

اثر تجویز هم‌زمان عامل محرک کلونی گرانولوسیت و اینترفرون آلفا بر پوکی استخوان

دکتر رویا لاری^۱، سیما جهانبخشی^۲، الهه محمدی^۳، دکتر علی میرشاهی^۳، دکتر ناصر مهدوی شهری^۴،دکتر علی مقیمی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پوکی استخوان، یکی از علایم پاتولوژیک عمده‌ی آرتریت روماتوئید (RA یا Rheumatoid arthritis) و برخی از سرطان‌ها است. عامل محرک کلونی گرانولوسیت (Granulocyte-colony stimulating factor یا G-CSF) و اینترفرون- α (IFN- α یا Interferon-alpha) به طور گسترده‌ای در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان دارو استفاده می‌شود و همچنین، نقش کلیدی این عوامل در RA شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر هم‌زمان این عوامل بر پوکی استخوان بود.

روش‌ها: برای این منظور از ۲۸ سر موش (Mus musculus) (نر، هشت هفته) که به طور تصادفی در چهار گروه ۷ تایی تقسیم شدند، استفاده شد. تیمار به صورت روزانه با تزریق زیر جلدی روزانه با آب مقطر به عنوان شاهد، IFN- α (۱۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$) و همچنین G-CSF (۲۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$) به همراه یا بدون IFN- α (۱۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$) به مدت ۲۸ روز انجام شد. پس از کشتن موش‌ها، رادیوگرافی استاندارد از استخوان ران گرفته شد و بررسی‌ها توسط نرم‌افزار Image J برای اندازه‌گیری تراکم استخوان فمور ران مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، چگالی استخوان فمور ران با استفاده از MDCT (Multiple detector computed tomography) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، G-CSF تراکم استخوان را به طور موضعی در ناحیه‌ی سر و تروکانتر بزرگ در استخوان فمور کاهش داد. از طرف دیگر، IFN- α به تنهایی موجب افزایش تراکم استخوان در ناحیه‌ی تروکانتر بزرگ و همچنین افزایش حجم استخوان تراکولار شد. این عامل همراه با G-CSF به شدت تراکم استخوان را افزایش داد و همچنین موجب افزایش حجم استخوان تراکولار شد.

نتیجه‌گیری: تجویز IFN- α می‌تواند در کاهش پوکی استخوان در اثر G-CSF، در شرایط التهابی و درمانی مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: پوکی استخوان، Interferon-alpha، Granulocyte-colony stimulating factor، رادیوگرافی، Multiple detector computed tomography

ارجاع: لاری رویا، جهانبخشی سیما، محمدی الهه، میرشاهی علی، مهدوی شهری ناصر، مقیمی علی. اثر تجویز هم‌زمان عامل محرک کلونی

گرانولوسیت و اینترفرون آلفا بر پوکی استخوان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۳۴): ۷۱۳-۷۰۳

مقدمه

پوکی استخوان در شرایط پاتولوژیک مثل بیماری‌های متابولیک و التهابی، حاصل ازدیاد و فعالیت

استئوکلاست می‌باشد. عوامل التهابی از عواملی هستند که با تأثیر بر روی استئوکلاست‌ها، خوردگی استخوان در حالت‌های پاتولوژیک مانند رماتیسم

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی- بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

مفصلی را کنترل می‌کنند. خوردگی استخوان، می‌تواند به صورت محلی و یا عمومی بروز کند که در هر صورت، عواقب آن هیپرکلسمی و عدم تعادل مواد معدنی است که منجر به درد، ساییده شدن استخوان و در نهایت شکستگی استخوان و حتی مرگ بر اثر آن می‌شود (۱). در این مطالعه، اثر عوامل محرک کلونی گرانولوسیت یا (Granulocyte-colony stimulating factor) یا (G-CSF) و اینترفرون-الفای (IFN- α) بر روی پوکی استخوان بررسی شد. این عوامل به طور وسیعی در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان دارو استفاده می‌شوند و همچنین نقش کلیدی آن‌ها در بیماری آرتریت روماتوئید (روماتیسم مفصلی) اثبات شده است (۲).

G-CSF یکی از سایتوکاین‌های خون‌ساز است که به طور عمده توسط سلول‌های مونوسیت و ماکروفاژ تولید می‌شود (۳). گیرنده‌ی این عامل در انواع سلول‌ها از جمله مونوسیت‌ها و ماکروفاژها بیان می‌شود و اتصال گیرنده با عامل G-CSF، موجب تکثیر و تمایز این سلول‌ها می‌شود (۳). اگر چه در حالت طبیعی، میزان بیان G-CSF بسیار پایین است (۴) و موش‌های فاقد عامل G-CSF ($G-CSF^{-/-}$)، عارضه‌ی پاتولوژیکی عمده‌ای به جز نوتروپنی مزمن نشان ندادند (۵).

گزارش‌های متعدد، بیانگر افزایش بیان عامل G-CSF در بیماری‌های التهابی نظیر آرتریت روماتوئید می‌باشد (۶-۷). تحقیقات نشان داده است که افزایش در سرم و مایع سینوویال بیماران آرتریت روماتوئید، با شدت بیماری نسبت مستقیم دارد (۴). این عامل به عنوان یک عامل کلیدی در پاتوژنز بیماری آرتریت روماتوئید مطرح شده است (۷). از طرف دیگر، عامل G-CSF به طور گسترده به

عنوان دارو در طول شیمی درمانی سرطان استفاده می‌شود. تزریق زیر جلدی G-CSF تکثیر سلول‌های خون‌ساز اولیه شامل میلو بلاست‌ها، پرومیلو بلاست‌ها و میلو سیت‌ها را تحریک می‌کند. همراه با این تغییر، فراخوانی سلول‌های پیش‌ساز اولیه که در مغز استخوان و طحال به وجود آمده‌اند نیز وجود دارد. به عبارت دیگر، این عامل موجب افزایش آزادسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز به گردش خون محیطی می‌شود. این اثر در تکثیر و کشت سلول‌های خونی جهت انتقال خون به کار گرفته می‌شود و در جهت مقابله با انواع عفونت‌های بعد از شیمی درمانی استفاده می‌گردد (۸-۹). این عامل در ایران نیز به طور گسترده استفاده می‌شود.

در محدود تحقیقات انجام شده در زمینه‌ی اثر بر روی پوکی استخوان، نشان داده شده است که درمان طولانی مدت با G-CSF باعث افزایش قابل توجه استئوپروز می‌باشد که با کاهش تراکم معدنی استخوان همراه است. شواهدی وجود دارد که استئوپروز، با تحریک فعالیت استئوکلاست همراه است (۱۰). G-CSF تعداد استئوکلاست‌ها را در موش افزایش می‌دهد و موجب افزایش سطح Deoxy pyridinoline ادرار در انسان است (۱۱). در موش‌های ترنسژنیک برای G-CSF افزایش تعداد استئوکلاست‌ها و بروز پوکی استخوان مشاهده شده است (۱۰).

برای افزایش استئوکلاست‌ها توسط G-CSF، مکانیسم‌های متعددی پیشنهاد شده است. G-CSF باعث افزایش سلول‌های مغز استخوان و به دنبال آن، افزایش گروه‌های پیش‌ساز مونوسیتی سازنده‌ی استئوکلاست می‌شود (۱۲). علاوه بر این، G-CSF به طور مستقیم موجب ازدیاد استئوکلاست و فعالیت آن

افزایش تراکم استخوان در بیماران هیپاتیت B و C می‌شود (۲۱-۲۰). این اثر، همچنین در بیماران لوپوس اریتماتوس سیستمیک نیز مشاهده و پیشنهاد شده است که IFN- α سلول‌های اجدادی مونوسیت/ماکروفاژی را به سمت تمایز به سلول‌های دندریتیک هدایت می‌کند و از این طریق، موجب کاهش تمایز استئوکلاست‌ها می‌شود و در نتیجه، کاهش پوکی استخوان در این بیماران را به دنبال دارد (۲۲). در این مطالعه، اثر G-CSF بر تراکم استخوان مورد بررسی قرار گرفت و همچنین بررسی شد که «آیا هم‌زمانی مصرف IFN- α و G-CSF می‌تواند موجب جلوگیری از کاهش تراکم استخوان شود؟».

روش‌ها

در این پژوهش، ۲۸ سر موش (Mus musculus) جنس نر بالغ (سن ۸ هفته و محدوده‌ی وزنی ۳۳-۳۰ گرم) از حیوان‌خانه‌ی دانشگاه علوم پزشکی مشهد گرفته شد. حیوانات مورد آزمایش به صورت گروه‌های ۷ تایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف، محیطی با دمای 21 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، چرخه‌ی روشنایی به $12:12$ ساعت و رطوبت 50 ± 5 درصد نگهداری شدند. آب و غذای مورد نیاز آن‌ها به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت. تمام مراحل آزمایش با رعایت اصول اخلاقی و مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

تزریق صفاقی در ۲۸ روز متوالی به شرح زیر انجام شد: به گروه یک، G-CSF ($200 \mu\text{g/Kg}$) تزریق شد. به گروه‌های دوم و سوم، اینترفرون آلفا ($10 \mu\text{g/Kg}$) \pm G-CSF ($200 \mu\text{g/Kg}$) تزریق شد. به حیوانات در گروه شاهد، حامل (آب مقطر) تنها

در *In vitro* می‌گردد (۱۳). در موش، این عامل منجر به کاهش در تعداد استئوبلاست‌ها در استخوان و همچنین کاهش سطح قابل توجهی از کموکاین‌ها و استئوکلسین تولید شده توسط استئوبلاست‌ها می‌شود. این داده‌ها نشان می‌دهد که G-CSF باعث کاهش فعالیت استئوبلاست‌ها در محیط *In vivo* می‌شود (۱۴).

از طرف دیگر، اینترفرون‌ها به عنوان عوامل ضد التهابی شناخته می‌شوند (۱۵). این عوامل، در مهار تکثیر سلول‌ها نقش دارند. در این ویژگی اینترفرون آلفا و بتا از اینترفرون گاما قوی‌تر هستند. تأثیر دیگر اینترفرون، افزایش بروز مولکول‌های MHC (Major histocompatibility complex) بر سطح سلول‌ها است. IFN- α جهت مصرف بالینی در نئوپلاسم‌های گوناگون از جمله لوسمی سلول مویی (Hairy cell leukemia)، لوسمی میلوژن مزمن (Chronic myelogenous leukemia)، ملانوم بدخیم (Malignant melanoma)، سارکوم کاپوزی (Kaposi sarcoma) و عفونت‌های هیپاتیت B و C مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶). همچنین در کارسینوم سلول کلیوی (Renal cell carcinoma)، به طور وسیعی استفاده می‌شود (۱۷).

IFN- α در محیط *In vitro* موجب کاهش استئوکلاستورژن می‌شود. هنگامی که سلول‌های اجدادی استئوکلاست انسانی در محیط تمایزی استئوکلاست همراه با IFN- α قرار گرفتند، میزان تمایز به استئوکلاست کاهش داشت (۱۸). همچنین، عدم وجود گیرنده‌ی IFN نوع یک در موش، موجب افزایش تمایز استئوکلاست‌ها در سلول‌های اجدادی آن‌ها می‌شود (۱۹).

در شرایط *In vivo* مصرف IFN- α موجب

تزریق شد. وزن هر حیوان در ابتدا و انتهای آزمایش ثبت شد. بعد از اتمام این دوره، حیوانات در دستگاه دسیکاتور و با رعایت اصول اخلاقی بعد از آخرین تزریق کشته شدند و استخوان ران پای راست بلافاصله بعد از خروج و پاک‌سازی، جهت سنجش تراکم استخوان در دمای 20°C - نگهداری شد. استخوان ران پای چپ، جهت مطالعات بافتی استفاده گردید.

راديوگرافي كل استخوان

تراکم در استخوان فمور پس از حذف بافت نرم اطراف استخوان، اندازه‌گیری شد. برای سنجش تراکم کل استخوان، رادیوگرافی جانبی فمور با استفاده از یک دستگاه اشعه‌ی X (Siemens® MULTIX TOP) و فیلم ماموگرافی با وضوح بالا Kodak® به دست آمد. آلومینیوم Step-wedge شامل 15 Step با افزایش ضخامت 0.25 mm در هر Step، در یک موقعیت ثابت در نوار رادیوگرافی در همان سطح به عنوان مبنا در نظر گرفته شد و به طور هم‌زمان، با استخوان‌ها در معرض اشعه قرار گرفت. در تصویر نهایی با استفاده از نرم‌افزار Image J، شدت متوسط پیکسل برای هر قسمت به نسبت اندازه‌گیری شدت جذب آلومینیوم محاسبه شد. برای جلوگیری از تغییرات جزئی ناشی از پیکسل‌های غیر اختصاصی، مربع بر روی صفحه‌ی نمایش خالی (بدون استخوان) قرار داده شد و به عنوان 0 mm در نظر گرفته شد. تمام اندازه‌گیری‌های بعدی ساخته شده در هر تصویر، بر اساس میلی‌متر معادل آلومینیوم کالیبره شد. با استفاده از Image J، کل استخوان فمور به عنوان یک منطقه‌ی مورد نظر انتخاب و متوسط تراکم رادیوگرافی برای هر استخوان اندازه‌گیری شد و با واحد میلی‌متر آلومینیوم بیان شد. گزارش‌های قبل نشان می‌دهد که Step

سنجش تراکم استخوان

چگالی استخوان فمور ران با استفاده از MDCT (MaxViewer Neusoft, NeuViz 16, Shenyang, China) اندازه‌گیری شد. اسکن در فواصل متوالی 0.4 mm مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نرم‌افزار دستگاه، تجزیه و تحلیل شد. دقیق‌تر بودن این روش در مقایسه با DEXA نشان داده شده است (25). همچنین، استفاده از این روش برای محاسبه‌ی BMD (Bone mineral density) حیوانات کوچک در گذشته توسط Wang و همکاران گزارش شده است (26).

مطالعات بافت‌شناسی

جهت بررسی تغییرات بافتی حاصل از تیمارهای انجام شده، ناحیه‌ی اپی‌فیز دیستال فمور پای چپ مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق، از فیکساتور فرمالین 10 درصد جهت تثبیت نمونه‌ها استفاده شد. به منظور گرفتن کلسیم و نرم کردن بافت استخوان مورد نظر (فمور پای چپ)، از محلول اسید نیتریک 10 درصد (به مدت سه تا چهار روز همراه با تعویض روزانه‌ی محلول گیرنده‌ی کلسیم) استفاده شد. بافت فمور مورد نظر پس از نرم شدن، توسط تیغ به سه قسمت مجزا تقسیم شد. بخش اپی‌فیز دیستال فمور جدا شد و به جهت رفع اثر اسید نیتریک، برای مدت یک روز در محلول سولفات سدیم 5 درصد و سپس به مدت یک روز در جریان آب جاری قرار گرفت. بعد از این مرحله، بافت‌ها وارد مرحله‌ی آب‌گیری با درجات صعودی الکل شامل 70، 80، 90 و 96 درصد شدند.

دو با هم ($38/78 \pm 5/06$ گرم)، در مقایسه با گروه شاهد ($39/33 \pm 6/18$ گرم)، اثرات قابل توجهی بر وزن بدن موش‌ها نداشتند.

سنجش تراکم استخوان فمور

سنجش تراکم استخوان فمور در ناحیه‌ی سر، گردن و تروکانتر بزرگ دو بعد عرضی و فرونتال مورد بررسی قرار گرفت. اثر G-CSF در کاهش تراکم استخوان در ناحیه‌ی گردن معنی‌دار نبود، اما در قسمت سر و تروکانتر بزرگ، کاهش تراکم استخوان مشاهده شد ($P < 0/050$) (شکل ۱ A و B).

با این حال، نتایج فرونتال نشان داد که IFN- α به طور قابل توجهی تراکم استخوان در ناحیه‌ی تروکانتر بزرگ فمور را افزایش داده است ($P < 0/010$) (شکل ۱ C).

همچنین، بررسی عرضی تراکم استخوان نیز نشان داد که G-CSF افزایش تراکم استخوان توسط IFN- α در تروکانتر بزرگ را کاهش می‌دهد ($P < 0/050$) (شکل ۱ C).

سنجش تراکم کل استخوان

تراکم کل استخوان نیز با روش رادیوگرافی سنجیده شد. G-CSF به تنهایی موجب کاهش معنی‌دار تراکم کل استخوان نشده بود. اما نکته‌ی قابل توجه این‌که تراکم کل استخوان در حضور IFN- α همراه با G-CSF، به صورت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت (شکل ۲).

هیستومورفومتری استخوان بر روی برش‌های

عرضی و تصادفی بخش اسفنجی استخوان فمور

برای بررسی درصد استخوان تراکولار، سطح تیغه‌های اسفنجی اندازه‌گیری شد. نسبت این سطح از

به منظور آغشتگی با پارافین، نمونه‌ها پس از خروج از بوتانول در داخل بشر حاوی پارافین مذاب در انکوباتور با دمای 56°C به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس جهت قالب‌گیری، داخل قالب‌های آلومینیومی کوچک پارافین مایع ریخته شد. برش‌گیری به وسیله‌ی دستگاه میکروتوم (مدل Leitz ۱۵۱۲) انجام شد و برش‌هایی به ضخامت $5-6 \mu$ از قالب‌های پارافینی تهیه شدند. نمونه‌ها با هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

برای بررسی اثر تیمارهای انجام شده بر مساحت تیغه‌های استخوانی بافت اسفنجی اپی‌فیز فمور، از هر گروه پنج نمونه به طور تصادفی انتخاب شد و به کمک نرم‌افزار Image J، مساحت تیغه‌ها در هر نمونه و همچنین مساحت کل بافت اسفنجی در نمونه‌ی عکس مورد نظر محاسبه شد. در پایان، مساحت تیغه‌ها به مساحت کل تقسیم و درصد سطح تیغه‌های هر نمونه محاسبه گردید.

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و پس از بررسی توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov انجام گرفت.

مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون آماری t در سطح معنی‌داری $P < 0/050$ واکاوی شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم گردید.

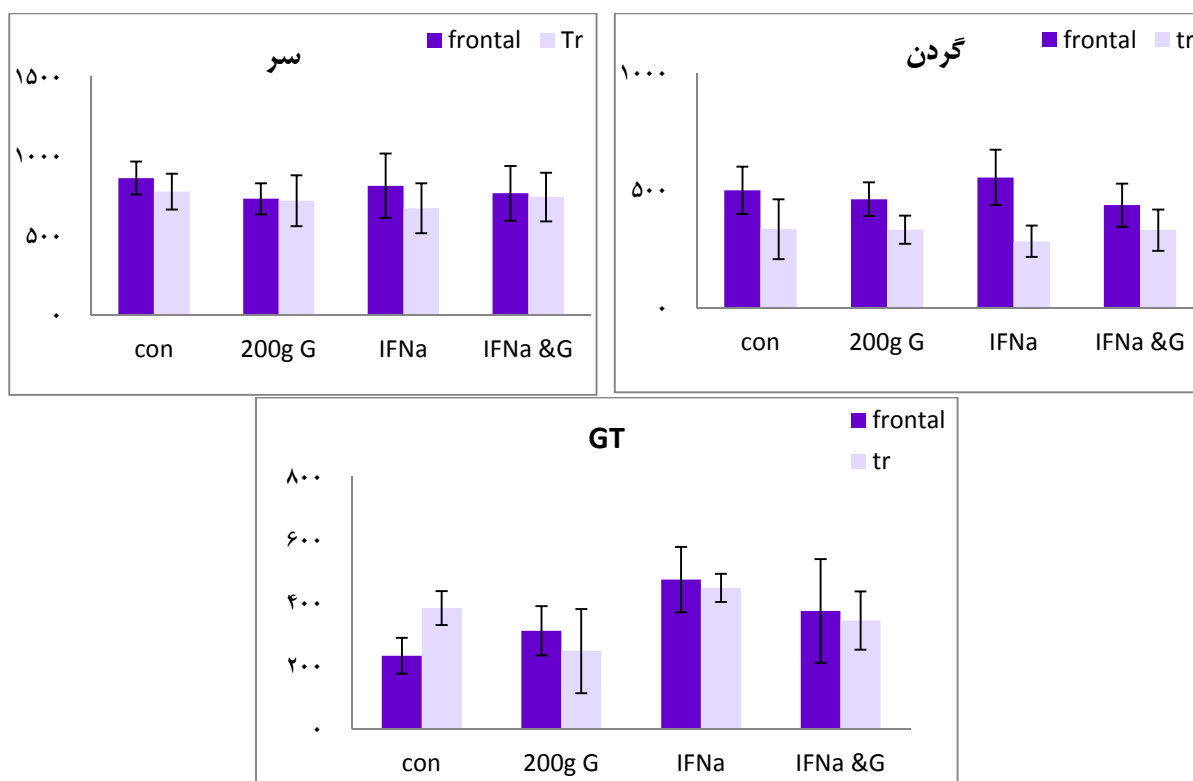
یافته‌ها

اثر G-CSF و IFN- α بر وزن بدن موش‌ها

بررسی اثر تیمارهای انجام گرفته بر موش‌ها نشان داد که هیچ کدام از عوامل G-CSF ($38/14 \pm 2/42$ گرم)، IFN- α ($39/00 \pm 4/17$ گرم) به تنهایی یا هر

نشان داد که در بخش اسفنجی استخوان فمور، افزایش حجم استخوان‌ها در مجاورت IFN- α نسبت به گروه شاهد معنی‌دار می‌باشد (شکل ۳).

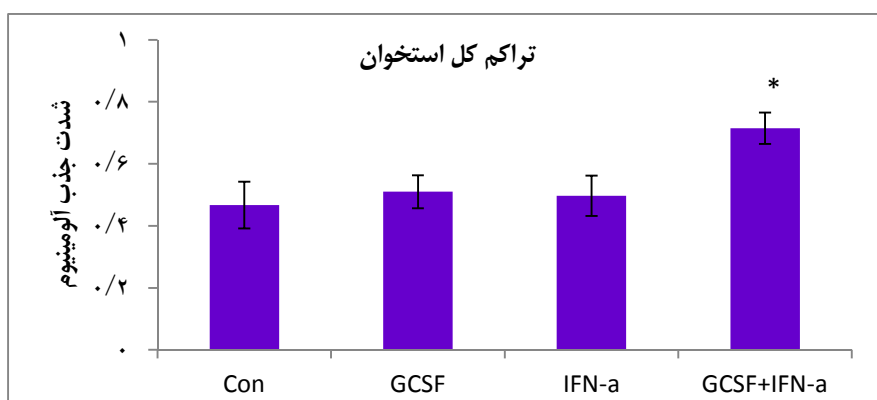
کل استخوان اسفنجی، به صورت درصد محاسبه شد، که نشان دهنده‌ی درصد سطحی است که توسط تیغه‌های تراپکولار اشغال شده است. نتایج حاصل



شکل ۱. سنجش تراکم استخوان فمور در ناحیه‌ی سر، گردن و تروکانتر بزرگ در دو بعد فرونتال (Frontal) و عرضی (Transverse)

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند. * ($P < 0/050$) و ** ($P < 0/010$) نسبت به گروه شاهد

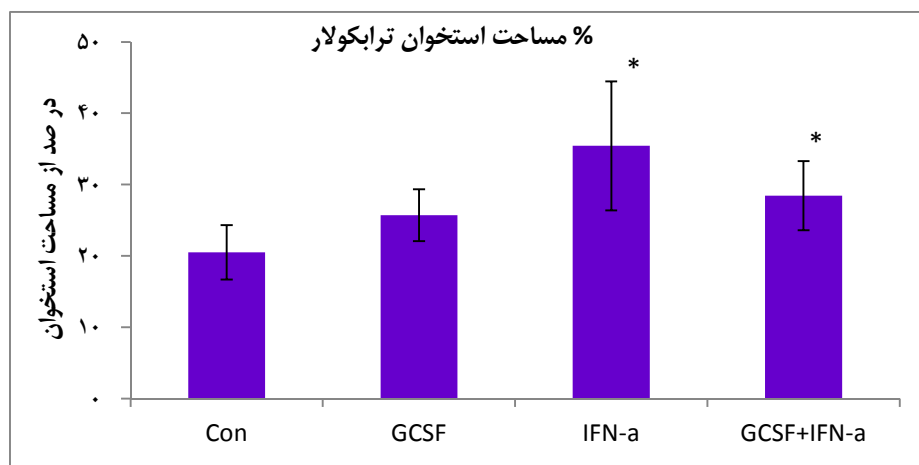
G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; IFN- α : Interferon-alpha



شکل ۲. رادیوگرافی سنجش تراکم کل استخوان فمور به نسبت شدت جذب آلومینیوم

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند. * ($P < 0/050$) نسبت به گروه شاهد

G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; IFN- α : Interferon-alpha



شکل ۳. هیستو مورفومتری استخوان بر روی برش‌های عرضی و تصادفی بخش اسفنجی استخوان فمور و

اندازه‌گیری درصد سطح اشغال شده توسط تیغه‌های تراپکولار

داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده‌اند؛ * ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل

G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; IFN- α : Interferon-alpha

همچنین در درمان هیپاتیت مزمن B و هیپاتیت مزمن C استفاده می‌شود (۲۱-۲۰). پوکی استخوان، از عوارض مزمن بسیاری از بیماری‌های التهابی می‌باشد (۲). تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ی متابولیسم اثر IFN- α انجام شده است که به طور عمده در مدل‌های *In vitro* بوده است (۲۷). اگر چه هنوز مکانیسم دقیق عملکرد این عامل مشخص نیست؛ با این حال، اغلب تحقیقات *In vitro* و *In vivo* بیانگر کاهش پوکی استخوان توسط IFN- α می‌باشد (۲۸، ۲۰). بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، اثر این عامل به طور هم‌زمان با G-CSF مورد بررسی قرار گرفت، با این هدف که بررسی شود «آیا استفاده از IFN- α می‌تواند پوکی استخوان احتمالی ناشی از G-CSF را خنثی کند؟».

نتایج مطالعه‌ی حاضر، بیانگر کاهش موضعی تراکم استخوان در اثر G-CSF بود. این کاهش به طور عمده در ناحیه‌ی سر و تروکانتر بزرگ مشاهده

بحث

با وجود استفاده‌ی گسترده از عامل G-CSF در بیماران مبتلا به سرطان و همچنین، بالا رفتن میزان ترشح این عامل در بیماری‌هایی مثل رماتیسم مفصلی، اثر این عامل بر پوکی استخوان و تمایز استئوکلاست‌ها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به این که پوکی استخوان به عنوان یکی از پاتوژن‌های اصلی در بیماری رماتیسم مفصلی و همچنین در بعضی از انواع سرطان‌ها مانند سرطان سینه محسوب می‌شود، مطالعه در مورد اثر G-CSF بر روی ایجاد پوکی استخوان در شناخت بهتر این عارضه در این بیماری‌ها مهم است. همچنین، محدودیت تحقیقات در این زمینه و نیز استفاده‌ی گسترده از این عامل، نیاز به بررسی بیشتر در این مورد را مبرهن می‌دارد.

IFN- α نیز دارای کاربردهای بالینی متعدد است و به طور گسترده در درمان انواعی از سرطان‌ها و

اگر چه کاهش تراکم استخوان حاصل از G-CSF را در این منطقه جبران کرد، اما این افزایش تراکم از اثر IFN- α به تنهایی کمتر بود. این اثر در افزایش سطح تیغه‌های استخوانی نیز قابل ملاحظه است. اثرگذاری مهار کننده‌ی IFN- α بر روی پوکی استخوان در بیماری‌های ویروسی هپاتیت B و C مشاهده شده بود (۲۰-۲۱).

به طور کلی بر اساس یافته‌های این مطالعه، IFN- α می‌تواند تا حد زیادی کاهش تراکم استخوان ناشی از میزان بالای G-CSF را جبران کند.

نتیجه‌گیری

G-CSF موجب کاهش موضعی تراکم استخوان در ناحیه‌ی سر و تروکانتر بزرگ شد. موضعی بودن کاهش تراکم حضور، شاید به دلیل درصد بالاتر استخوان متراکم در سنجش تراکم کل استخوان ران بوده است. IFN- α به تنهایی، موجب افزایش تراکم موضعی استخوان در ناحیه‌ی تروکانتر و همچنین، موجب افزایش حجم تیغه‌های استخوانی شد. این عامل در مجاورت با G-CSF کاهش تراکم استخوان حاصل از G-CSF را در این منطقه جبران کرد. تحقیقات حاضر، تأیید کننده‌ی احتمال اثرگذاری IFN- α در شرایط التهابی مزمن پوکی استخوان می‌باشد و IFN- α این پتانسیل را دارد که به عنوان یک دارو در درمان و یا پیشگیری از پوکی استخوان در بیماری‌های مزمن مانند رماتیسم مفصلی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی با شماره‌ی

شد. دلیل تفاوت‌های جزئی در میزان اثر G-CSF بر نواحی مختلف استخوانی و معنی‌دار نبودن کاهش تراکم معدنی کل استخوان ران در اثر G-CSF را می‌توان به حضور بیشتر استخوان متراکم در سنجش تراکم کل استخوان ران نسبت داد؛ چراکه طبق تحقیقات، بیشترین و سریع‌ترین آثار کاهش تراکم در بافت اسفنجی ایجاد می‌شود و بافت متراکم نسبت به کاهش تراکم، مقاومت بیشتری نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل تفاوت‌های ساختاری و عملکرد نواحی مختلف بافت استخوان نسبت به هم باشد (۲۹). موضوع دیگری که احتمال می‌رود تا حدی به توجیه تفاوت پاسخ انواع بافت‌های استخوانی در تحقیق حاضر کمک کند، تفاوت چگالی معدنی نواحی مختلف استخوان است که می‌تواند دلیل اثر کم و بیش متفاوت G-CSF در نواحی استخوانی مختلف در مطالعه‌ی حاضر باشد.

IFN- α به تنهایی، موجب افزایش تراکم موضعی استخوان در ناحیه‌ی تروکانتر و همچنین، موجب افزایش حجم تیغه‌های استخوانی شده است. اگر چه اثرگذاری IFN- α بر روی استئوبلاست قطعی نیست؛ اما این عامل در شرایط *In vitro* موجب کاهش تمایز و فعالیت استئوکلاست می‌شود (۲۷). پیشنهاد شده است که این عامل، تمایز پیش‌سازهای میلوپوستی را بیشتر به سمت سلول‌های دندریتی هدایت می‌کند و در نتیجه، از تمایز به استئوکلاست ممانعت می‌کند (۳۰). در مورد مکانیسم قطعی عملکرد این عامل در شرایط *In vivo*، نیاز به تحقیقات گسترده‌تری می‌باشد.

IFN- α باعث افزایش تراکم استخوان در تروکانتر بزرگ شد و همچنین، مساحت تیغه‌های استخوانی را افزایش داد. همچنین، IFN- α در مجاورت G-CSF،

لازم می‌دانند مراتب سپاس و امتنان خود را از حوزه‌ی معاونت پژوهشی این دانشگاه ابراز نمایند.

۲/۱۷۳۳۷ مصوب ۱۳۹۰/۱/۲۸ در دانشگاه فردوسی مشهد بود و تأمین هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه صورت گرفت. پژوهشگران بر خود

References

1. Clayton ES, Hochberg MC. Osteoporosis and osteoarthritis, rheumatoid arthritis and spondylarthropathies. *Curr Osteoporos Rep* 2013; 11(4): 257-62.
2. Sozzani S, Bosisio D, Scarsi M, Tincani A. Type I interferons in systemic autoimmunity. *Autoimmunity* 2010; 43(3): 196-203.
3. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 2004; 28(5): 509-54.
4. Nakamura H, Ueki Y, Sakito S, Matsumoto K, Yano M, Miyake S, et al. High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18(6): 713-8.
5. Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, et al. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31): 11398-403.
6. Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(9): 500-10.
7. Cornish AL, Campbell IK, McKenzie BS, Chatfield S, Wicks IP. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(10): 554-9.
8. Dale DC. Colony-stimulating factors for the management of neutropenia in cancer patients. *Drugs* 2002; 62(Suppl 1): 1-15.
9. Grigg A, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, et al. Effect of peripheral blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11(Suppl 2): 23-9.
10. Kuwabara H, Wada T, Oda T, Yoshikawa H, Sawada N, Kokai Y, et al. Overexpression of the granulocyte colony-stimulating factor gene impairs bone morphogenetic protein responsiveness in mice. *Lab Invest* 2001; 81(8): 1133-41.
11. Takamatsu Y, Simmons PJ, Moore RJ, Morris HA, To LB, Levesque JP. Osteoclast-mediated bone resorption is stimulated during short-term administration of granulocyte colony-stimulating factor but is not responsible for hematopoietic progenitor cell mobilization. *Blood* 1998; 92(9): 3465-73.
12. Purton LE, Lee MY, Torok-Storb B. Normal human peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor have increased osteoclastogenic potential compared to nonmobilized blood. *Blood* 1996; 87(5): 1802-8.
13. Hirbe AC, Uluckan O, Morgan EA, Eagleton MC, Prior JL, Piwnica-Worms D, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone tumor growth in mice in an osteoclast-dependent manner. *Blood* 2007; 109(8): 3424-31.
14. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, et al. G-CSF potentially inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005; 106(9): 3020-7.
15. Billiau A. Interferon beta in the cytokine network: an anti-inflammatory pathway. *Mult Scler* 1995; 1(Suppl 1): S2-S4.
16. Hoyo-Becerra C, Schlaak JF, Hermann DM. Insights from interferon-alpha-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain Behav Immun* 2014; 42: 222-31.
17. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356(22): 2271-81.
18. Avnet S, Cenni E, Perut F, Granchi D, Brandi ML, Giunti A, et al. Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. *Int J Oncol* 2007; 30(2): 469-76.
19. Lari R, Fleetwood AJ, Kitchener PD, Cook AD, Pavasovic D, Hertzog PJ, et al. Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone* 2007; 40(2): 323-36.
20. Nishida N, Komatsu Y, Komeda T, Fukuda Y. Interferon-alpha improves bone resorption and osteopenia in patients with chronic hepatitis C.

- Hepatol Res 2006; 34(4): 222-7.
21. Gur A, Dikici B, Nas K, Bosnak M, Haspolat K, Sarac AJ. Bone mineral density and cytokine levels during interferon therapy in children with chronic hepatitis B: does interferon therapy prevent from osteoporosis? BMC Gastroenterol 2005; 5: 30.
 22. Mensah KA, Mathian A, Ma L, Xing L, Ritchlin CT, Schwarz EM. Mediation of nonerosive arthritis in a mouse model of lupus by interferon-alpha-stimulated monocyte differentiation that is nonpermissive of osteoclastogenesis. Arthritis Rheum 2010; 62(4): 1127-37.
 23. Takaishi Y, Ikeo T, Nakajima M, Miki T, Fujita T. A pilot case-control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Osteoporos Int 2010; 21(5): 815-25.
 24. Boivin G, Meunier PJ. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. Calcif Tissue Int 2002; 70(6): 503-11.
 25. Inoue K, Hamano T, Nango N, Matsui I, Tomida K, Mikami S, et al. Multidetector-row computed tomography is useful to evaluate the therapeutic effects of bisphosphonates in glucocorticoid-induced osteoporosis. J Bone Miner Metab 2014; 32(3): 271-80.
 26. Wang YX, Griffith JF, Zhou H, Choi KC, Hung VW, Yeung DK, et al. Rat lumbar vertebrae bone densitometry using multidetector CT. Eur Radiol 2009; 19(4): 882-90.
 27. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. Immunol Rev 2005; 208: 181-93.
 28. Wilkison M, Gauss K, Ran Y, Searles S, Taylor D, Meissner N. Type 1 interferons suppress accelerated osteoclastogenesis and prevent loss of bone mass during systemic inflammatory responses to Pneumocystis lung infection. Am J Pathol 2012; 181(1): 151-62.
 29. Johannesdottir F, Aspelund T, Reeve J, Poole KE, Sigurdsson S, Harris TB, et al. Similarities and differences between sexes in regional loss of cortical and trabecular bone in the mid-femoral neck: the AGES-Reykjavik longitudinal study. J Bone Miner Res 2013; 28(10): 2165-76.
 30. Schwarz EM, Looney RJ, Drissi MH, O'Keefe RJ, Boyce BF, Xing L, et al. Autoimmunity and bone. Ann N Y Acad Sci 2006; 1068: 275-83.

The Effects of Simultaneous Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Interferon-alpha on Osteoporosis

Roya Lari PhD¹, Sima Jahan-Bakhshi², Elaheh Mohammadian², Ali Mirshahi PhD³,
Nasser Mahdavi-Shahri PhD⁴, Ali Moghimi PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Bone loss is one of the major pathological symptoms of rheumatoid arthritis (RA) and some types of cancers. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon-alpha (IFN- α) are widely used in patients with cancer as a drug and o have been known to play a key role in rheumatoid arthritis. This study aimed to investigate the effects of these factors on osteoporosis.

Methods: 28 mouse (*Mus musculus*, male, and eight weeks of age) were divided into 4 groups of 7. They were injected subcutaneously with distilled water as control, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IFN- α and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ G-CSF with or without 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IFN- α per day, for 28 days. After killing mice, standardized radiographs were taken from femur bones and the Image J program was used for measurement of the femoral bone density. The total femoral bone volume was measured using multidetector computed tomography (MDCT).

Findings: G-CSF reduced the density of the head and greater trochanter of femoral bone in mice. The IFN- α alone increased bone density in the greater trochanter and the volume of the trabecular bone. This factor, in combination with G-CSF, strongly enhanced bone density and increased the volume of the trabecular bone.

Conclusion: Therefore, administration of IFN- α may inhibit G-CSF-induced bone loss in inflammatory and treatment conditions.

Keywords: Osteoporosis, Interferon- α , Granulocyte colony-stimulating factor, Radiography, Multidetector computed tomography

Citation: Lari R, Jahahn Bakhshi S, Mohammadian E, Mirshahi A, Mahdavi Shahri N, Moghimi A. **The Effects of Simultaneous Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Interferon-alpha on Osteoporosis.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(334): 703-13

1- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- MSc Student, Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Professor, Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Roya Lari PhD, Email: rlari@um.ac.ir