بررسی اثر ترکیبی دوز پایین آرسنیک تری اکسید و AZT روی زنده مانی وفعالیت متابولیک رده سلولی NB4

روح الله میرزایی خلیل آبادی[1]، هاجر مردانی ولندانی[1]، داوود بشاش[1]، دکتر ناهید عین اللهی[2]، دکتر کامران علی مقدم[3]، دکتر اردشیر قوام زاده[4]، دکتر سید حمیدالله غفاری[3]

چکیده

زمینه و هدف: *لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) زیر گروهی از لوسمی های میلوئیدی حاد (AML) میباشد که باجابجایی کروموزومی بین کروموزومهای ۱۵و ۱۷ شناخته می شود، t(15;17). تدابیر درمانی مهم برای این بیماری استفاده از ATRA و آرسنیک میباشد. برای از بین بردن سلولهای سرطانی دوز بالای آرسنیک لازم است اما در این دوزها آرسنیک دارای اثرات سمی روی بافتهای سالم می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر دوز پایین آرسنیک در ترکیب با داروی AZT برروی رده سلولی NB4 (رده سلولی APL) می باشد تا اثرات سمی دوز بالای آرسنیک کاهش یابد.*

روش بررسی: *در این مطالعه بعد از کشت و تکثیر رده سلولی NB4، سلولها را با دوز پایین آرسنیک(۰/۵ میکرومولار) و دوز پایین آرسنیک در ترکیب با دوزهای مختلف AZT(۲۰۰،۱۰۰،۵۰ میکرومولار) تیمار شدند و سپس زنده مانی سلولها با تریپان بلو و فعالیت متابولیک سلول با MTT assay بررسی شد.*

یافته ها: *دوز پایین آرسنیک(۰/۵ میکرومولار) به تنهایی و در ترکیب با دوز۵۰ میکرومولار AZT اثر کمی روی زنده مانی و فعالیت متابولیک سلول داشت اما در ترکیب با دوزهای بالاتر AZT تاثیر قابل توجهی روی زنده مانی و فعالیت متابولیک داشت و هر دوی زنده مانی و فعالیت متابولیک بطور قابل توجهی کاهش یافتند.*

بحث و نتیجه گیری: *مکانیسمهای القاء کننده آپپتوز مختلفی باعث آپپتوز توسط AZT و آرسنیک می شوند.از آنجا که بعضی از این مکانیسمها بین AZT و آرسنیک مشابه می باشد لذا احتمالا این مکانیسمهای مشابه باعث اثر تقویتی و کاهش قابل توجه زنده مانی و فعالیت متابولیک در ترکیب دو دارو شده است.*

واژه های کلیدی: *لوسمی پرومیلوسیتیک حاد ، سلول NB4، آرسنیک، AZT*

* نویسنده مسئول :
دکتر سید حمید الله غفاری ؛
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email :
Shghaffari200@yahoo.com

- دریافت مقاله : خرداد ۸۹ - پذیرش مقاله : آذر ۸۹

مقدمه

APL (Acute Promyelocytic Luekemia) یکی از انواع زیرگروه های AML (Acute Myeloid Leukemia) می‌باشد. در تقسیم بندی گروه FAB (French American-British) به AML-M3 شناخته می‌شود.

در APL مهمترین اختلال سیتوژنتیکی، جابجایی کروموزومی بین کروموزوم های ۱۵ و ۱۷ می‌باشد((t(15;17)(۲-۱). این اختلال منجر به الحاق دو ژن PML و RARα می‌شود(۲-۱). جابجایی کروموزومی دیگر مثل t (11;17) و t (5;17) فقط در ۲٪ بیماران APL وجود دارد(۱).

t (15;17) در ۹۵٪ افراد APL دیده می شود(۳). این بیماری حدود ۱۰-۵٪ موارد AML را شامل می‌شود(٤). APL اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط Hillestad شرح داده شد. او سه بیمار را گزارش کرد

[1] کارشناس ارشد هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[2] دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[3] دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[4] استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

که پرومیلوسیت ها در آنها غالب بودند و تمایل به خونریزی وجود داشت و بعد از چند هفته مردند.

در سال ۱۹۷۳برنارد و همکارانش عنوان کردند که APL به شیمی درمانی با داروی daunorubicin نسبتا حساس می باشد و باعث بهبودی کامل یا CR (Complete Remission) در ۵۵ ٪ بیماران می‌شود(۵). بعد از آن ترکیبی از یک آنتراسیکلین و Ara-C (Cytosine Arabinoside) خط اول درمان APL بود و بهبودی کامل به ۸۰-۷۵ ٪ در بیماران با تشخیص اولیه رسید؛ اگر چه با شیمی درمانی سندرم خونریزی دهنده تشدید و باعث افزایش میزان مرگ و میر شد(۵).در سال ۱۹۸۵، ATRA (All-Trans Retinoic Acid) به عنوان درمان جدید APL معرفی شد(۵). ترکیب ATRA و شیمی درمانی بهبودی کامل را ۹۵-۹۰٪ بالا برد(۵). در اوایل دهه ۱۹۹۰ بکار بردن آرسنیک تری اکساید (ATO) باعث بهبودی بیشتر بیماران مقاوم به درمان و بیماران عود یافته علاوه بر بیماری اولیه APL شد(۵). ترکیب ATRA و ATO باعث کاهش PML-RARα و بقا بیشتر بیماران با APL اولیه می‌شود(۱).

تلومراز یک جزء اساسی برای تکثیر سلول های سرطانی است. آنزیم تلومراز مسئول حفظ ساختار تلومر می‌باشد. تلومرها برای حفظ و پایداری کروموزوم ضروری می‌باشند، تلومراز در اکثر سلول های سوماتیک نرمال بیان نمی شود و یا میزان بیان آن کم می باشد. این آنزیم در سلول های سرطانی فعال می شود و یکی از مکانیزم های مهم در نامیرا شدن سلول های سرطانی می باشد. از آنجا که تلومراز یک جزء اساسی برای تکثیر سلول های سرطانی است، مهار فعالیت آنزیم تلومراز ممکن است منجر به اثرات ضد توموری شود(۸-۶). ترکیباتی نظیر AZT باعث مهار فعالیت تلومراز می‌شوند(۶).

هرچند درمان APL با ATRA موفقیت آمیز می‌باشد اما در بعضی موارد عود مجدد وجود دارد(۹-۸). در مواردی که عود وجود دارد داروی آرسنیک داروی مناسبی می‌باشد(۹و۱). آرسنیک همچنین باعث بهبودی طولانی مدت هم در بیماران مقاوم به داروی ATRA و هم در بیماران پاسخ دهنده به ATRA شده است(۸). اما آرسنیک در دوزهای پایین به تنهایی نمی‌تواند باعث آپوپتوز شود و در دوزهای بالا نیز اثر سمی روی بافت‌های سالم دارد(۱۱-۱۰). همچنین عود مجدد در درمان با آرسنیک نیز در بعضی موارد وجود دارد(۳). با توجه به مشکلات گفته شده در این مطالعه سعی شد اثر دوز پایین آرسنیک را در ترکیب با AZT روی رده سلولی NB4 (مشتق شده از سلول های APL) بررسی شود تا از اثرات مضر دوز بالای آرسنیک و سایر مشکلات آن مثل عدم خاصیت آپپتوتیک در دوز پایین کاسته شود.

روش بررسی

کشت سلول

رده سلولی NB4 (خریداری شده از انستیتو پاستور) در محیط کشت RPMI-1640 با 2O% FBS ، HEPES، بیکربنات سدیم کشت داده شد. بعد از کشت و تکثیر، سلولها با دوز پایین آرسنیک (۰/۵ میکرومولار)، دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میکرومولار AZT و ترکیب اینها قرار گرفتند. در این فاصله سلولها هر ۳روز تجدید محیط می‌شدند.

بررسی زنده مانی سلولها با تریپان بلو

برای بررسی زنده مانی ، سلول ها را سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته و با ۱سی سی محیط، پلت سلولی معلق شد. ۱۵-۱۰ µL از سوسپانسیون سلولی برداشته و به همان میزان TB اضافه و به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه تا رنگ جذب سلولهای مرده شود. سپس حدود ۱۳µL-۱۲از این سلولها(به

Archive of SID
www.SID.ir

میزانی که زیر لامل روی لام نئوبار پر شـود) را بـرای شمارش سلول برداشته ، با لام نئوبار شمارش ودرصد زنده مانی بدست آورده شد.

بررسی فعالیت متابولیک سلولها با MTT assay

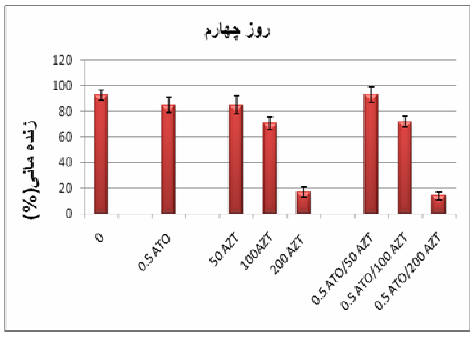
۳×۱۰^{۳} سلول(در حجم ۱۰۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون سلولی برداشته و درچاهکهای پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. به آن ۱۰۰ میکرولیتر معرف MTT اضافه و به مدت ٤-۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ ° C و ۵٪ CO2 قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون، پلیت را با دور 350g به مدت ۱۰ دقیقه با پلیت سانتریفیوژ، سانتریفیوژ شد. محلول رویی را خالی کرده و به آن 100µL محلول DMSO اضافه شد. سپس توسط دستگاه ELISA Reader جذب نوری نمونها در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

روش

روش مطالعه از نوع تجربی و جامعه مورد بررسی رده سـلولی NB4(رده سـلولی مربـوط بـه APL) بـود وآزمایشات سـه بـار تکـرار شـدند. آنـالیز آمـاری بـا استفاده از student-t test و نرم افـزار EXCEL انجـام شد.

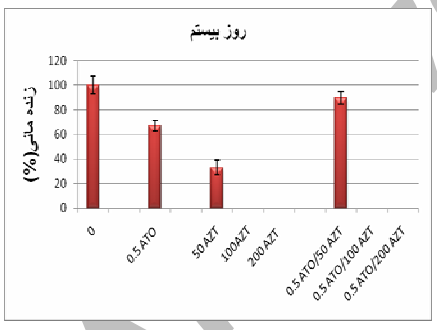
یافته ها

همانگونه که گفتـه شـد مطالعـه مـا روی رده سـلولی NB4 انجام گرفت. در این مطالعه سلولها تحت تـاثیر دوز ۰/۵ میکرومولار ATO، دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میکرومولار AZT و ترکیب اینها قرار گرفتند. بررسـی زنده مانی سلولها با تریپان بلو به مدت ۲۰ روز انجـام شد. نتـایج حاصـل از ایـن بررسـی در روز چهـارم و بیستم در نمودارهای ۱و۲ مشاهده می‌شود.



نمودار ۱: زنده مانی سلولهای تیمار شده با دوز۰/۵ میکرومولار ارسنیک، دوزهای مختلف AZT و ترکیب این دو دارو در روز چهارم

همانطور که در نمودار۱ مـشاهده مـی شـود، دوز ۰/۵ آرسنیک به تنهایی ودر ترکیب با دوز ۵۰ میکرومـولار AZT در یک حالت وابسته بـه زمـان اثـر کمـی روی زنده مانی دارد اما در ترکیب با دوزهـای ۲۰۰ و ۱۰۰ AZT باعث کاهش قابل ملاحظـه ای در میـزان زنـده مانی شده است.



نمودار ۲: زنده مانی سلولهای تیمار شده با دوز۰/۵ میکرومولار ارسنیک ، دوزهای مختلف AZT در روز بیستم

همانطور که در نمودار۲ مشاهده می شود ترکیب دوز ۰/۵ آرسـنیک بـا دوزهـای بـالای AZT (۱۰۰ و۲۰۰ میکرومولار) در روز ۲۰ به صفر رسیده است امـا دوز ۰/۵ آرسنیک بـه تنهـایی در روز ۲۰ بـه ٦٧٪ رسـیده است. همچنین ترکیب دوزهای پایین(۰/۵ میکرومولار آرسنیک و ۵۰ میکرومولار AZT) اثر کمی روی زنده

Archive of SID
www.SID.ir

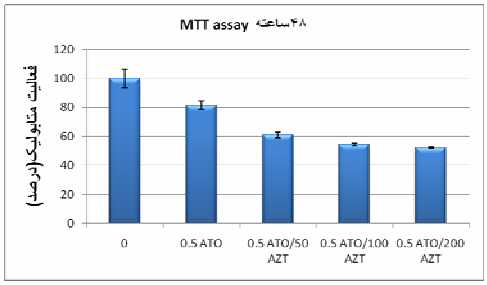
مانی دارد. همچنین AZT نیز باعث کاهش زنده مانی شده است و زنده مانی دوزهای بالای آن در روز ۲۰ صفر است.

بررسی فعالیت متابولیک سلولها با MTT assay ٤٨ ساعت و۷۲ ساعت بعد از تیمار انجام شد. نتایج تیمار با ترکیب دوز پایین ATO و دوزهای مختلف AZT در نمودارهای ۳ و٤ و جداول ۱ و۲ مشاهده می‌شود.

جدول۱: جدول همبستگی AZT با دوز ۰/۵ میکرومولار آرسنیک برای فعالیت متابولیک ۴۸ ساعته

دوز دارو	P value
۰/۵ ATO /۵۰ AZT	*P value < 0/001
۰/۵ ATO/۱۰۰ AZT	*P value < 0/001
۰/۵ ATO/۲۰۰ AZT	*P value < 0/001

*با دوز ۰/۵ میکرومولار آرسنیک مقاسیه شده است.

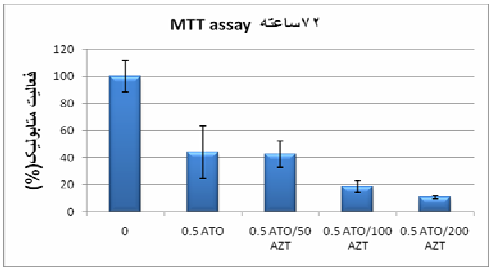


نمودار ۳: فعالیت متابولیک سلولها، سنجیده شده با MTT assay بعد از ۴۸ ساعت مجاورت با دارو

جدول۲: جدول همبستگی AZT با دوز ۰/۵ میکرومولار آرسنیک برای فعالیت متابولیک ۷۲ ساعته

	P value
۰/۵ ATO/۵۰AZT	*P value < 0/05
۰/۵ ATO/۱۰۰ AZT	*P value < 0/001
۰/۵ ATO/۲۰۰ AZT	*P value < 0/001

*با دوز ۰/۵ میکرومولار آرسنیک مقاسیه شده است.



نمودار ۴ : فعالیت متابولیک سلولها، سنجیده شده با MTT assay بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با دارو

همانطور که در نمودارها و جداول مشاهده می شود ، دوز ۰/۵ آرسنیک به تنهایی و در ترکیب با دوزهای مختلف AZT باعث کاهش فعالیت متابولیک سلولی شده است اما کاهش معناداری بین دوز ۰/۵ آرسنیک و ترکیب دوز ۰/۵ آرسنیک با دوز ۵۰ AZT مشاهده نمی شود در صورتی که ترکیب دوز ۰/۵ آرسنیک با دوزهای۲۰۰ و ۱۰۰ AZT باعث کاهش بیشتری در فعالیت سلولی نسبت به بکار بردن دوز ۰/۵ آرسنیک به تنهایی شده است و اختلاف بین دوز ۰/۵ آرسنیک و ترکیب دوز ۰/۵ آرسنیک با دوزهای۲۰۰ و ۱۰۰ AZT معنا دار می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه ای که انجام شد اثردوز پایین ATO (۰/۵ میکرومولار) را در ترکیب با دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میکرومولار AZT که یک مهار کننده تلومراز و القا کننده آپپتوز است و باعث کاهش زنده مانی سلولهای سرطانی میشود را روی رده سلولی NB4 (رده سلولی مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شد دوز ۰/۵ آرسنیک به تنهایی و در ترکیب با دوزهای مختلف AZT باعث کاهش فعالیت متابولیک سلولی و زنده مانی سلولها شده است اما دوز ۰/۵ آرسنیک در ترکیب با دوزهای۲۰۰ و ۱۰۰ AZT باعث کاهش قابل ملاحظه ای در فعالیت متابولیک و زنده مانی نسبت

Archive of SID

www.SID.ir

به بکار بردن دوز ۰/۵ آرسنیک به تنهایی شده است. تاکنون مطالعات مختلفی در بکار بردن ATO و AZT روی رده های سلولی مختلف انجام شده است و اثرات مختلفی از اینها بررسی ومشاهده شده است. در مطالعه فانگ وهمکاران(۲۰۰۹) مشخص شد که AZT باعث تاخیر در روند چرخه سلولی، القاء آپپتوز و کاهش فعالیت تلومراز در رده سلولی مربوط به هپاتوما (Hepg2) می شود(۱۲). در مطالعه جی وهمکاران(۲۰۰۵) نشان داده شد که AZT باعث پیری سلول، آپپتوز، تاخیر در رشد سلول، مهار فعالیت تلومراز، کوتاه شدن طول تلومر، کاهش بیان ژن hTERT و کاهش بیان ژن c-myc در رده سلولی مربوط به سرطان پستان (MCF-7) می شود(۱۳).

در مطالعه سان و همکاران(۲۰۰۷) مشخص شد که AZT باعث کاهش فعالیت تلومراز، افزایش آپپتوز، مهار تکثیر سلولی، افزایش بیان caspase-3 و کاهش بیان ژن bcl-2 در رده سلولی مربوط به سرطان معده (MKN45) می‌شود. در این مطالعه آنها اثر ترکیبی AZT و FA-2-b-β را نیز بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که اثر ترکیبی این دو دارو بیشتر از اثر هرکدام به تنهایی می‌باشد(۱٤).

جی لی وهمکارانش(۲۰۰۲) نشان دادند که آرسنیک باعث القاء آپپتوز در سلولهای NB4 می شود(۱۵). ژانگ و همکاران(۲۰۰۳) با مطالعه روی رده سلولی HL-60 (رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتی) نشان دادند که آرسنیک در دوزکم اثر قابل توجهی در القاء آپپتوز روی این سلولها ندارد(۱۰). تارکانی و همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه روی رده سلولی NB4 نشان دادند آرسنیک در دوز کم به تنهایی اثری روی تکثیر و زنده مانی این سلولها ندارد(۸).

مکانسیمهای مولکولی اثر این دو دارو کاملا مشخص نیست. بسیاری از اثرات AZT و آرسنیک روی رده های سلولی و القاء آپپتوز مشابه است. آرسنیک با مکانیسم های مختلفی باعث آپپتوز رده های سلولی مختلف میشود مثل کاهش بیان ژن c-myc ، کاهش فعالیت تلومراز، افزایش بیان P53، کاهش بیان ژن bcl-2 و فعال کردن کاسپازها(۱٦-۱۵و۲-۱).AZT نیز با مکانیسمهای مختلفی باعث آپپتوز و کاهش زنده مانی سلولها می‌شود مثل مهار آنزیم تلومراز، کاهش بیان ژن c-myc و آپپتوز با واسطه فعال کردن کاسپاز(۱۷و۱۳). احتمالا می‌توان گفت از آنجاییکه مسیرهای آپپتوتیک مشترکی بین این دو دارو وجود دارد، بنابراین، بکار بردن AZT که در بعضی مسیرهای القاء آپپتوز با آرسنیک مشابه است در ترکیب با دوز پایین و غیر آپپتوتیک آرسنیک باعث تقویت اثر دوز پایین و غیر آپپتوتیک آرسنیک در القاء آپپتوز و کاهش فعالیت متابولیک می‌شود.

فاکتورهای زیادی در چرخه تکثیر و آپپتوز سلول نقش دارند و از آنجاکه به جزء مطالعه ما هنوز هیچ مطالعه‌ای در رابطه با بکار بردن ترکیب AZT و آرسنیک گزارش نشده است و همچنین هیچ مطالعه ای در رابطه با اثر AZT روی رده سلولی NB4 به چشم نخورد، و خصوصا اینکه در رابطه با اثرات AZT روی بیان ژنها (gene profiling)، چرخه سلولی و مسیرهای انتقال پیام مرتبط باAZT مطالعات زیادی صورت نگرفته است بنابراین بایستی تحقیقات بیشتری در این موارد صورت گیرد تا مکانسیم اثرات AZT و نیز آرسنیک و همچنین اثرات ترکیبی این دو دارو کاملا مشخص شود.

تشکر و قدردانی

از مدیریت وکارکنان محترم مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند و اجازه کار در این مرکز را دادند سپاسگزاری به عمل می‌آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Am Soc Hematology 2008; 111(5): 2505.

2. Miller Jr WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. AACR 2002; 62(14): 3893.

3. Ghaffari SH, Shayan-Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Annals of Oncology 2008; 19(11): 1927-1934.

4. Miller KB, Daoust PR. Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 1071-1098.

5. Sanz MA, Fenaux P, Lo Coco F. Arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2005; 90(9): 1231.

6. Rankin AM, Faller DV, Spanjaard RA. Telomerase inhibitors and'T-oligo'as cancer therapeutics: contrasting molecular mechanisms of cytotoxicity. Anticancer Drugs 2008; 19(4): 329-338.

7. Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. British Journal of pharmacology 2007; 152(7): 1003-11.

8. Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Pendino F, Lanotte M, Aradi J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death. Leukemia 2005; 19(10): 1806-11.

9. Cunha De Santis G, De Barros Tamarozzi M, Sousa RB, Moreno SE, Secco D, Garcia AB, et al. Adhesion molecules and differentiation syndrome: phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA, As2O3, phenylbutyrate, and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2007; 92(12): 1615-1622.

10. Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. Carcinogenesis 2003; 24(11): 1811-1817.

11. Zhang Y, Cao EH, Liang XQ, Qin JF. Increasing sensitivity to arsenic trioxide-induced apoptosis by altered telomere state. European Journal of Pharmacology 2003; 474(2-3): 141-147.

12. Fang JL, Beland FA. Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes. Toxicol Sci 2009; 111(1):120-130.

13. Ji HJ, Rha SY, Jeung HC, Yang SH, An SW, Chung HC. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. Breast cancer research and treatment 2005; 93(3): 227-36.

14. Sun YQ, Guo TK, Xi YM, Chen C, Wang J, Wang ZR. Effects of AZT and RNA-protein complex (FA-2-b-beta) extracted from Liang Jin mushroom on apoptosis of gastric cancer cells. World Gastroenterol 2007; 13(31): 4185-4191.

15. Li J, Chen P, Sinogeeva N, Gorospe M, Wersto RP, Chrest FJ, et al. Arsenic trioxide promotes histone H3 phosphoacetylation at the chromatin of CASPASE-10 in acute promyelocytic leukemia cells. J Biol Chem 2002; 227(51): 49504-10.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood 1996; 88(3): 1052-1061.

17. Macchi B, Mastino A. Pharmacological and biological aspects of basic research on nucleoside-based reverse transcriptase inhibitors. Pharmacol Res 2002; 46(6): 473-482.

Archive of SID

www.SID.ir