

## The Effect of Telomerase Inhibition on the Expression of Inflammatory Cytokines Affecting the Pathogenesis of Multiple Myeloma Cell Line U266

Saeedeh Ghiyassi<sup>1</sup>, Zahra Ameri<sup>1</sup>, Rouhollah Mirzaei<sup>1</sup>, Gholamhossein Hassanshahi<sup>2</sup>, Mohsen Ehsan<sup>1</sup>, Shima Kazemzadeh<sup>3</sup>, Noushin Pouryazdanpanah<sup>1</sup>, Ahmad Fatemi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology, Faculty of Paramedicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

<sup>2</sup>Cellular & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

<sup>3</sup>Department of Hematology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

\*Corresponding Author: Ahmad Fatemi, Department of Hematology, Faculty of Paramedicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Email: ahmad.fatemi2@gmail.com

Received: 28 May, 2017

Accepted: 16 Jul, 2017

### Abstract

**Background and Objectives:** Telomerase is an enzyme, which is overexpressed in 80-90% of cancers. Simultaneous activities of telomerase and NF- $\kappa$ B are required for progression of many cancers. In recent years, researchers have found out a close relationship between telomerase and the transcription factor NF- $\kappa$ B. Increased expression of telomerase is associated with significant increases in the expression level of NF- $\kappa$ B and endogenous genes, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ . In recent years, several methods have been proposed to inhibit telomerase in cancer cells. Therefore, If it is possible to inhibit telomerase activity and consequently reduce the expression of inflammatory cytokines, the NF- $\kappa$ B signaling pathway, and the expression of target genes in the multiple myeloma disease. In this study, the effect of MST-312 (a derivative of green tea) with telomerase inhibition activity, was investigated on the treated U266 cell line and the expression of inflammatory cytokines.

**Methods:** In this experimental study, U266 cells, were treated with different dosed of MST-312 for 48 hours, and cellular apoptosis, was assessed by Annexin V Apoptosis Detection Kit. Then, to assess the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  genes, cells were treated with MST-312 (2 $\mu$ M for 48 hours) and the RNA of these cells, was extracted. In the following, real-time PCR method was used to investigate gene expression level.

**Results:** In this study, an increase in apoptosis and a decrease in the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  genes in U266 cells, was observed after 48 hours of exposure with 2 $\mu$ M MST-312. In addition, no cytotoxic effect was observed on normal blood mononuclear cells.

**Conclusion:** The results of the present study indicated that inhibition of telomerase activity by MST-312, can be considered as a novel treatment strategy for multiple myeloma.

**Keywords:** Multiple myeloma; Tumor necrosis factor-alpha; Interleukin-6; MST-312.

## تأثیر مهارکننده تلومراز بر روی بیان سایتوکاین‌های التهابی مؤثر در پاتوژنز میلوامولتیپل، در رده سلولی میلومی U266

سعیده غیائی<sup>۱</sup>، زهرا عامری<sup>۱</sup>، روح‌اله میرزایی<sup>۱</sup>، غلامحسین حسن‌شاهی<sup>۲</sup>، محسن احسان<sup>۱</sup>، شیما کاظم‌زاده<sup>۳</sup>، نوشین پوریزدان‌پناه<sup>۱</sup>،  
احمد فاطمی<sup>۱\*</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** تلومراز آنزیمی است که در ۹۰-۸۰٪ سرطان‌ها افزایش بیان دارد. فعالیت همزمان تلومراز و NF-κB برای پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها ضروری است. محققین در سال‌های اخیر به ارتباط تنگاتنگ تلومراز با فاکتور رونویسی NF-κB پی برده‌اند. با افزایش بیان تلومراز، افزایش قابل توجهی در بیان NF-κB و ژن‌های هدف، از جمله IL-6 و TNFα مشاهده می‌شود. در سال‌های اخیر روش‌های متعددی جهت مهار تلومراز در سلول‌های سرطانی ارائه شده است. بنابراین، اگر بتوان با مهار تلومراز بیان سایتوکاین‌های التهابی، مسیر سیگنالینگ NF-κB و بیان ژن‌های هدف آن را در بیماری مالتیپل میلوما کاهش داد، گامی مؤثر در درمان این بدخیمی برداشته شده است. در این مطالعه MST-312 (مشتقی از چای سبز) با خاصیت مهارکنندگی تلومراز بر روی رده سلولی U266 تیمار شده و بیان سایتوکاین‌های التهابی بررسی گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های U266 با دوزهای مختلف MST-312، به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و آپوپتوز سلولی با استفاده از کیت انکسین ۷ بررسی گردید، سپس برای مطالعه بیان ژن‌های IL-6 و TNFα، سلول‌ها (با دوز ۲ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت) با داروی MST-312 مجاور و RNA این سلول‌ها استخراج شد. در ادامه، میزان بیان ژن با روش Real Time PCR بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در این مطالعه، افزایش آپوپتوز و کاهش بیان ژن‌های IL-6 و TNFα در سلول‌های U266 بعد از مواجهه ۴۸ ساعته با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 مشاهده گردید. همچنین هیچ اثر سیتوتوکسیکی بر روی سلول‌های نرمال تک‌هسته‌ای خون دیده نشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد مهار فعالیت تلومراز به وسیله MST-312 می‌تواند به عنوان یک راهبرد جدید برای درمان مالتیپل میلوما در نظر گرفته شود.

**کلیدواژه‌ها:** مالتیپل میلوما؛ تومور نکروزینگ فاکتور آلفا؛ اینترلوکین - ۶؛ MST-312.

<sup>۱</sup>گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

<sup>۲</sup>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

<sup>۳</sup>گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

احمد فاطمی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:  
ahmad.fatemi2@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ghiyassi S, Ameri Z, Mirzaei R, Hassanshahi Gh, Ehsan M, Kazemzadeh Sh, et al. The Effect of telomerase inhibition on the expression of inflammatory cytokines affecting the pathogenesis of multiple myeloma cell line U266.

Qom Univ Med Sci J 2018;12(4):1-9. [Full Text in Persian]

سلول‌های توموری با فعالیت تلومرازی بالا، ویژگی‌هایی چون افزایش تکثیر، مقاومت به درمان، تهاجم و کاهش آپوپتوز را نشان می‌دهند. اما اخیراً مطالعات، پرده از نقش‌های غیرتلومریک تلومراز برداشته‌اند. فعال‌شدن تلومراز و NF- $\kappa$ B، نقشی اساسی در بسیاری از سرطان‌ها دارند. بیان نابجای تلومراز منجر به افزایش سطح بیان NF- $\kappa$ B و ژن‌های هدف آن می‌شود (۹).

مطالعات نشان داده است تنظیم بیان ژن به‌واسطه تلومراز برای اینترلوکین - ۶ و TNF $\alpha$ ، اختصاصی است؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد مهار همزمان تلومراز و NF- $\kappa$ B، استراتژی درمانی خوبی در بدخیمی‌ها باشد. از آنجا که درمان‌های رایج کنونی برای این بیماری دارای عوارض جانبی متعدد بوده و باوجود این داروها، MM همچنان به‌عنوان بدخیمی غیرقابل‌درمان محسوب می‌شود، لذا نیاز به شناخت داروهای جدیدتر احساس می‌گردد. در این میان، روش‌های مختلفی تاکنون جهت مهار عوامل متعدد دخیل در سیگنالینگ سلولی، از جمله مهار فعالیت تلومرازی مطرح است (۹). از آنجایی که داروهای با منشأ شیمیایی دارای سازگاری کمتری با بدن انسان نسبت به داروهای با منشأ گیاهی هستند؛ بنابراین داروهای گیاهی امروزه جهت تحقیقات در زمینه شیمی‌درمانی بیشتر مورد توجه‌اند (۱۰). نتایج مطالعات پیشین حاکی از اثرات ضدسرطانی ترکیبات کاتچین می‌باشد. این تحقیقات نشان داده‌اند اپی‌گالو کاتچین گالات (EGCG)، کاتچین اصلی چای سبز، به‌طور قوی و مستقیم باعث مهار تلومراز می‌شود. داروی MST-312 (مشتقی از اپی‌گالو کاتچین) در مهار تلومراز مؤثرتر از ترکیب اصلی، یعنی اپی‌گالو کاتچین عمل می‌کند. این ترکیبات، امید را برای درمان سرطان در میان دانشمندان زنده کرده‌اند (۱۱). همچنین به‌طور شگفت‌انگیز، این دارو بر روی سلول‌های نرمال خونی (سلول‌های تک‌هسته‌ای خون) هیچ‌گونه اثر سویی ندارد (۱). این تحقیق با هدف بررسی اثر مهارکننده تلومراز بر روی بیان سایتوکاین‌های التهابی مؤثر در پاتوژنز میلوم مولتیپل در رده سلولی میلومی U266 انجام گرفت.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی، رده سلولی U266 (مربوط به بیماری مالتیپل میلوما) از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه و سلول‌های U266

مالتیپل میلوما (Multiple Myeloma, MM)، دومین بدخیمی هماتولوژیک است که ۱۵-۱۰٪ بیماری‌های خونی را شامل می‌شود. در حالت نرمال، پلاسماسل آخرین سلول رده لنفوسیت B بوده که در تولید آنتی‌بادی نقش دارد، اما تکثیر خارج از کنترل آن‌ها در بیماری مالتیپل میلوما منجر به دردهای استخوانی، عفونت، کم‌خونی، شکستگی‌های استخوانی، همچنین افزایش سطح کلسیم خون می‌گردد. متوسط بقا در این بیماری قبل از شروع شیمی‌درمانی، حدود ۷ ماه است. یکی از علل اصلی بدخیم‌شدن سلول‌ها، اختلال در مسیر سیگنال‌دهی NF- $\kappa$ B است (۱). فاکتور رونویسی NF- $\kappa$ B نقش مهمی در بقا و تکثیر انواع مختلف تومورهای لنفوسیت B، به‌ویژه MM دارد. اینترلوکین - ۶ (IL-6)، فاکتور رشد اصلی پلاسماسل‌های بدخیم بوده که باعث بقای سلول‌های توموری و مقاومت به آپوپتوز این سلول‌ها در MM می‌شود. این سایتوکاین با دیگر فاکتورهای دخیل در پاتوژنز MM مانند ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و انکوژن‌ها برهمکنش دارد. همچنین در پروموتور ژن اینترلوکین - ۶، ناحیه‌ای برای اتصال فاکتور رونویسی NF- $\kappa$ B مشاهده می‌شود (۲). از طرفی، NF- $\kappa$ B منجر به تولید انواع مختلفی از میانجی‌های التهابی، از جمله TNF $\alpha$  می‌گردد (۳). فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF $\alpha$ )، سایتوکاینی التهابی است که در بسیاری از فعالیت‌های سلولی نظیر تکثیر، آپوپتوز و پیام‌های بقا نقش دارد (۴)، و این پیام، بقا را از طریق فعالیت NF- $\kappa$ B میانجی‌گری می‌کند (۵). تحقیقات نشان داده‌اند TNF $\alpha$  با فعال‌کردن مسیر NF- $\kappa$ B در سلول‌های میلومی باعث افزایش تکثیر سلولی می‌شود. همچنین افزایش سطح TNF $\alpha$  در بیماران مبتلا به MM با شدت بیماری مرتبط است (۶). از سویی، TNF $\alpha$  منجر به فعال‌شدن NF- $\kappa$ B و افزایش ۵ برابری اینترلوکین - ۶ می‌گردد (۷).

تلومراز، عامل دیگر دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی (آنزیمی با دو زیرواحد کاتالیتیک TERT و دو زیرواحد ریونوکلئوتیدی TERC) باعث افزایش طول تلومر در انتهای کروموزم‌ها می‌شود (۸). تلومراز آنزیمی است که در ۹۰-۸۰٪ سرطان‌ها بیان می‌گردد؛ در صورتی که در حالت طبیعی صرفاً سلول‌های بنیادی و جنسی دارای تلومراز فعال هستند.

واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل

{(Revert Aid First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis kit from Fermentas) از فرمتاز تهیه شد. ۲۰ میکرولیتر در هر واکنش حاوی ۹ میکرولیتر آب تهی از نوکلئاز، ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر، ۴ میکرولیتر Reaction Buffer 5×، ۲ میکرولیتر مخلوط

dNTP (10mM)، ۱ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (20U/μl) و ۱ میکرولیتر ترانسکریپتاز معکوس RevertAid M-MuLV (200U/μl) به‌عنوان مسترمیکس و ۲ میکرولیتر از RNA توتال (۱ میکروگرم در هر واکنش) به مسترمیکس اولیه اضافه شد. برای سنتز cDNA، هر واکنش ۲۰ میکرولیتری با برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت:

پنج دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد و در پی آن ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. واکنش با حرارت دادن آن در ۷۰ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه خاتمه یافت.

واکنش Real-time PCR با استفاده از ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس گرین 2× (Ampliqon)، ۱/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای Forward و Reverse (10pmol)، ۴ میکرولیتر آب با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های دمایی شامل: مرحله فعال‌سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه با ۴۰ سیکل دمایی که هر چرخه دارای مرحله دناتوراسیون با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و یک مرحله ادغامی اتصال پرایمر و مرحله طول‌سازی (annealing/ elongation) در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه بود. واکنش در دستگاه

ABI Biosystem انجام شد. برای تأیید اختصاصی بودن محصولات تولیدشده، آنالیز منحنی ذوب صورت گرفت و از ژن GAPDH به‌عنوان ژن Housekeeping جهت نرمالیزه کردن نتایج بیان ژن‌ها استفاده شد. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش مقایسه‌ای  $\Delta\Delta CT$  طبق فرمول:  $2^{\Delta\Delta CT}$  محاسبه گردید و بیان هر ژن سه بار تکرار شد.

در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با سرم جنین گاوی (FBS 10%)، پنی سیلین (۱۱۰ یونیت بر میلی‌لیتر) - استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، در انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، هوای حاوی ۵٪ دی‌اکسید کربن و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند.

محلول ذخیره MST-312 (Sigma-Aldrich, USA) با حل کردن آن در DMSO تهیه و غلظت‌های مناسب محلول کار از محلول ذخیره با استفاده از محیط کشت ساخته شد. تأثیر MST-312 روی مرگ سلول‌های میلومی با استفاده از آنالیز آپوپتوز بررسی گردید. به‌طور خلاصه، سلول‌های U266 در پلیت کشت سلول ۱۲‌خانه‌ای (با تراکم  $2 \times 10^5$  سلول در هر خانه) کشت داده شدند و با غلظت‌های مورد نظر (۲، ۴ و ۸ میکرومولار) MST-312 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نمونه سلولی که مورد تیمار با MST-312 قرار نگرفت (غلظت صفر)، به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. بعد از اتمام انکوباسیون، سلول‌ها دو مرتبه با PBS شسته و با استفاده از کیت آنکسین V شناسایی‌کننده آپوپتوز،

(BD Biosciences, USA) رنگ شدند. پس از خالی کردن PBS رویی، به هر پک سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر بایندینگ بافر (IX)، ۵ میکرولیتر آنکسین PE-V و ۵ میکرولیتر محلول رنگ 7AAD اضافه شد. پس از یک ورتکس ملایم، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، ۴۰۰ میکرولیتر بایندینگ بافر (IX) به سوسپانسیون سلولی اضافه و با دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson FACS) آنالیز گردید. درصد سلول‌های آپوپتوزی با استفاده از نرم‌افزار Cell Ques تعیین شدند. هر آزمایش ۳ مرتبه تکرار شد و سلول‌هایی با آنکسین V مثبت و 7AAD منفی، در فاز اولیه آپوپتوز در نظر گرفته شدند و سلول‌هایی که هم آنکسین V و هم 7AAD مثبت داشتند در مراحل انتهایی، آپوپتوز تلقی شدند. بعد از انجام روش فلوسایتومتری، سلول‌های میلومی (U266) برای ۴۸ ساعت با داروی MST-312 (۲ میکرومولار) تیمار شده و RNA این سلول‌ها با استفاده از محلول TriPure (Roche) با توجه به دستور کارخانه استخراج گردید.

CT (Threshold Cycle): تلاقی بین منحنی تکثیر و خط آستانه؛

$\Delta\Delta CT$  با فرمول زیر محاسبه گردید:

Treated: گروه تیمار شده با دارو؛

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{treated}} - CT_{\text{control}})_{\text{targeted gene}} - (CT_{\text{treated}} - CT_{\text{control}})_{\text{GAPDH}}$$

Control: گروه تیمار نشده با دارو.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای Forward و Reverse ژن‌ها

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3'	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTTC -3'
TNF $\alpha$	5'- GCTGCACTTTGGAGTGATCGG -3'	5'- TGGGCTACAGGCTTGTCAC -3'
IL-6	5'- AGCCAGAGCTGTGCAGATGA -3'	5'- CTGCAGCCACTGGTTCTGTG -3'
hTERT	5'- ATGCGACAGTTCGTGGCTCA -3'	5'- ATCCCCTGGCACTGGACGTA -3'

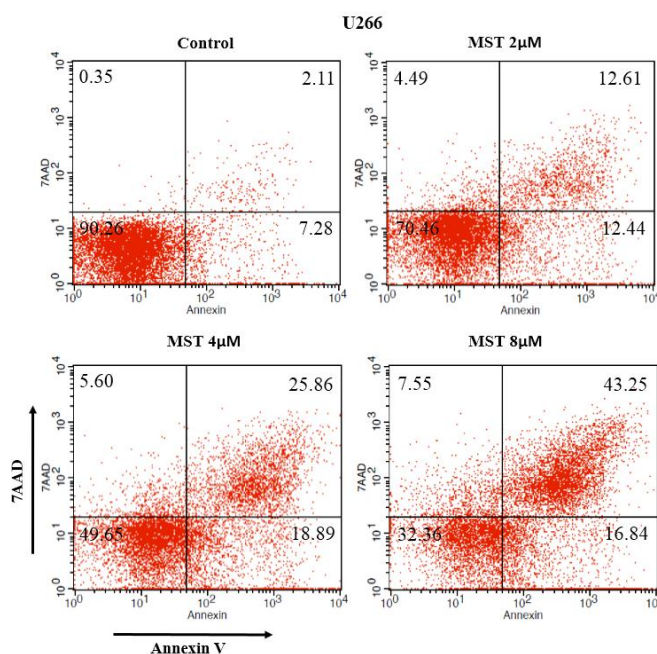
سلول‌های Annexin مثبت / 7-AAD مثبت در مراحل انتهایی آپوپتوز بوده و سلول‌های Annexin منفی / 7-AAD مثبت نکروتیک تلقی شدند. انکوباسیون کوتاه مدت سلول‌های میلومی با MST-312 به طور مشخص، سلول‌های آنکسین-V مثبت / 7AAD منفی و آنکسین-V مثبت / 7AAD مثبت را افزایش داد که نشان‌دهنده تأثیر آپوپتوتیک MST-312 روی سلول‌های میلومی بود. همچنین تأثیر آپوپتوزی، وابسته به دوز بوده و تقریباً ۳۰٪ افزایش آپوپتوز در سلول‌های U266 بعد از مواجهه کوتاه مدت (۴۸ ساعت) با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 دیده شد. این غلظت ۲ میکرومولار که با آپوپتوز قابل توجهی همراه است، به عنوان غلظت مورد استفاده در بررسی بیان ژن انتخاب گردید (شکل).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون

Two-tailed Student's t test تجزیه و تحلیل شدند.

## یافته‌ها

القای آپوپتوز سلول‌های میلومی U266 به وسیله داروی MST-312 صورت گرفت. به منظور تعیین تأثیر MST-312 روی آپوپتوز سلولی، سلول‌های میلومی به وسیله کیت PE آنکسین-V (شناسایی کننده آپوپتوز) آنالیز شدند. سلول‌های Annexin منفی / 7-AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شدند. سلول‌های Annexin مثبت / 7-AAD منفی در مرحله اولیه آپوپتوز قرار داشتند.

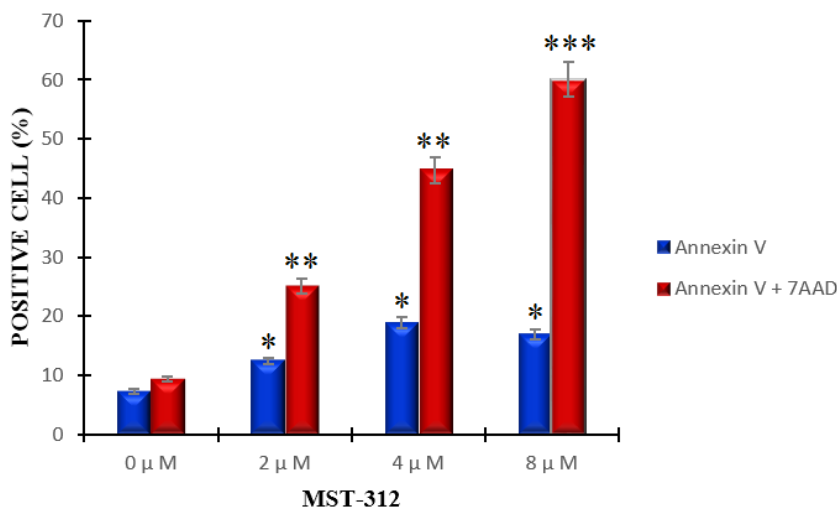


شکل: تأثیر MST-312 روی آپوپتوز سلول‌های U266.

سلول‌های U266 با غلظت‌های مختلف MST-312 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند، سپس اتصال این سلول‌ها به آنکسین-V / 7AAD مورد بررسی قرار گرفت. یک آزمایش از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است ( $p < 0.01$  \*\*  $p < 0.001$  \*  $p < 0.05$ ).

در سلول‌های میلومی تیمار شده با غلظت ۲ میکرومولار در کوتاه‌مدت (۴۸ ساعت)، بیان ژن IL-6 و TNF $\alpha$  کاهش یافت. همچنین بیان ژن TERT نیز در مقایسه با کنترل کاهش، حاکی از کاهش فعالیت تلومرازی بود (نمودار شماره ۱).

کاهش بیان سایتوکاین‌های التهابی IL-6 و TNF $\alpha$  به وسیله داروی MST-312 صورت گرفت. ژن‌های IL-6 و TNF $\alpha$  دو ژن مهم در تکثیر، بقا و پاتوژنز مالتیپل میلوما بودند.

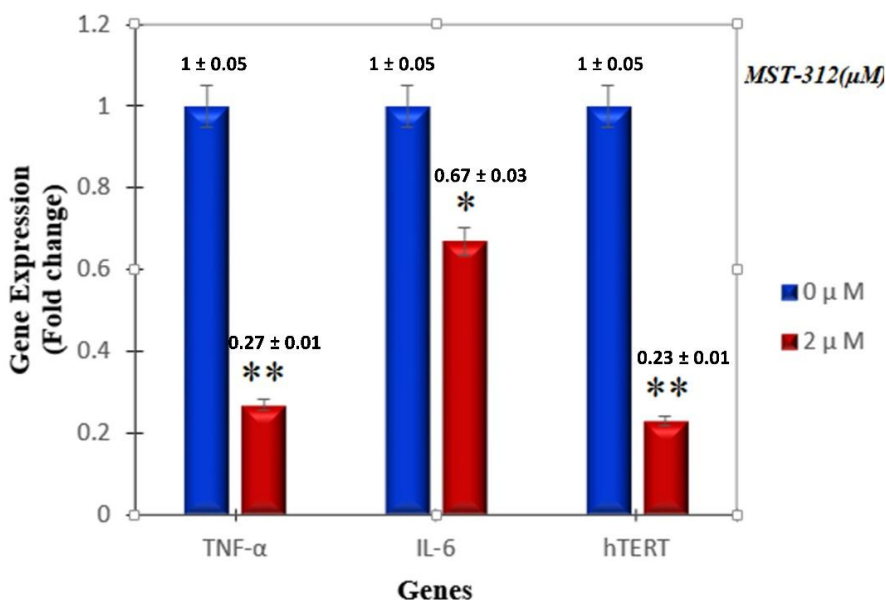


نمودار شماره ۱: تأثیر MST-312 روی آپوپتوز سلول‌های U266.

سلول‌های U266 با غلظت‌های مختلف MST-312 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند، سپس اتصال این سلول‌ها به آنکسین-7AAD/ V مورد بررسی قرار گرفت. یک آزمایش از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است.

(۴۸ ساعت)، RNA استخراج و cDNA سنتز شد. نتایج Sybr-green real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داده شده است (نمودار شماره ۲).

داروی مهارکننده تلومراز MST-312، بیان ژن‌های التهابی IL-6، TNF $\alpha$  و ژن hTERT را کاهش دادند. پس از تیمار سلول‌های U266 با داروی MST-312 (دوز ۲ میکرومولار در بازه زمانی



نمودار شماره ۲: تأثیر MST-312 روی بیان ژن‌های التهابی IL-6، TNF $\alpha$  و ژن hTERT در سلول‌های U266.

پس از تیمار سلول‌های U266 با داروی MST-312 (دوز ۲ میکرومولار در بازه زمانی ۴۸ ساعت) RNA استخراج و cDNA سنتز شد. نتایج Sybr-green real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داده شده است.

مطالعات قبلی در تومورهای مغزی نشان داده‌اند بسته به زمان مواجهه با دارو، MST-312 دارای دو اثر متفاوت است: اثر حاد کوتاه‌مدت که در پی مواجهه کوتاه‌مدت (۷۲ ساعت) با MST-312 رخ می‌دهد و منجر به آسیب DNA، توقف چرخه سلولی در G2/M و افزایش مرگ سلولی می‌شود (۱۷). این اثر مستقل از کوتاه‌شدن تلومر بوده و به‌وسیله جداکردن کمپلکس تلومراز از DNA تلومر، سپس شناسایی تلومر به‌عنوان شکست DNA دو رشته‌ای توسط مسیر ATM وساطت می‌گردد و تیمار طولانی‌مدت (بیش از یک‌ماه و نیم) که منجر به کوتاه‌شدن قابل‌توجه طول تلومر می‌شود (۱۸). MST-312 مانند سایر مهارکننده‌های تلومرازی در صورت تیمار کوتاه‌مدت دارای اثر حادی بوده که مستقل از کوتاه‌شدن طول تلومری است. این اثر حاکی از نقش‌های غیرکانونی تلومراز یا به‌عبارتی مستقل از کاهش طول تلومر است. همچنان‌که مطالعات اخیر نیز به این نقش‌ها اشاره کرده‌اند، از جمله این فعالیت‌ها می‌توان تنظیم سیکل سلولی، بیان ژن و تنظیم مسیر سیگنالینگ NF-κB توسط تلومراز را نام برد (۱۹، ۲۰). در همین راستا، با توجه به اینکه ژن‌های هدف فاکتور رونویسی NF-κB، من جمله IL-6 و TNF-α نقش مهمی در رشد و بقای سلول‌های میلومی دارند؛ در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر این دارو روی رده سلولی میلومی U266 بررسی گردید.

در این مطالعه با توجه به نتیجه تحقیقات فاطمی و همکاران مبنی بر تأثیر داروی MST-312 بر روی تلومراز و اثرات ثانویه آن مانند مهار فاکتور رونویسی NF-κB و قطع ارتباط ذکر شده این دو (۱)؛ رده سلولی U266 به‌عنوان یک رده با توان تولید اتوکراین IL-6، با داروی ضد تلومرازی MST-312 (غلظت ۲ میکرومولار) و زمان ۴۸ ساعت (کوتاه‌مدت) تیمار شد و مشخص گردید این دارو مانع فعالیت‌های تکثیرزایی و بقای سلول‌های میلومی یا به‌عبارتی، کاهش تولید IL-6 و TNFα به‌عنوان کلیدی‌ترین عوامل در بیماریزایی مالتیپل میلوما می‌شود. جالب توجه است نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌اند داروی MST-312 هیچ تأثیری بر روی سلول‌های طبیعی منونوکلئار خون محیطی (PBMC) ندارد (۱). این موضوع بیان می‌کند MST-312 تأثیر مهاری انتخابی بر روی رشد سلول‌های میلومی داشته و می‌تواند به‌عنوان کاندیدی

همه مقادیر به‌وسیله بیان ژن GAPDH نرمالیزه شدند. نتایج به‌صورت سه بار تکرار (n=3) و همه مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean±S.D) ارائه شده‌اند (\*p<0.05، \*\*p<0.01، در مقایسه با سلول‌های تیمارنشده با MST-312).

## بحث

درمان هدفمند (Targeted Therapy)، در سرطان به معنی درمان با عوامل و موادی است که از طریق مداخله با مولکول‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی خاص، مانع رشد و گسترش سرطان می‌شوند. توسعه درمان هدفمند، نیازمند شناخت دقیق اهداف دارویی و مولکول‌های درگیر در پروسه سرطان‌زایی است و در این میان، هدف قرار دادن آن دسته از مولکول‌ها حایز اهمیت و تأثیر بیشتری است که نقش‌های کلیدی را در تومورزایی ایفا می‌کنند (۱۲). مالتیپل میلوما نیز مانند سایر سرطان‌ها به‌دلیل درگیری مولکول‌های خاص تومورزا، کاندید درمان هدفمند و توسعه درمانی در این زمینه است. امروزه، با شناخت مسیرهای پیام‌رسانی در مالتیپل میلوما و علم به مولکول‌های کلیدی دخیل در پاتوژنز این بیماری، پیشرفت‌هایی حاصل شده است، اما همچنان این بیماری، یک بیماری غیرقابل درمان محسوب شده و لذا یافتن راهکارهای جدید درمانی ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۳). همچنین با توجه به نقش بالای فعالیت تلومراز و ارتباط ذکر شده آن با فاکتور رونویسی NF-κB در مالتیپل میلوما به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین مولکول‌های دخیل در بیماریزایی این بدخیمی، دانشمندان راهکارهای مختلفی جهت مهار تلومراز ارائه و آزمایش کرده‌اند؛ چراکه مهار NF-κB ممکن است به سلول‌های نرمال نیز آسیب برساند، اما تلومراز جزء سلول‌های جنسی و بنیادی بوده و فعالیت چندانی در سلول‌های سوماتیک ندارد. لذا هدف قراردادن آن، کمترین آسیب را در بر خواهد داشت (۱۴). در تحقیقات پیشین، ترکیبات مختلفی به‌عنوان مهارکننده تلومراز معرفی شده‌اند (۱۵). در این میان، اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG) که کاتچین اصلی چای سبز است، به‌صورت مؤثری تلومراز را مهار می‌کند. مشتقات مختلفی از این ماده (شامل: MST-312، MST-295 و MST-199) در دسترس است که در این بین، MST-312 به‌طور مؤثرتری تلومراز

را مهار می‌کند (۱۶).

مناسب جهت درمان مالتیپل میلوما پیشنهاد گردد.

## تشکر و قدردانی

## نتیجه گیری

بدین وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت درمان و آزمایشگاه پیوند اعضای دانشگاه علوم پزشکی کرمان جهت حمایت‌های علمی و کارمندان مرکز که در اجرای این طرح همکاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

در این مطالعه اثر کاهش سایتوکاین‌های التهابی دخیل در پاتوژنز مالتیپل میلوما بر روی رده‌های سلولی U266 نشان داده شد با توجه به نتایج، MST-312 را می‌توان به‌عنوان ماده‌ای با اثر مهاری در برابر سلول‌های مالتیپل میلوما در نظر گرفت. انجام تحقیقات گسترده‌تر جهت شناخت مکانیسم‌های اثر این دارو ضروری است.

## References:

1. Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF- $\kappa$ B pathway. *Tumour Biol* 2015;36(11):8425-37. PubMed
2. Gadó K, Domján G, Hegyesi H, Falus A. Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biol Int* 2000;24(4):195-209. PubMed
3. Treon SP, Anderson KC. Anderson, Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Curr Opin Hematol* 1998;5(1):42-8. PubMed
4. Mauro C, Zazzeroni F, Papa S, Bubici C, Franzoso G. The NF- $\kappa$ B transcription factor pathway as a therapeutic target in cancer: Methods for detection of NF- $\kappa$ B activity. *Methods Mol Biol*. 2009;512:169-20. PubMed
5. Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS. Identification of NF-kappaB-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 2003;22(13):2054-64. PubMed
6. Gupta S, Bi R, Kim C, Chiplunkar S, Yel L, Gollapudi S. Role of NF-kappa B signaling pathway in increased tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. *Cell Death Differ* 2005;12(2):177-83. PubMed
7. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 2001;20(33):4519-27. PubMed
8. Jöhner K, Janke K, Krugmann J, Fiegl M, Greil R. Transendothelial migration of myeloma cells is increased by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  via TNF receptor 2 and autocrine up-regulation of MCP-1. *Clin Cancer Res* 2004;10(6):1901-10. PubMed
9. Chang JT, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem* 2002;269(14):3442-50. PubMed
10. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, Khattar E, Shin EM, Yan TD, et al, Telomerase directly regulates NF- $\kappa$ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 2012;14(12):1270-81. PubMed
11. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;88(2):308-16. PubMed
12. Cunningham AP, Love WK, Zhang RW, Andrews LG, Tollefsbol TO. Telomerase inhibition in cancer therapeutics: molecular-based approaches. *Curr Med Chem* 2006;13(24):2875-88. PubMed
13. Gerber DE. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments *Am Fam Physician* 2008;77(3):311-9. PubMed
14. Dolloff NG, Talamo G. Targeted therapy in multiple myeloma. *Adv Exp Med Biol* 2013;779:197-221. PubMed



15. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho P, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(5193):2011-5. PubMed
16. Olausson KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;57(3):191-214. PubMed
17. Shay JW, Wright WE. Telomerase: A target for cancer therapeutics, in *Gene-Based Therapies*. *Cancer Cell* 2010;2(4):257-65. Link
18. Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, Fernandez-Marcelo T, Iniesta P, Ortiz-de-Solorzano C, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer* 2011;10:96. PubMed
19. Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW. Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96(1):73-81. PubMed
20. Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, Kotsch M, Schwenzer B, Wirth MP, et al. Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9(10 Pt 1):3794-800. PubMed