دانشور
پزشکی

بررسی القای آپوپتوز در رده سلولی NB4 تیمار شده با آرسنیک تری‌اکسید به‌وسیله آزمون کامت خنثی

نویسندگان: فرحناز اصغری[1]، دکتر حسین مزدارانی[2*] و مسعود سلیمانی[3]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه خون‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد گروه ژنتیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشجوی دکتری گروه خون‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
* نویسنده مسئول: Email: mozdarah@modares.ac.ir

چکیده

هدف: بررسی القای آپوپتوز در رده سلولی NB4 تیمار شده با آرسنیک تری‌اکسید به‌وسیله آزمون کامت یا الکتروفورز تک سلول بر روی ژل و قابلیت به‌کارگیری آزمون کامت خنثی به‌عنوان ابزاری برای شناسایی سریع سلول‌های آسیب دیده و آپوپتوتیک.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، رده سلولی NB4 در شرایط آزمایشگاهی تحت تأثیر دوزهای مختلف آرسنیک تری‌اکسید (۰/۱-۳ µmol/l) قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت، آزمون کامت خنثی بر روی نمونه‌های موجود انجام و نتایج آن، به‌منظور بررسی آسیب‌های وارد بر DNA طی فرایند آپوپتوز بررسی گردید. در این روش، سلول‌ها بعد از تیمار، در میان لایه‌های آگارز قرار داده شدند و پس از انجام مرحله لیز، الکتروفورز بر روی آن‌ها انجام گردید. سلول‌های با میزان آسیب DNA پس از رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسانت متصل شونده به DNA (برومید اتیدیوم) در زیر میکروسکپ فلورسانس، شکلی شبیه به ستاره دنباله‌دار ایجاد می‌کنند. فراوانی سلول‌های آپوپتوتیک برای هر نمونه تعیین و با روش آزمون «تی» و من ویتنی مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های NB4 با آرسنیک تری‌اکسید (ATO) موجب القای آپوپتوز شده است. این اثر در عین حال که وابسته به دوز و زمان تیمار است با $p<0/01$ با گروه کنترل برای تمام دوزهای مورد استفاده اختلاف معنادار را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد آرسنیک تری‌اکسید از قابلیت بالایی برای القای آپوپتوز برخوردار است و نیز آزمون کامت خنثی یک روش کاربردی مناسب برای بررسی و ارزیابی آپوپتوز القا شده توسط داروها محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک تری‌اکسید، رده سلولی NB4، آپوپتوز، آزمون کامت خنثی

دوماهنامه علمی - پژوهشی دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۶۳
تیر ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۶/۱۸
تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute Promyelocytic Leukemia: APL) یکی از انواع اختصاصی لوسمی‌های میلوییدی حاد (Acute Myeloid Leukemia: AML) است. در این بیماران، جابه‌جایی کروموزومی t(15;17) مشاهده می‌شود که منجر به الحاق ژن PML (کروموزم ۱۵) و ژن RARα (کروموزم ۱۷)، ایجاد ژن الحاقی و پروتئین لکوموژنیک PML_RARα می گردد [۱،۲و۳]. بیماران APL حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد AML را به‌خود اختصاص می‌دهند [۳و۴]. در حدود ۹۰ درصد از این بیماران DIC (Disseminated Intravascular Coagulopathy) گزارش شده است. امروزه از روش‌های تمایز درمانی به‌منظور درمان سلول‌های لوسمیک نابالغ برای القا و دستیابی به فنوتیپ بالغ و یا القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز در شیمی درمانی ترکیبی به‌عنوان یک استراتژی جایگزین در درمان بیماری‌های هیپرپرولیفراتیو استفاده می‌گردد[۲].

از جمله مواردی که برای تمایز درمانی به کار رفته‌اند می‌توان از ATRA (All-trans-retinoic acid) و آرسنیک نام برد. استفاده از ATRA در بیماران APL تا حدود ۹۰ درصد منجر به پسرفت (remission) بیماری گردیده و مقاومت به ATRA باعث عود (Relapse) بیماری می‌شود [۱]. تحقیقات حاکی از آن است که استفاده از آرسنیک در بیماران APL که در اثر مقاومت به ATRA دچار عود شده‌اند باعث پسرفت طولانی‌تر بیماری می‌گردد [۵]. آرسنیک توانایی ایجاد تمایز در دوزهای پایین (۰/۱-۰/۵ μm) و القای آپوپتوز در دوزهای بالاتر (۰/۵ -۲ μm) را در سلول‌های لوسمیک در *in vivo* و *in vitro* دارد [۱] و نه تنها یک پسرفت نسبتاً طولانی‌تر و کامل‌تر ایجاد می‌کند، بلکه منجر به طولانی‌تر شدن حیات بیمار نیز می‌گردد. علی‌رغم سمیت مزمن و کارسینوژنیستی، آرسنیک به‌عنوان اولین داروی انتخابی برای درمان بیماران APL مطرح است [۱و۴].

برای بررسی تأثیر داروها، قبل از به‌کار بردن آن‌ها در بیماران، از رده‌های سلولی مختلفی به‌عنوان مدل استفاده می‌شود. یکی از رده‌های سلولی مناسب مورد استفاده در تحقیقات مربوط به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، رده سلولی NB4 است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

یکی از تغییرات سلولی که در فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی رخ می‌دهد، قطعه قطعه شدن شدید DNA سلولی است. روش‌های مختلفی برای بررسی و ارزیابی آپوپتوز وجود دارد. در تکنیک‌های متداول با حساسیت بالا، قطعه قطعه شدن اختصاصی (غیرتصادفی) DNA بررسی می‌گردد. این مشخصه را می‌توان به‌وسیله تکنیک‌های متنوعی از جمله آنالیز ژل آگارز (agarose gel analysis)، الایزا، آنالیز PCR، DNA *in vitro* & end- labeling *in vivo* و آزمون کامت یا ژل الکتروفورز سلول‌های منفرد (Single cell gel electrophorsis) بررسی کرد [۶]. آزمون کامت (آزمون ستاره دنباله‌دار) روشی حساس برای آشکارسازی و تعیین مستقیم آسیب DNA در یک سلول است و امکان بررسی آسیب و ترمیم DNA را تحت شرایط آزمایش متفاوت فراهم می‌آورد[۷]. اهمیت ویژه این تکنیک در آن است که به‌وسیله آن می‌توان تفاوت بین سلول‌ها را از نظر آسیب و ترمیم در هر جمعیت سلولی یوکاریوتی بررسی کرد [۶]. به‌علاوه، این روش، مطالعه شیوه‌های مختلف ترمیم DNA از قبیل ترمیم برش نوکلئوتید (nucleotide excision repair) و ترمیم برش باز (base excision repair) را امکان‌پذیر می‌سازد. علاوه بر این موارد، قطعه قطعه شدن DNA مربوط به مرگ سلولی یا آپوپتوز نیز می‌تواند توسط این روش ارزیابی گردد [۸]. استفاده از این تکنیک از مزایای متعدد برخوردار است. سادگی، سرعت، حساسیت بالا، نیاز به تعداد کم سلول در نمونه، قابل اعتماد بودن و تعیین آسیب در تک تک سلول‌ها از جمله مزیت‌های آزمون کامت در برابر سایر روش‌های ارزیابی آسیب‌های DNA است [۶و۹]. برای بررسی آسیب‌ها با این روش نیازی

Archive of SID

www.SID.ir

به کشت سلول‌ها نیست و نتایج ظرف مدت چند ساعت پس از نمونه‌گیری از سلول‌ها قابل دستیابی است. بررسی میکروسکوپی سلول‌ها در این روش، پیچیدگی‌های بررسی کروموزوم‌ها را در روش‌های آنالیز متافاز و SCE ندارد و با دقت و سرعت و بدون نیاز به تبحر خاص در مسائل سیتوژنتیک انجام‌پذیر است.

آزمون کامت، حساسیت و قابلیت خود را به‌عنوان یک تکنیک به‌منظور ارزیابی آسیب DNA ناشی از عوامل متنوع شیمیایی و فیزیکی در میان انواع مختلف سلول‌ها نشان داده است [۱۰]. آزمون کامت در مقایسه با سایر روش‌ها، حساس‌تر، سریع‌تر و مقرون به صرفه‌تر است. این آزمون رها شدن DNA از کمپلکس فراپیچیده DNA_ پروتئین را تشخیص می‌دهد و از این لحاظ، مشابه سایر روش‌های حساس تعیین شکست‌های رشته‌های DNA در سلول‌های پستانداران همچون رسوب‌دهی DNA، Alkali Elution، Alkali Unwinding و Nucleotide Sedimentation است. ژل الکتروفورز سلول‌های منفرد (single cell gel electrophoresis) یا آزمون کامت (آزمون ستاره دنباله‌دار)، روشی حساس برای آشکارسازی شکستگی‌های رشته‌های DNA و اندازه‌گیری فرایندهای ترمیمی در سطح یک سلول به‌دست می‌دهد [۱۱و۱۲].

هدف از انجام این تحقیق، بررسی قابلیت آرسنیک تری‌اکسید (ATO) در القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 و نیز قابلیت آزمون کامت خنثی برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

محیط کشت RPMI-1640 (Sigma)، دی‌سدیم (Na_2EDTA)، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (Sigma)، آرسنیک تری‌اکسید (AS_2O_3)، آگارز معمولی، تریتون X-100 (TritonX-100)، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، سدیم ان لوریل سارکوزان (N lauroyl sarcosine sodium salt - Na SLS)، بوریک اسید (boric acid)، کلرید سدیم (NaCl) از شرکت (Merck)، سرم جنین گوساله (fetal calf serum) (Gibco)، آگارز با نقطه ذوب پایین (Fermentas)، تریس بازی (Tris base) (Roche)، تریپان بلو (Trypan Blue) و رنگ رایت – گیمسا (Merck) تهیه شد.

۲-۲- وسایل و دستگاه‌ها

از لام‌های مخصوص آزمون کامت، تانک الکتروفورز مدل SEU-7305 و منبع تغذیه الکتروفورز مدل EPS-600 (پایا پژوهش)، و میکروسکوپ فلورسانت مجهز به فیلتر Barrier مناسب «Nikon E 800 استفاده شد.

۲-۳- رده سلولی NB4

این رده سلولی، مشتق شده از لوسمی میلوییدی حاد با جابه‌جایی کروموزومی t (15;17) از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور) تهیه گردید.

۲-٤-کشت و تیمار دارویی سلول NB4

رده سلولی NB4 در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی(FBS) و اتمسفر حاوی ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد CO_2 در فلاسک کشت سلول استریل ۲۵ml کشت داده شد و به‌طور روزانه مورد بررسی قرار گرفت. پس از چند روز، هنگامی که شمارش سلولی به 10^6 سلول به ازای هر میلی‌لیتر محیط رسید، برداشت سلول‌ها انجام گرفت و سایر آزمایش‌ها صورت پذیرفت.

پس از شمارش سلول‌ها و اطمینان از زنده بودن بیش از ۹۰ درصد آن‌ها، در هر چاهک‌از میکروپلیت‌های حاوی ۱ml محیط RPMI با ۱۰ درصد FBS به تعداد 1×10^5 سلول اضافه گردید و سپس آرسنیک تری‌اکسید با دوزهای‌مختلف (µmol/l ۳ و ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۱، ۰) به محیط حاوی سلول افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37^{oC} و جریان هوای دارای ۵ درصد CO_2 انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت، پلیت را از انکوباتور خارج کرده، در شرایط استریل از هر چاهک نمونه‌برداری گردید و میزان زنده بودن سلول‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین و آزمون کامت خنثی در مورد هر نمونه انجام شد.

۲-۵- آماده سازی لام

به‌منظور آماده‌کردن لام‌ها، با ایجاد تغییرات کوچک، از روش شرح داده شده توسط کالینز و همکاران او (Collins *et al.*) استفاده گردید [۱۳]. در تحقیق حاضر، ابتدا لام‌ها با استفاده از ژل آگارز که با غلظت ۱ درصد در آب مقطر تهیه گردیده بود پوشانده شدند. بدین‌منظور لام‌ها در یک بشر (۵۰ ml) حاوی محلول آگارز معمولی ۱ درصد فرو برده شدند و پس از خارج کردن، پشت آن‌ها به کمک دستمال تمیز شد و در انکوباتور خشک شدند.

پس از ۲۴ ساعت، مقدار ۳۵۰ λ از محیط RPMI 1640 حاوی‌سلول‌های‌تیمار شده فوق به میکروتیوب‌های اپندروف منتقل و سپس در سانتریفوژ یخچال‌دار به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm قرار داده شد. پس از آن، مایع بالای ته نشست سلولی به‌طور کامل دور ریخته شد و بلافاصله مقدار ۱۴۰ میکرولیتر آگارز LMP (Low Melting Point Agarose) (آگارز با نقطه ذوب پایین) ۰/۷۵ درصد (تهیه شده با PBS) به سلول‌ها اضافه گردید و این مخلوط با خارج و داخل کشیدن سریع و مکرر آگارز توسط سمپلر به‌طور کامل مخلوط شد. با استفاده از همان سرسمپلر، مقدار ۱۴۰ میکرولیتر از مخلوط برداشته و به‌صورت دو قطره مساوی بر روی دو پنجره لام کامت قرار داده شد. هر پنجره را توسط یک لامل ۲۴×۲۴mm پوشانده و لام‌ها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در یخچال قرار داده شد تا آگارز سفت شود. از ژل آگارز LMP با غلظت ۰/۷۵ درصد در PBS، به‌عنوان بستر سلول‌ها حین آزمون کامت استفاده می‌گردد. پس از سفت شدن آگارز، لامل برداشته شد و آزمون کامت بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. در این تحقیق از لام‌های مخصوص کامت واجد سطوح حاشیه‌ای که چسبندگی ژل را افزایش می‌دهند و پنجره‌های شفاف که امکان مطالعه آسیب‌های موجود را آسان‌تر می‌کنند، استفاده شد.

۲-۶- آزمون کامت خنثی

به‌منظور بررسی آپوپتوز (شکست‌های القا شده در دو رشته DNA (DSBs) در این تحقیق از آزمون کامت خنثی، پروتکل ارائه شده توسط شرکت Trevigen استفاده گردید [۱۴]. پس ازخارج ساختن لام‌های آماده شده از یخچال، لامل‌های آن‌ها را برداشته و لام‌ها به‌صورت افقی در یک ظرف مناسب قرار داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول لیزیس باpH=۱۰/۸، حاوی ۲/۵ mM کلرید سدیم، ۱۰۰ mM EDTA، ۱۰mM تریس، ۱ درصد سدیم لوریل سارکوزان که به فاصله کوتاهی قبل از انجام آزمون به آن تریتون X-۱۰۰ به نسبت ۱ درصد و DMSO به نسبت ۱۰ درصد اضافه شده بود روی لام‌ها ریخته شد و این مجموعه به میزان ۳۰ دقیقه در ۴°C در داخل یخچال قرار گرفت. پس از مرحله لیزیس، سلول‌ها سه بار، هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با بافر TBE شستشو شدند تا محلول لیزیس از لام‌ها پاک شود. این عمل با قرار دادن لام‌ها در بافر TBE با pH=۸/۳ حاوی ۹۰ mM تریس، ۹۰ mM بوریک اسید، ۲ mM EDTA در دمای ۴°C صورت پذیرفت. پس از شستشوی لام‌ها، مرحله الکتروفورز آغاز می‌گردد. به این منظور، لام‌ها در یک تانک الکتروفورز افقی حاوی بافر TBE با دمای ۴°C قرار گرفتند. با توجه به ابعاد تانک مورد استفاده در آزمایشگاه، ولتاژ منبع‌تغذیه بر روی ۲۰ ولت (۰/۸V/cm) تنظیم گردید. با کم و زیاد کردن حجم محلول TBE×۱ موجود در تانک و تغییر سطح آن، شدت جریان بر روی ۹mA تنظیم گردید. طول مدت الکتروفورز ۱۰ دقیقه و دمای محلول الکتروفورز C ° ۴ بود. پس از اتمام الکتروفورز، لام‌ها از محفظه خارج و در ظرف مناسب به‌طور افقی قرار داده شدند و مدت ۵ دقیقه در معرض آب مقطر قرار گرفتند. سپس آب داخل ظرف تخلیه شد و لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در اتانل قرار داده شدند. پس از این مرحله، لام‌ها در معرض هوای اتاق خشک شدند.

رنگ‌آمیزی لام‌های تهیه شده توسط اتیدیوم بروماید با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر (۲ µg/ml) انجام گرفت. برای مشاهده کامت‌ها از میکروسکوپ

Archive of SID

www.SID.ir

اپی‌فلورسنت (Nikon E800) با محدوده طول موج ۵۱۶-۵۴۶ نانومتر و همچنین فیلتر Barrier با طول موج ۵۹۰ نانومتر و با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر استفاده گردید. ارزیابی نتایج به‌صورت چشمی انجام گرفت. شمارش سلول‌های آپوپتوتیک و سالم در هر پنجره لام کامت (۵۰۰ سلول) انجام شد و محاسبه درصد آپوپتوز صورت پذیرفت و نتایج ثبت گردید. در سلول‌های سالم DNA در ناحیه مخصوص به‌خود باقی مانده و به شکل کروی در میدان دید میکروسکپی کاملاً قابل تشخیص است، درحالی که سلول‌های آپوپتوتیک، همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد منظره خاصی شبیه به یک ستاره دنباله‌دار را به نمایش می‌گذارد.

بررسی آماری

نتایج حاصل از آپوپتوز القا شده تحت تأثیر دوزهای مختلف داروی آرسنیک تری‌اکسید ۲۴ ساعت بعد از تأثیر دارو با روش آزمون «تی» و من‌ویتنی مقایسه گردیدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

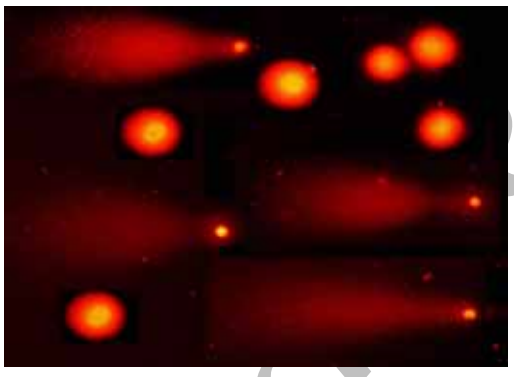
نتایج

به‌منظور به‌دست آوردن رابطه بین آپوپتوز ایجاد شده در رده سلولی NB4 متعاقب تأثیر دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید از آزمون کامت خنثی استفاده شد. سلول‌ها تحت تأثیر دوزهای مختلف «µmol/l» ۳ و ۲ و ۱/۵و ۱ و ۰/۵ و ۰/۱ و ۰ قرار داده شدند. بررسی هر دوز، پنج بار تکرار شد. پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌گیری به عمل آمد و پس از آن بر طبق پروتکل آزمون کامت خنثی، مورد آزمون قرار گرفتند. پس از آزمون، لام‌ها رنگ‌آمیزی شدند و توسط روش مشاهده‌ای مورد آنالیز قرار گرفتند و نتایج حاصل از لام‌ها در هر آزمون به‌دست آمد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، در آزمون رابطه مشخص دوز پاسخ قابل مشاهده است و با افزایش دوز، آپوپتوز ایجاد شده در سلول‌ها به‌طور قابل ملاحظه افزایش می‌یابد.

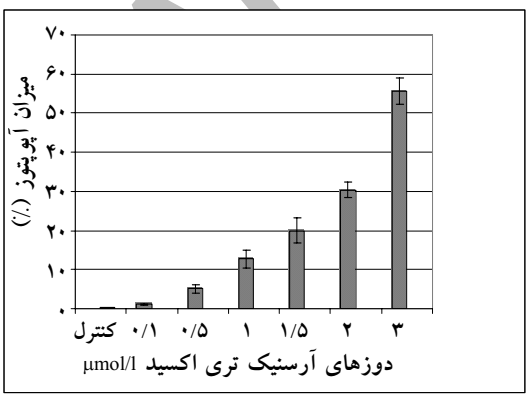
بررسی‌های آماری انجام شده به کمک آزمون ناپارامتری من‌ویتنی مبین وجود اختلاف معنادار بین آپوپتوز القا شده در سلول‌های تیمار شده با آرسنیک تری‌اکسید در هر یک از دوزهای µmol/ml ۳ و ۲ و ۱ و ۰ و ۰/۱ نسبت به دوز کنترل (بدون دارو) است ($p<0/01$).

همچنین اختلاف معناداری در بین دوزهای ۰/۱µmol/ml با تمامی دوزها و دوز ۰/۵ با ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ و دوز ۱ با دوزهای ۲ و ۳ مشاهده گردید ($p<0/01$).

بررسی نتایج حاصل از شمارش سلول‌ها به‌وسیله تریپان بلو در دو زمان صفر و ۲۴ ساعت در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج، نشانگر افزایش مختصر رشد سلولی در دوز آرسنیک تری اکسید ۰/۱ نسبت به کنترل و پس از آن، یک کاهش تدریجی در دوزهای بالاتر از ۰/۵ تا ۳ میکرومول است.



شکل ۱ سلول‌های سالم وآپوپتوتیکNB4 پس از آزمون کامت خنثی



شکل ۲ تغییرات آپوپتوتیک ایجاد شده در رده سلولی NB4 متعاقب تأثیر دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید پس از ۲۴ ساعت به‌وسیله آزمون کامت خنثی

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی‌های آماری که بر روی نتایج شمارش سلولی انجام شد وجود اختلاف معنادار بین دوزهای ۱/۵، ۲ و ۳ را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (p<۰/۰۵)؛ ولی در دوزهای ۰/۱ و۰/۵ و۱ با دوز کنترل اختلاف معناداری وجود ندارد. همچنین اختلاف معناداری بین دوز ۰/۱ با دوزهای ۱/۵ و ۲ و۳، دوز ۰/۵ با دوزهای ۱/۵ و ۲ و ۳، دوز ۱ با دوزهای ۲ و ۳، دوز ۱/۵ با دوزهای ۲ و ۳، و دوز ۲ با دوز ۳ مشاهده گردید (p</۰/۰۵).

جدول ۱ مقایسه میزان تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک تری اکسید بر رشد رده سلولی NB4 و میزان آپوپتوز

درصد آپوپتوز	سلول× $۱۰^{٤}$/ml (Mean±SE)		Treatment
	۲۴ hr	۰ hr	
۰/۴۴±۰/۰۴	۲۵/۸±۳/۸	۱۰	کنترل
۱/۲۳±۰/۱۵	۳۲±۷/۳۵	۱۰	آرسنیک تری‌اکسید ۰/۱(µmol/l)
۵/۰۶±۰/۹۳	۲۳/۳±۴/۰۲	۱۰	آرسنیک تری‌اکسید ۰/۵(µmol/l)
۱۲/۷۷±۲/۲۶	۱۵/۱±۳/۲۳	۱۰	آرسنیک تری‌اکسید ۱(µmol/l)
۱۹/۹۵±۳/۱۴	۱۰/۴±۰/۷۳	۱۰	آرسنیک تری‌اکسید ۱/۵(µmol/l)
۳۰/۳۷±۱/۹۲	۶/۹±۰/۷۳	۱۰	آرسنیک تری‌اکسید ۲(µmol/l)
۵۵/۶۵±۳/۲	۴/۵±۰/۳۱	۱۰	آرسنیک تری‌اکسید ۳(µmol/l)

بحث

درمان انتخابی برای بیماران APL تمایز درمانی است. در این روش، ترکیبات اسید رتینوئیک در غلظت فارماکولوژیک، قادر به تبدیل بلاست‌های لوکمیک به سلول‌های تمایز یافته رده نوتروفیلی هستند و به‌جای القای تأثیرات سیتوتوکسیک و کشنده، هماتوپوئتیک نرمال، جانشین کلون‌های بدخیم لوکمیک می‌گردد. امروزه از عوامل آنتی‌نئوپلاستیک بسیار متنوع به‌طور متداول در انکولوژی بالینی استفاده می‌شود. از جمله موادی که برای تمایز درمانی به کار رفته‌اند می‌توان از ATRA و آرسنیک تری‌اکسید نام برد. استفاده از ATRA در بیماران APL تا حدود ۹۰ درصد منجر به پسرفت گردیده و مقاومت به ATRA باعث عود بیماری می‌گردد [۱].

تحقیقات حاکی از آن است که استفاده از آرسنیک باعث پسرفت طولانی‌تر در بیماران APL که در اثر مقاومت به ATRA دچار عود شده‌اند می‌گردد [۵]. آرسنیک توانایی ایجاد تمایز نسبی در دوزهای پایین (۰/۵-۰/۱ µ mol/lit) و القای آپوپتوز در دوزهای بالاتر (۰/۵–۲ µ mol/lit) را در سلول‌های لوسمیک در *in vivo* و *in vitro* را دارد [۱] و نه تنها یک پسرفت نسبتاً طولانی‌تر و کامل‌تر ایجاد می‌کند، بلکه منجر به طولانی‌تر شدن زمان حیات بیمار می‌گردد.

علی‌رغم سمیت مزمن و کارسینوژنیستی، آرسنیک تری‌اکسید به‌عنوان اولین داروی انتخابی برای بیماران APL مطرح است [۱و۴]. در سال ۲۰۰۰ در FDA امریکا، در پی انجام مطالعاتی، این دارو به‌عنوان داروی مناسب در درمان بیماران APL در موارد مقاوم و یا عود مجدد مورد تأیید قرار گرفت [۵]. با وجود این، در درمان با آرسنیک نیز در ۷۰ درصد موارد لکوسیتوز و سندرمی مشابه به سندرم رتینوئیک ایجاد می‌کند و عود را به همراه دارد [۱۵]. لذا امروزه توجه به روش‌های درمانی دارای عوارض جانبیِ کم‌تر و ایجاد بهبود بیش‌تر و عود پایین‌تر در بین محققان و پزشکان افزایش یافته است.

همان‌طور که در جدول ۱ و شکل ۲ مشاهده می‌گردد میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیمار شده با آرسنیک تری‌اکسید نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشته (p<۰/۰۱) و این افزایش دوز دارو نقش مهمی در افزایش درصد آپوپتوز دارد. شمارش سلولی، نشانگر کاهش رشد سلولی در دوز بالاتر از ۰/۵ میکرومول آرسنیک تری‌اکسید است که این تفاوت در دوز بالاتر از ۱/۵ میکرومول معنادار است (p<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

میلر (Miller) در سال ۲۰۰۲ ضمن مرور اهداف مولکولی AS_2O_3 در سلول‌های بدخیم به این مطلب اشاره کرده که سلول‌های APL (NB4) در پاسخ به مقادیر کم‌تر آرسنیک دچار آپوپتوز و مهار رشد گردیده‌اند و این به علت خاصیت آپوپتوتیک AS_2O_3 است. همچنین AS_2O_3 موجب تأثیر در نسخه‌برداری تعداد وسیعی از ژن‌های مؤثر در پاسخ میتوژنی، پیشرفت چرخه سلولی، و مرگ برنامه‌ریزی شده می‌گردد [۵].

لو و همکارانش (Lu *et al.*) در سال ۱۹۹۹ تأثیرات AS_2O_3 را در درصد زنده بودن، پرولیفراسیون و آپوپتوز رده‌های سلولی لوسمیک مگاکاریوسیتیک انسانی HEL, M07e, UT7, Meg-01 بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که غلظت ۲-۰/۱ میکرومول AS_2O_3 موجب ممانعت از رشد (وابسته به دوز و زمان) در هر چهار رده سلولی مورد مطالعه می‌گردد. استفاده از تکنیک TUNEL Assay نشانگر القای اختصاصی آپوپتوز تحت تأثیر غلظت ۲- ۰/۵ میکرومول AS_2O_3 در هر چهار رده سلولی بوده و تحت همین غلظت‌های AS_2O_3 نتایج مشابه در مورد NB4 نیز به‌دست آمده است. آنان در بخش نتایج خود تحت غلظت ۲- ۰/۵ میکرو مول AS_2O_3 پس از ۲۴ ساعت و با استفاده از TUNEL Assay ۶۰-۲۰ درصد آپوپتوز در رده‌های سلولی، مگاکاریوسیتی را گزارش کرده‌اند نتایج فوق در مورد NB4 هم صادق بود، ولی در مورد HL60 صدق نمی‌کند [۱۶].

نتایج تحقیق حاضر در مورد القای آپوپتوز و یا تمایز و همچنین مهار رشد توسط آرسنیک تری‌اکسید با نتایج دیگر محققان قابل مقایسه است. همان‌طور که اشاره شد آرسنیک تری‌اکسید در دوزهای پایین (۰/۱-۰/۵ µmol/l) القای تمایز می‌کند که با توجه به نتایج حاصل از بررسی مرفولوژی لام‌ها، این مورد مشاهده می‌شود؛ ولی برای تأیید نهایی تمایز نیاز به آزمایش‌های اختصاصی است. اما در همین دو دوز، آپوپتوز به میزان ۱/۲۳±۰/۱۵ در دوز ۰/۱ و به میزان ۵/۰۶±۰/۹۳ در دوز ۰/۵ µmol/l مشاهده گردید (جدول ۱)، هر چند یادآوری این نکته لازم است که احتمال وقوع همزمان هر دوحالت آپوپتوز و یا تمایز در این دوزها نیز وجود دارد [۱۷]، ولی در مجموع در تمام گزارش‌های منتشر شده یک اثر القای آپوپتوز وابسته به دوز در غلظت‌های ۲-۰/۵µmol/l گزارش شده است [۱،۱۲و۱۵] که نتایج این تحقیق نیز با آن مطابقت می‌کند (شکل ۲ و جدول ۱). در نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داده شد که غلظت ۲-۰/۱ میکرومول AS_2O_3 موجب ممانعت از رشد (وابسته به دوز و زمان) می‌گردد (جدول ۱) و کاهش رشد در دوز بالاتر از ۱/۵ میکرو مول معنادار است.

در سال ۱۹۹۸ جیانی (Gianni) مطرح کرد که در خلال درمان با AS_2O_3 به‌علت این‌که آپوپتوز سریع‌تر رخ می‌دهد، سلول‌ها فرصت کافی برای تمایز ندارند. علاوه بر این، رشد سلول‌های NB_4 در غلظت‌های پایین AS_2O_3 به همان خوبی در NB4-AS^R درمان شده با غلظت‌های بالای AS_2O_3 ، به همراه اندکی تمایز مشاهده می‌شود [۳]. پرکینز (Perkins) در سال ۲۰۰۰ نتیجه‌گیری کرد که درمان با آرسنیک باعث آپوپتوز می‌گردد [۱۸]. نلمس (Nelms) در ۱۹۹۷ به‌منظور ارزیابی آپوپتوز در سلول‌ها از آزمون کامت استفاده می‌کرد. وی رده سلولی HL60 را با استفاده از آنیزومایسین (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲ ساعت در ۳۷°C تیمار کرد و سپس آزمون کامت قلیایی را بر روی نمونه‌ها انجام داد و با استفاده از اندازه‌گیری ممان دنباله کامت بین نمونه‌ها به آنالیز نتایج پرداخت و اعلام داشت که ممان دنباله کامت بیش از ۱۱۰ نشانه‌ای از آپوپتوز است [۱۹].

همان‌طور که در شکل ۱ نیز مشاهده می‌گردد ممان دنباله کامت در نمونه‌های این تحقیق افزایش یافته به‌طوری که از سلول سالم کاملاً قابل افتراق است.

یاسوهارا و همکارانش (Yasuhara *et al.*) در سال ۲۰۰۳ در مقایسه‌ای که بین استفاده از روش‌های فلوسیتومتری، بررسی میکروسکپ الکترونی، و آزمون

Archive of SID

www.SID.ir

کامت خنثی برای شناسایی آپوپتوز انجام داد، کارایی بالای این آزمون را برای افتراق بین آپوپتوز و نکروز مطرح کرده‌اند [۲۰].

از جمله مزایای آزمون کامت خنثی برای بررسی اپوپتوز عبارت است از: الف) داده‌ها در سطح سلول‌های منفرد جمع‌آوری می‌شوند که بدین‌ترتیب اطلاعاتی در مورد نحوه توزیع بین سلولی آسیب و ترمیم فراهم می‌شود؛ ب) تنها مقدار کمی سلولی برای آزمون مورد نیاز است (فقط چند هزار سلول)، ج) تقریباً هر نوع جمعیت سلولی یوکاریوتی را می‌توان با این تکنیک بررسی کرد.

توانایی آزمون کامت برای شناسایی سلول‌های حساس یا پاسخ‌دهنده در یک جمعیت سلولی که از سایر جنبه‌ها طبیعی هستند، در تعیین روابط پاسخ به دوز کم، در تشخیص افتراقی آسیب‌های سیتوژنتیک و ژنوتوکسیک، و نیز در ارزیابی‌های کمّی که نمایانگر تفاوت بین سلول‌ها، بافت‌ها، اندام‌ها و افراد هستند، از اهمیت خاصی برخوردار است.

منابع

1. Jing, Y., Wang L. , Xia L. ,Chen G. , Chen Z., Miller W. ,Waxman S. Combined Effect of all-trans retinoic acid and Arsenic Trioxide in Acute Promyelocytic Leukemia cell in vitro and in vivo. Blood. 2001; 97: 264-269.
2. Berry M. D., Williams K., Meckling-Gill K.. All trans retinoic acid induces Apoptosis in Acute Promyelocytic NB4 cells when Combined with isoquinolinedios, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor. Leukemia Research.2000; 24: 307-316.
3. Gianni M., Kohen M., Chelbi-Alix M., Benoit G., Lanotte M., Chen Z., The H. Combined Arsenic and Retinoic acid Treatment Enances Differentiation and Apoptosis in Arsenic-Resistant NB4 cell. Blood 1998; 91: 4300-4310.
4. Beatter E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. Williams Hematology, MC GRAW HILL, USA. 2001; 279-287.
5. Miller WH, JR. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cell. The Oncologist. 2002; 7(Suppl.): 14-19.
6. Moravec R, Riss T. Assay systems for detecting apoptosis and cell death, Promega Notes. 1998; Number 68: 13.
7. Stylianos M, Piperakis E, Visvardis, and Aspasia M. Comet assay for nuclear DNA damage. Methods in Enzimology.1999; 300: 184-194.
8. Fairbarin DW, Olive PL, O Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 1995; 339: 37-59.
9. Tice RR, Agurell E, Anderson D,Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC,Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* gentic toxicology testing. Enviromental and Moloecular Mutagensis 2000; 35: 206-221.
10. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. Journal of Chromatography B. 1999; 722: 225-254.
11. Singh N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutation Research. 2000; 455: 111-127.
12. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new tecnique for human biomonitoring studies. Mutation Research.2000; 463: 13-31.
13. Collins AR. The comet assay modified for detection of Oxidised based with the use of bacterial repair endonuclease. Methods Mol Biol. 2002; 186: 147-59.
14. Trevigen, Inc. Comet assay reagent kit for single cell gel electrophoresis assay. TREVIGEN Instructions, Catalog # 4250-050-K, Comet assay interest group website, http://comet assay.com/.2000.
15. Zhu, G. ATRA and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia, EHA, 2001; 159-164
16. Lu M, Levin J, Sulpice E, Grand S, Alemany M, Caen J, Han Z. Effect of arsenic trioxid on viability, prolifrationand apoptosis in human megakaryocytic leukemia cell lines. Experimental Hematology 1999; 27: 845-852
17. Taimi M, Chateau M-T, Cabane S Marti J. Synergistic effect of retinoic acid and 1, 25- dihydroxyvitamine D3 on differentiation of the human monocytic cell line U937. Leuk Res. 1991; 15: 1145.
18. Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x_L. Blood 2000; 95: 1014-1022.
19. Nelms BE. Measuring apoptosis in individual cells with the comet assay. Promega Notes 1997; 64: 13-17.
20. Yasuha S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweing A, Martyn J. Comparison of comet assay ,electron microscopy , and flowcytometry for detection of apoptosis. J Histochem. Cytochem. 2003, 51: 873-885.

Archive of SID

www.SID.ir