؤثرتر باشد و غالباً از ترکیبی از آنها استفاده می‌شود. این درمان‌های عبارتند از ۱- جراحی ۲- پرتو درمانی و شیمی درمانی که معمولاً از داروی ضد میتوزی از جمله وین‌کریستین استفاده می‌شود (۱۰). هدف این مطالعه بررسی تغییرات آسیب شناختی در تومور مقاربتی قابل انتقال سگ سانان قبل و بعد شیمی درمانی می‌باشد که اختصاصاً برای شناسائی یکی از مهم‌ترین الگوهای مرگ سلولی یعنی آپوپتوز صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ قلاده سگ نر از نژاد مخلوط مبتلا به تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌سانان انتخاب و قبل و بعد از شیمی درمانی با وین‌کریستین (۲۵ میلی‌گرم/برای هرکیلوگرم وزن بدن) از توده‌های توموری در حال رشد بر روی غشای مخاطی دستگاه تناسلی (قبل از شیمی درمانی) و توده‌های در حال سیر قهقرائی رشد (بعد از شیمی درمانی) نمونه‌برداری و از آنها مقاطع بافتی مناسب جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و ایمنوهیستوشیمی تهیه گردید. مطالعه آسیب‌شناسی در مورد میزان تراکم سلولی در بستر تومور به صورت متغیر رتبه‌ای در نظر گرفته شد و با رتبه‌بندی میزان تراکم سلولی مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱) و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و میتوز سلولی در بستر تومور در هر دو مورد یعنی قبل و بعد از شیمی درمانی نیز به‌صورت متغیر کمی مدنظر قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه ۱۳ و آزمون غیرپارامتری ویلکاکسون از لحاظ آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نحوه اجرای تکنیک تشخیصی آپوپتوز با استفاده از کیت تانل (insitu cell death detection kit, POD، کمپانی Roche ،ساخت کشور آلمان)

ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین‌زدائی و آب‌دهی با پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر و با محلول واکنشگر تانل به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور و با محلول فسفات بافر شستشو داده شدند. در این مرحله مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول مبدل (۵۰ میکرولیتر) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر شستشو و با محلول دی آمینو بنزیدین تتراکلراید مجاور و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد مجدداً انکوبه گردیدند و نهایتاً مقاطع بافتی با فسفات بافر شستشو و با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند (۱).

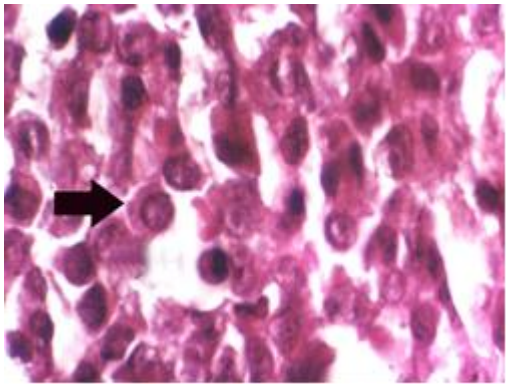
جدول ۱- رتبه بندی تغییرات تراکم سلولی در پارانشیم تومور

میزان تراکم سلول‌های پارانشیم تومور	کم	متوسط	زیاد
	۱	۲	۳

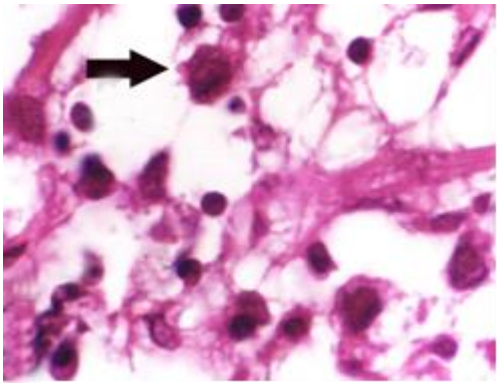
یافته‌ها

یافته‌های هیستوپاتولوژیک:

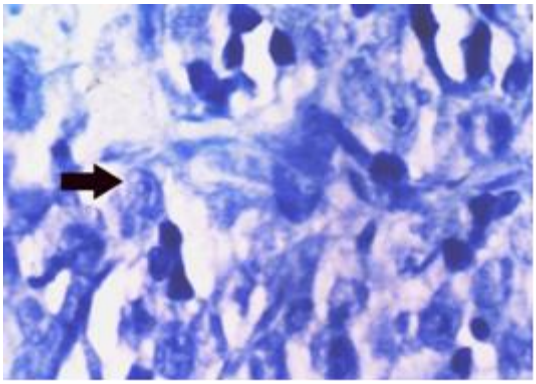
نتایج مطالعه میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین و ائوزین در نمونه‌های که قبل از شیمی درمانی از سگ‌های مبتلا تهیه شده بودند، نشانگر رشد سریع سلول‌های نئوپلاستیک با اشکال میتوزی فراوان و هسته هیپرکروماتیک بود. سیمای هیستوپاتولوژیک پارانشیم توموری پر سلول را نشان داد. ترابکول‌های همبندی نیز از کپسول پیرامون توده به قسمت‌های داخلی آن کشیده بودند (نگاره ۱). در نمونه‌های تیمار شده با داروی وین کریستین، پارانشیم تومور بسیار کم سلول بوده و از تراکم سلول‌های نئوپلاستیک به شکل چشمگیری کاسته شده بود و به نظر می‌رسید از تراکم رشته‌های کلاژن کاسته شده و هجوم سلول‌های لنفوسیتی نیز به‌طور واضح مابین سلول‌های نئوپلاستیک دیده می‌شد. سلول‌های توموری در حال مرگ با هسته‌های متراکم و تیره و تکه‌تکه پیکنوزه قابل تشخیص بودند (نگاره ۲). رنگ‌آمیزی تانل در نمونه‌های پیش از شیمی درمانی نشانگر تعداد بسیار کم سلول‌های دچار آپوپتوز و پارانشیم توموری بسیار پر سلول در مقطع تومور بود، حتی در بعضی از مقاطع عدم حضور سلول‌های دچار آپوپتوز در بین سلول‌های توموری کاملاً مشهود بود (نگاره ۳). در مورد نمونه‌هایی که پس از شیمی‌درمانی برداشته شده بودند، رنگ‌آمیزی تانل نشانگر تراکم کم سلول‌های توموری و اشکال متعدد از سلول‌های تانل مثبت بود که در آنها به صورت سلول‌های واکنشگر مثبت دی آمینوبنزیدین تتراکلراید مشاهده گردیدند (نگاره ٤).



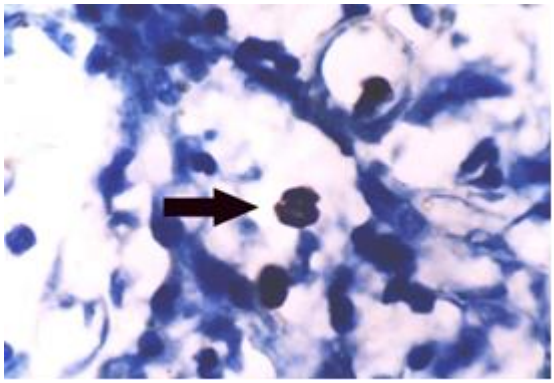
نگاره ۱– نمای ریزبینی از بافت تومور مقاربتی قابل انتقال سگ قبل از شیمی درمانی..به تراکم زیاد سلول‌های نئوپلاستیک با هسته هیپرکروم (پیکان) توجه نمائید. (هماتوکسیلین– ائوزین، بزرگنمائی٤٠٠×)



نگاره۲– نمای ریزبینی از بافت تومور مقاربتی قابل انتقال سگ بعد از شیمی درمانی..به کاهش تراکم سلول‌های نئوپلاستیک (پیکان) و هجوم لنفوسیت‌ها به همراه افزایش رشته‌های کلاژن در بستر تومور توجه نمائید. (هماتوکسیلین– ائوزین، بزرگنمائی٤٠٠×).



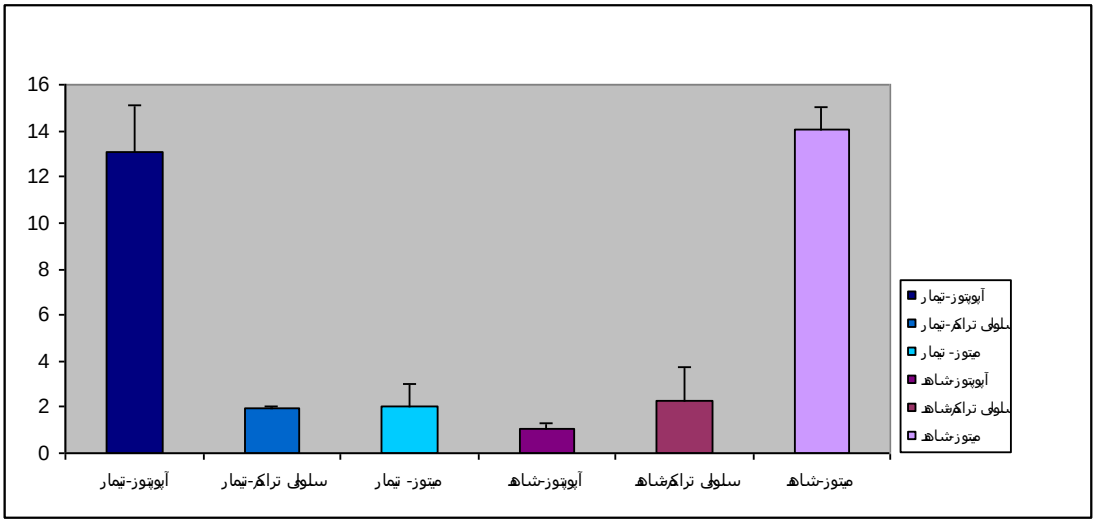
نگاره۳– نمای ریزبینی از بافت تومور مقاربتی قابل انتقال سگ قبل از شیمی درمانی که در آن سلول تانل مثبتی قابل مشاهده نمی‌باشد (پیکان). پارانشیم تومور دارای تراکم بالائی از سلول‌های نئوپلاستیک می‌باشد. (تانل با زمینه تولوئیدین بلو و بزرگنمائی٤٠٠×)



نگاره٤– نمای ریزبینی از بافت تومور مقاربتی قابل انتقال سگ بعد از شیمی درمانی که در آن سلول‌های تانل مثبت به رنگ قهوه‌ای تیره قابل مشاهده می‌باشد (پیکان). تراکم سلول‌های نئوپلاستیک کاهش محسوسی را نشان می‌دهد. (تانل با زمینه تولوئیدین بلو و بزرگنمائی٤٠٠×).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

بر اساس آزمون غیرپارامتری ویلکاکسون همواره اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۰۳$) از نظر رخداد آپوپتوز، تراکم سلولی در بستر تومور و میزان میتوز سلولی بین قبل و بعد از مداخله وجود داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱– مقایسه میزان رخداد آپوپتوز، تراکم سلولی در بستر تومور و میزان میتوز سلولی بین قبل و بعد از مداخله

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشانگر آن است که شیمی‌درمانی در تومور مقاربتی قابل انتقال سگ‌ها باعث کاهش تراکم سلولی در اثر آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود. مطالعات متعددی در زمینه نقش شیمی‌درمانی و کاهش رشد توده‌های توموری شده است که نتایج مطالعه حاضر با اغلب آنها همخوانی دارد. Dong و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که متعاقب شیمی درمانی با داروی وین‌کریستین بیان ژن mdr1 افزایش یافته که نتیجه آن تولید بیشتر گلیکوپروتئین پی یا P-gp (Polyglycoprotein-P) می‌باشد (٤). مطالعات نشان داده است که P-gp از طریق مسیر TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand.) باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های نئوپلاستیک و سلول‌های دچار ترانس فیکاسیون شده با mdr1 می‌شود (۹). تحریک رسپتورهای TRAIL باعث کاهش ATP و تحریک P-gp ATPase شده و از این طریق با کاهش میزان ATP سلولی و فعال شدن بیشتر پروتئین P-gp هیدرولیز عوامل ATP ر داده و نهایتاً با فعال شدن آنزیم‌های کاسپازی ٦، ۷، ۸ و ۹ و دپلاریزاسیون میتوکندری، آپوپتوز سلول‌های نئوپلاستیک اتفاق می‌افتد. داروی وین‌کریستین همچنین از سایر مسیرها نظیر: ۱- تحریک رونوشت‌برداری فاکتورهای مؤثر در القاء آپوپتوز ۲- تحریک دومن‌های FAS یا FADD (Fas associated death domain) ۳- فعال شدن عوامل PARP (Poly ADP-Ribose polymerase) و ICAD (Inhibitor of caspase activated DNAse) نیز در القاء آپوپتوز شرکت می‌کند (٦ و ۷). بنابراین اگر در مطالعه حاضر نیز متعاقب شیمی درمانی با داروی وین‌کریستین تغییرات آپوپتوز در بستر تومور به روش ایمنوهیستوشیمی قابل رویت می‌باشد، با بیان موارد اشاره شده می‌توان دلیل آن را به خوبی توجیح نمود. همچنین با حضور سلول‌های لنفوسیتی و ماکروفاژی در بافت تومور پس از شیمی درمانی و نقش مؤثر فاکتور نکروز دهنده تومور یا TNF که از ماکروفاژها آزاد می‌شود، می‌توان به توجیح مناسب دیگری برای رخداد آپوپتوز در موارد بعد از شیمی درمانی دست یافت. پر واضح است که با تأثیر داروی وین‌کریستن علاوه بر آپوپتوز، نکروز سلول‌های نئوپلاستیک نیز با تأثیر دارو بر میکروتوبول‌های دوک‌های میتوزی و تداخل در میزان خون-رسانی بافت تومورال می‌تواند از دیگر یافته‌های تأثیر این دارو بر بافت تومورال باشد (۲، ۵ و ۹). Yee و همکاران در سال ۲۰۰۷ نقش عوامل سرامیدی را در بروز آپوپتوز متعاقب شیمی درمانی بیان داشتند (۱۱). عوامل سرامیدی محصول متابولیسم اسفنگولیپیدی می‌باشند که از مسیر کاتپسین D و مهار پروتئین‌های کینازی و فعال نمودن BAX باعث خروج سیتوکروم C از میتوکندری‌ها شده و با فعال شدن آبشاری آنزیم‌های کاسپازی باعث آپوپتوز در بافت تومورال متعاقب شیمی درمانی می‌گردند (۱). Marchal و همکاران وی در سال ۲۰۰٤ نیز به اثرات خانواده STAT یا انتقال دهنده‌های سیگنال سلولی و فعال‌گر همانندی سازی و تولید پروتئین‌های القاگر آپوپتوز اشاره کردند. آنها بیان داشتند که با استفاده از داروهای شیمی درمانی، عوامل STAT (signal transducer and activator of transcription) با حضور عواملی همچون اینترفرون گاما و فاکتور نکروز دهنده تومور که از ماکروفاژ و لنفوسیت‌ها در بستر تومور آزاد می‌شوند، فعال شده و با بیان بیشتر فاکتور هسته‌ای و بیان ژن‌های مولد و تولید پروتئین‌های القاگر، آپوپتوز متعاقب شیمی درمانی در بافت تومورال اتفاق می‌افتد (۷). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات سایر محققین تا حدودی همخوانی دارد. امید است با توجه به اهمیت بیماری‌های سرطانی و افزایش وقوع آن در بین جمعیت انسانی و دامی با شناخت مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوز سلول‌های سرطانی، راهکارهای مؤثرتری جهت درمان بیماری‌های سرطانی معرفی گردد.

منابع

۱. دوستار، ی. ۱۳۸۳. مطالعه آزمایشی آپوپتوز القاء شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها با استفاده از متد تشخیصی TUNEL و میکروسکوپ الکترونی. پایان‌نامه جهت دریافت دکترای تخصصی دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، شماره ۱۸۹.

2. Banguley, B.C., Holdaway, K.M. and Thomson, L.L. 1991. Inhibition of growth of colon 38 adernocarcinoma by vinblastine and colchicines: evidence for a vascular mechanism. Eur J Cancer. 27:482-487.
3. Batamuzi, E.K., Bittegeko, S.B.P. 1991. Anal and perianal transmissible venereal tumor in a bitch. Veterinary Record. 129:556.
4. Dong, L.i., Seong, H.J. and Jonghan, K. 2001. Enhanced drug-induced apoptosis associated with P-Glycoprotein overexpression is specific to antimicrotubule agents. Pharmaceutical Res. 20:45-50.
5. Hill, S.A., Lonergan, S.J. and Denekam, P.J. 1993. Vinca alkaloids: anti-vascular effects in a murine tumour. Eur. J. Cancer. 29:1320-1324.
6. Mukaratirwa, S. and Gruys, E. 2004. Canine transmissible veneral tumour:cytogenetic origins immunophenotypes and immunobiology.Published in veterinary quarterly. 25:101-111.
7. Marchal, T., Chabanne, L. and Kaplanski, C. 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. Veterinary Immunology and Immunopathology. 57:1-11.
8. Michelle, T., Clodagh, E. and Finnegan, K.M. 2004. A modulator of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Research. 64:8357-8364.
9. Park Soo-jang, Wu ching-Huang and Najafi F. 2006. P-Glycoprotein enhances TRAIL-triggered apoptosis in multidrug restant cancer cells by interacting with the death receptor DR5. Biochemical Pharmacology. 72:293-307.
10. Takano, Y., Okudaira, M. and Harman, D. 1993. Apoptosis induced by microtubule disrupting drugs in cultured human lymphoma cells; inhibitory effects of phorbol ester and zing sulphate. Cancer Research. 189:197-203.
11. Yee-Shin Lin and Chiou-Feng Lin. 2007. Ceramide in apoptotic signaling and anticancer therapy. NCKU Medicine. 18:7-10.