Archive of SID

کومش- جلد ۱۹، شماره ۳ (پیاپی ۶۷)، تابستان ۱۳۹۶

اثر بربرین بر بقای سلول‌های طحالی خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئیدی مزمن در In vitro

فرحناز قهرمان‌فرد[۱و۳](M.D)،آرش آقابیگی[۳](M.D)،احسان منوچهری[۱و۲و۶](M.Sc)،مهرنوش پاشایی[۱و۲](M.Sc)، مجید میرمحمدخانی[۴](M.D)، مهدیه شکراللهی باروق[۱](M.Sc)، فاطمه پاک[۱](Ph.D)، محمد فرانوش[۵](M.D)، پرویز کوخایی[*۶](Ph.D)

۱-مرکز تحقیقات سرطان، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲-کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه پزشکی داخلی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۴- مرکزتحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، بخش پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۵- مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان، انستیتو غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۶- آزمایشگاه ایمونولوژی و ژن‌درمانی، مرکز سرطان کارولینسکا، بیمارستان دانشگاه کارولینسکا، استکهلم، سوئد

چکیده

هدف: لوسمی لنفوئیدی مزمن (Chronic lymphocytic leukemia, CLL) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های لنفوئیدی در کشورهای غربی است. به‌طور معمول افراد مسن از طریق تجمع و تکثیر لنفوسیت‌های B دارای مارکرهای $CD19^+$، $CD20^+$، $CD5^+$و $CD23^+$ هستند، درگیر می‌کند. بربرین ترکیبات طبیعی با اختیار ایزوکوئینولون آلکالوئید است که دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشد. شرایط آزمایشگاهی بربرین روده‌های سلول‌های طحالی بیماران بقا و افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های طحالی می‌شود. در این مطالعه به بررسی اثر بربرین بر میزان بقا، آپوپتوز در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)بیماران CLL فلودارابین حساس و فلودارابین مقاوم در حضور یا عدم حضور همجنین مقایسه اثر داروی فلودارابین پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ۱۲ بیمار CLL با استفاده از تکنیک فایکول جدا کرده و سلول‌های PBMC در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با محیط کشت RPMI1640 به همراه AB^+serum با غلظت‌های ۵ تا ۲۰۰ میکرومولار بربرین و غلظت ۱ میکرومولار فلودارابین کشت داده شدند. میزان بقا و میزان آپوپتوز این سلول‌ها با استفاده از تکنیک MTT و Annexin V/7AAD فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده بیانگر کاهش میزان بقا در PBMC های بیماران CLL تحت شده با بربرین با $P<0/05$ نسبت به سلول‌های بیمارانی که با این دارو تحت تیمار نشده است. مقایسه میزان بقای PBMC بیماران CLL تحت شده با بربرین فلودارابین تفاوت معناداری نشان داده نشد ($P>0/05$) مقایسه میزان بقای PBMC فلودارابین تیمار شده با بربرین نسبت به سلول‌های تیمار نشده تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد($P>0/05$) افزایش میزان آپوپتوز در PBMC بیماران CLL تیمار بربرین شده است به سلول‌های تیمار نشده دارو نبوده است ($P<0/05$) حالی که این اثر در PBMC فلودارابین مشاهده نشده است ($P>0/05$).

نتیجه‌گیری: بربرین سبب کاهش بقا و افزایش آپوپتوز سلول‌های PBMC بیماران CLL شد. این اثر در PBMC فلودارابین سالم مشاهده نشد.از طرفی عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر فلودارابین میزان داروی استاندارد بربرین نشان می دهد که بربرین می تواند یک کاندیدای مناسب با عوارض کم‌تر نسبت به فلودارابین برای تحقیقات بالینی معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول خونی لنفوسیتی مزمن، بربرین، فلودارابین، آپوپتوز، Annexin 5A

مقدمه

لوسمی لنفاوی مزمن Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) معمول‌ترین بدخیمی خونی در کشورهای غربی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۴۵۱۳۳۶-۰۲۳

Email:p_kokha@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۳

www.SID.ir

Archive of SID

است که به‌صورت عمده بزرگسالان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. CLL با تجمع B-cells با ظاهر بالغ در خون محیطی شناخته شده است که دارای مارکرهای سطحی+CD19، +CD5و بیانسطحی کم IgM، IgD، CD21، CD22و CD79bدر خون محیطی، مغز استخوان و گره‌های لنفاوی شناخته می‌شود [۲،۱]. این تجمع در CLL مربوط به نقص در مسیر آپوپتوزی داخلی و سیگنال‌های بقای محیطی از قبیل کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های ترشح شده از لنفوسیت‌های Tو سایر سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین است. این سیگنال‌ها مسیرهای NF-kB و PI3K/Akt در CLL آغاز کرده و منجر به افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی نظیر اعضای خانواده Bcl-2 می‌شوند [۳].

رژیم‌های درمانی فعلی بر پایه آنالوگ‌های پورینی، عوامل آلکیله‌کننده و مونوکلونال آنتی‌بادی و یا ترکیبی از این موارد است. با این رژیم‌های درمانی پاسخ کلینیکی مشاهده می‌شود، اگرچه درمان قطعی امکان‌پذیر نیست [۴]. بنابراین جستجو برایافتنیک عامل جدیدیا ترکیب موجود بر پایه گیاهی که توانایی بالقوه برای بهبود بخشیدن به درمان CLL را داشته باشد، همواره مد نظر است [۵]. بربرینیک داروی قدیمی است که در حال حاضر نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیب شیمیایی این دارو ایزوکولونیل آلکالوئید است؛ امروزه توجهات زیادی به آلکالوئیدها به عنوان درمان برای بسیاری از بیماری‌ها از قبیل فشار خون بالا، دیابت، سندرم پلی‌کیستیک و کبد چرب شده است [۶]. شواهد و مدارک زیادی برای تأثیر پروآپوپتوتیک، ضد گسترس سرطان و ضد متاستازی بربرین در رده‌های سلولی سرطان‌های مختلف، لوسمی [۷]، لنفوما [۸]، سرطان سینه [۱۰،۹]، سرطان کلورکتال [۱۱،۱۰]، کارسینومای پروستات [۱۳،۱۲] و سرطان ریه وجود دارد [۱۴]. در این مطالعه به بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطانی جدا شده از بیماران CLL پرداخته شد و میزان اثر آن بر روی کاهش میزان بقا و افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی به منظور یافتن ترکیب درمانی جدید با اثرات جانبی کم‌تر برای بیماران (با توجه به این‌که درمان‌های فعلی اثرات جانبی زیادی دارند) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

خون محیطی (۶ میلی‌لیتر خون در لوله هپارینه) از ۱۲ فرد بیمار CLL Indolent که شامل ۶ زن و ۶ مرد با متوسط سن ۶۰ سال بودند، جمع‌آوری گردید. این بیماران قبل از انجام طرح شیمی‌درمانی دریافت نکرده بودند. بیماری آن‌ها توسط معاینات بالینی توسط انکولوژیست و شاخصه‌ای ایمونوفنوتیپی تائید شده توسط سازمان جهانی بهداشت نظیرCD19، CD5وCD23مشخص گردید. خون محیطی ۶ فرد سالم اهداکننده که ازلحاظ سنی مطابقت داده شده‌اند، نیز به عنوان گروه کنترل اخذ گردید. روش کار و نحوه انجام طرح توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان مورد تائید قرارگرفته بود.

... و مواد سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی [۱۵] در محیط کشتRPMI1640 که با سرم انسانی +AB غیرفعال شده و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر از پنی‌سیلین و استرپتوماسین غنی‌شده، کشت داده‌شده‌اند. انکوباسیون سلول‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دی‌اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انجام شد. پنی‌سیلین و استرپتوماسین از شرکت Gibco (Gibco, Grand Island, NY, USA) خریداری شد. سرم‌های AB+5فرد از سازمان انتقال خون سمنان دریافت شد و پس از غیرفعال‌سازی در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، با یک‌دیگر در شرایط کاملاً استریل مخلوط و تقسیم گردید و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در ساخت محیط کشت غنی‌شده به کار می‌رفت. پودر MTT به کار رفته شده از شرکت Carl routh خریداری گردید. کیت مربوط به تست آپوپتوز AnnexinV از شرکتBiolegned خریداری شد.

... **(MTT Assay)**سنجش میزان بقای سلول‌های کشت داده شده با استفاده از روش رنگ‌سنجیو اندازه‌گیری میزان احیا(MTT)انجام شد. تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

۱۵۰۰۰۰ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر (PBMCs) از هر دو گروه افراد بیمار و سالم در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت و با غلظت‌های۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از بربرین کشت داده شدند. از طرف دیگر سلول‌هایی از هر دو گروه بیمار و سالم که با سایتوکاین مجاور نشده بودند، به عنوان کنترل منفی و سلول‌هایی که در مجاورت غلظت ۱ میکرومولار از فلودارابین (غلظت فلودارابین موجود در خون بیماران که درمان می‌شوند) [۱۶]، به‌عنوان کنترل مثبت کشت داده شد. بعد از طی زمان انکوباسیون میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT را به خانه‌های پلیت‌های کشت داده شده اضافه گردید؛ محلول متوقف‌کننده واکنش stop solution را بعد از ۵ ساعت به خانه‌های پلیت مذکور اضافه کرده و میزان جذب را در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری گردید. تمامی تست با تکرارپذیری سه‌گانه انجام شد(Triplicate)

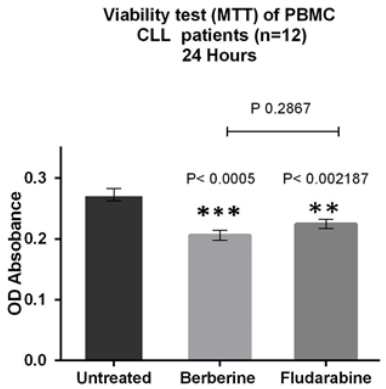
بررسی میزان آپوپتوز با روش Annexin V بررسی میزان آپوپتوز القاشده توسط بربرین با استفاده از تکنیک Annexin Vمتصل شده به رنگ FITC و ۷ AADانجام شد. میزان ۱۰۰ هزار سلول در هر ۳۰۰ میکرولیتر از محیط در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای انجام شد. بعد از زمان مجاورت و انکوباسیون با دارو، سلول‌ها بر طبق دستورالعمل کیت رنگ‌آمیزی شدند. به‌علاوه برای این‌که میزان دقیق آپوپتوز در لنفوسیت‌های Bمشخص شود آنتی‌بادی CD19نیز اضافه شد.

آنالیز های آماری تست‌های بررسی بقا MTT به صورت Triplicate انجام شده و تست‌های آپوپتوزی به صورت تک انجام شد. نتایج به دست آمده به صورت Mean±SEM نمایش داده شده و همچنین معناداری نتایج با استفاده از آنالیزغیر پارامتریک من‌ویتنی مورد بررسی قرار گرفتند. این طرح تحقیقاتی با کد اخلاق ۱۰۳ در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

نتایج

اثر کاهشی بربرین بر میزان بقای PBMCs بیماران CLL

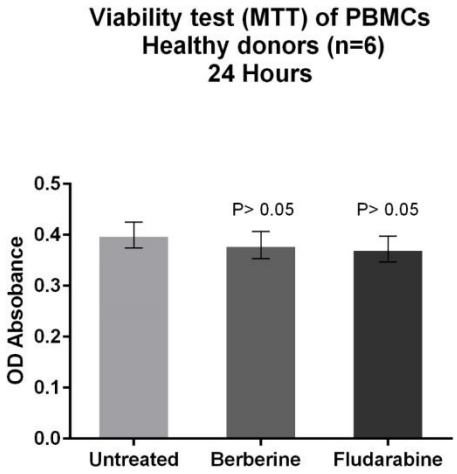
PBMCs بیماران CLL کاهش میزان بقای وابسته به زمان و دوز را بعد از مجاورت با غلظت‌های مختلف بربرین نشان دادند. میزان بقایPBMCs این بیماران و افراد سالم با دوزهای ۵ تا ۲۰۰ میکرو مولار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط تکنیک MTT موردبررسی قرار گرفت. مجاور کردن این سلول‌ها با بربرین در تمام غلظت‌ها و زمان‌ها باعث کاهش میزان بقا شده که کم‌ترین دوز که بیش‌ترین کاهش را در مقایسه با سلول‌های مجاور نشده و حتی در مقایسه با فلودارابین کنترل مثبت بود نشان می‌دهد، زمان ۲۴ ساعت با غلظت ۲۵ میکرومولار بود. این دوز و زمان مبنای آزمایش‌های بعدی بر روی دیگر بیماران بود. نتایج مجاورت بربرین با PBMCs بیماران کاهش معنی‌دار بقا در این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های مجاور نشدن را نشان داد (P<۰/۰۰۰۵). هیچ تفاوت معناداری بین اثر بربرین با فلودارابین به‌عنوان کنترل مثبت مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل۱). سلول‌های افراد سالم که با بربرین مجاور شدند در مقایسه با سلول‌هاییکه مجاور نشدند)کنترل(کاهش معناداری را در میزان بقا نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل۲).



شکل ۱. بررسی اثر بربرین بر روی بقایPBMCبیماران CLL. بررسی اثر بربرین در مقایسه با سلول‌های غیر مجاور و همچنین سلول‌های مجاور شده با فلودارابین در PBMC بیماران CLL. نتایجکاهش معنادار بقای سلول‌های مجاور شده با بربرین را نسبت به سلول‌های مجاور نشده با (P value< 0.0005) نشان داد. میزان بقا در سلول‌های مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های مجاور شده با فلودارابین تفاوت معناداری ندارد(P value> 0.05).

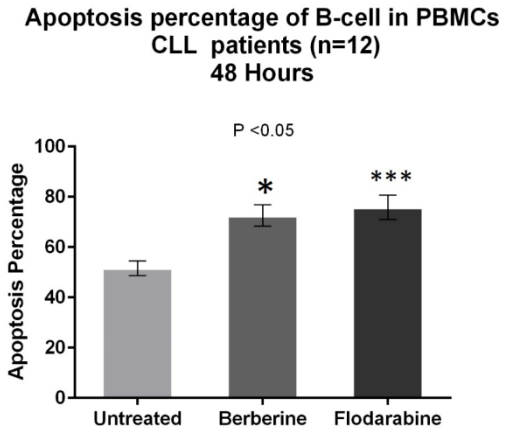
www.SID.ir

Archive of SID

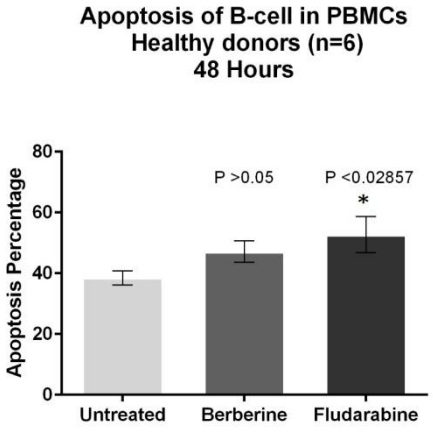


شکل۲. بررسی اثر بربرین بر بقای سلول‌های PBMC افراد سالم. بررسی اثر بربرین در PBMC افراد سالم مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌هایPBMC مجاور نشده اثر معناداری را بر میزان بقا نشان نداده(P value> 0.05).

اثر ... بر میزان آپوپتوز در سلول‌های **PBMCs** بیماران **CLL** میزان حساسیت ۱۲بیمار و ۶ فرد سالم در برابر بربرین با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری Annexin V/7AAD مورد سنجش قرار گرفت. همانند تست MTT غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت مورد سنجش قرار گرفت و غلظت ۲۵ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت بالاترین میزان القای آپوپتوز با کم‌ترینمیزان دارو را نشان داد. بربرین همانند تست MTT وابسته به زمان و غلظت باعث افزایش آپوپتوز شد. بربرین اثر معناداری را بر روی افزایش میزان آپوپتوز در PBMCs بیماران CLL نسبت به سلول‌های مجاور نشده داشته است (P<۰/۰۵) و در مقایسه با فلودارابین افزایش معناداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل۳). از طرف دیگر برخلاف فلودارابین که باعث افزایش معنادار آپوپتوز در PBMCs افراد سالم داشت (P<۰/۰۵) بربرین افزایش معناداری در آپوپتوز این سلول‌ها را موجب نگردید (P>۰/۰۵) (شکل۴).



شکل۳. بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز لنفوسیت‌هایB موجود درPBMC بیماران CLL. بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز سلول‌هایPBMC بیماران CLL و مقایسه آن با سلول‌های مجاور نشدهو سلول‌های مجاورشده با فلودارابین. بربرین باعث افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌هایPBMC نسبت به سلول‌های مجاور نشدهگردید (P value < 0.05). اختلاف میزان آپوپتوز در اثر مجاورت با بربرین نسبت به فلودارابین قابل‌توجه و معنادار نبوده (P value> 0.05).



شکل ۴ ... بربرین بر میزان آپوپتوز سلول‌های **PBMC**افراد سالم. بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های مجاورشده با بربرین و فلودارابین و مقایسه با سلول‌هایمجاور نشده.مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های کنترل افزایش معناداری را نشان نمی‌دهد(P value > 0.05). مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های مجاور شده با فلودارابین نسبت به سلول‌های مجاور نشده افزایش معناداری را نشان می‌دهد (P< 0.05).

بحث و نتیجه‌گیری

لوسمی لنفاوی مزمن از تجمع زیاد لنفوسیت‌هایB غیر کارآمد با ظاهر بالغ و دارای $CD5^+$، $CD23^+$ در خون محیطی،

www.SID.ir

Archive of SID

طحال و مغز استخوان شناخته می‌شود. نقص در آپوپتوز این سلول‌های بدخیم با پیشرفت بیماری و به احتمال با مقاومت این بیماری نسبت به شیمی‌درمانی در ارتباط است [۱۷]. تا آن‌جا که به انتخاب درمان مربوط می‌شود، داروهای زیادی در درمانCLL مؤثر هستند. قدیمی‌ترین آن‌ها کلرامبوسیل است که پاسخ نسبی ۶۰-۷۰٪ دارد اما پاسخ کامل و قطعی قابل‌توجهی ندارد. دیگر درمان مورداستفاده، فلودارابین است که یک آنالوگ پورینی است ومطالعات گسترده‌ای بر روی این دارو در درمان بیمارانCLL انجام‌شده است. همچون تمام آنالوگ‌های پورینی فلودارابین اثر خود را با مهار DNA پلی مراز و ریبونوکلوتید ردوکتاز انجام داده و درنهایت منجر به آپوپتوز می‌شود. درمان بافلودارابین عموماً به‌خوبی تحمل می‌شود و اثر سمی عمده آن به‌صورت خونی و ایمونولوژیکی است. وقوع کم‌خونی همولیتیک اتوایمیون نیز باید ازدیگر عوارض جانبی این دارو در نظر گرفته شود [۲]. با وجود تمام این تمهیدات و داروهای موجود، CLL هم‌چنان یک بیماری علاج‌ناپذیراست وروش‌های نوآورانه جدید برای بهبود نتیجه درمان مورد نیاز است.

استفاده از طب مکمل و جایگزین به‌صورت گسترده‌ای در میان بیماران مبتلابه سرطان رایج شده است. در بسیاری از نظرسنجی‌ها، داروهای گیاهی از پرمصرف‌ترین درمان‌ها است. عموم مردم اعتقاد به این دارند که استفاده از درمان‌های گیاهی بسیار ایمن‌تر و با عوارض جانبی کم‌تر و هم‌چنین باعث ایجاد وابستگی کم‌تری است. علاقه به اثرات دارویی مواد فعال زیستی در درمان سرطان و پیشگیری از آن در بیست سال گذشته به‌طور چشمگیری افزایش یافته است [۱۸]. بربرین به صورت گسترده‌ای به عنوان یک داروی ضدالتهابی و ضد اسهال استفاده می‌شود و هم‌چنین دارای فعالیت ضد سرطان‌های متعدد در سلول‌های سرطانی مختلف و از طریق اشکال مختلف اثرات سیتوتوکسیک است، بدون این‌که آسیب قابل توجهی به سلول‌های طبیعی وارد نماید، بربرین به‌صورت بالقوه به‌عنوان یک داروی ضد سرطان محسوب می‌شود. این دارو دارای عوارض جانبی بسیار کم‌تری نسبت به داروهای شیمی‌درمانی مرسوم از قبیل فلودارابین که خط اول درمان برایCLL است، می‌باشد. در این مطالعه، اثر آپوپتوزی و مهاری برای بقا بربرین در سه زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و با غلظت‌های مختلف از ۱ میکرومولار تا ۲۰۰ میکرومولار مورد بررسی قرار گرفت و با فلودارابین با غلظت یک مولار مقایسه گردید. این میزان فلودارابین، با میزان موجود در خون افراد که درمان گرفته‌اند مطابقت دارد [۱۶]. ما دریافتیم در In vitro داروی بربرین توانایی القای آپوپتوز و هم‌چنین کاهش بقا را در سلول‌های این بیماران به‌صورت وابسته به دوز و زمان در PBMC بیمارانCLL دارد. این مطالعه در نوع خود اولین مطالعه بر روی سلول‌هایPrimary (منظور همان سلول‌های خود بیماران بود ولی سل لاین‌های مختلف دیگر قبلاً انجام‌شده بود) بوده و مطالعه مشابهی در هیچ یک از سرطان‌ها وجود ندارد و فقط بر روی سل‌لاین‌ها و مدل‌های حیوانی کار شده است. در این مطالعه چندین مشاهده کلیدی وجود دارد: اول این‌که نشان داده شد که مجاور کردن PBMC بیمارانCLL با داروی بربرین با دوز ۲۵μmolبا زمان ۲۴ ساعت با P value<۰/۰۰۰۵ منجر به کاهش معنادار میزان بقا در این سلول‌ها می‌شود. از طرف دیگر با مقایسه اثر این دارو در بقای سلول‌هایPBMC افراد CLL با اثر فلودارابین مشخص گردید که میزان بقا در هر دو دارو تقریباً به یک اندازه بوده و اختلاف معناداری بین اثر بربرین با فلودارابین در بقای این سلول‌ها وجود ندارد (P value >۰/۰۵). در مقایسه با این نتیجه بررسی اثر بربرین بر میزان بقا در PBMC افراد سالم که به عنوان کنترل سایتوتوکسیتی دارو و برای مقایسه اثر دارو در افراد سالم و بیمار استفاده شد، با همین دوز و همین زمان نتیجه آزمایش بیانگر اثر کم و ناچیز این دارو بر بقایPBMC افراد سالم نسبت به سلول‌هایی است که در مجاورت دارو قرار نگرفته است و اختلاف معناداری مشاهده نشد (P value >۰/۰۵) اثری که داروی بربرین بر روی بقای سلول‌های افراد سالم دارد در مقایسه با اثر فلودارابین کم‌تر

www.SID.ir

Archive of SID

بوده و توکسیسیتی کم‌تری دارد. نتایج به‌دست‌آمده از کار ما با نتایج حاصل از کار Jeevitha B. Patil و همکارانش که بر روی سل لاین بدخیمی سینه (MCF-7) و سل لاین اپی‌تلیال انسانی (MCF-12F) با دوز ۲۵ µmol انجام شده بود، در یک راستا بوده و این دارو باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی بدخیم شده درحالی‌که اثر سمی خاصی بر روی سل لاین اپی‌تلیال غیر بدخیم ندارد [۹]. هم‌چنین نتایج مطالعه ما در مورد سلول‌های افراد نرمال با نتایج مطالعه Nan Yang که با اثردهی بربرین با دوزهای متفاوت بر روی PBMC افراد سالم انجام داده بود، مطابقت داشته و مؤید این مسئله است که بربرین بر روی سلول‌های نرمال اثر کشندگی خاصی نداشته و برای این سلول‌ها سمی نیست [۱۹]. پس از بررسی میزان بقا PBMC افراد مبتلا به CLL با استفاده از روش MTT، برای بررسی روش و نوع اثر مهاری که داروی بربرین می‌تواند بر روی این سلول‌ها داشته باشد، به بررسی تأثیر این دارو بر روی میزان آپوپتوز بربرین بر روی PBMC این بیماران پرداخته شد و نتایج حاصله بیانگر این مطلب است که PBMC افراد مبتلا به CLL که در مجاورت با بربرین با غلظت ۲۵ µl (دوز اپتیمم) قرار می‌گیرند، همان‌طوری که در نتایج مشاهده می‌گردد، آپوپتوز به میزان چشم‌گیری نسبت به سلول‌هایی که در مجاورت با دارو نبوده‌اند، ($P<0/05$) افزایش پیدا کرده است. از طرف دیگر با اثر دادن بربرین بر روی PBMC افراد سالم که به منظور مقایسه اثر بربرین در افراد سالم و بیمار انجام گردید، مشاهده شد که این دارو تأثیر محسوس و زیادی در سلول‌های PBMC این افراد ندارد و در مقایسه با سلول‌هایی که با بربرین مجاور نبوده تفاوتی در آپوپتوز ایجاد نگردید. مقایسه نتایج آپوپتوز حاصل از بربرین و فلودارابین در افراد سالم نشان‌دهنده افزایش معنادار میزان آپوپتوز در این سلول‌ها توسط فلودارابین بوده ($P\ value<0/05$) در حالی آپوپتوز توسط بربرین در این سلول‌ها معنادار نیست. نتایج به دست‌آمده در این قسمت از مطالعه، با نتایج مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های PBMC افراد دارای حساسیت غذایی توسط Nan Yang انجام شده بود هم‌راستا بود، بدین‌صورت که داروی بربرین اثری بر میزان بقای سلول‌های سالم که از طریق روش شمارش سلولی بررسی شده بودند، نداشت. هم‌چنین بربرین در سلول‌های این بیماران اثر قابل‌توجهی در افزایش میزان آپوپتوز نداشت [۱۹]. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر این دارو بر روی سرطان معده پرداخته شده است، اثر این دارو بر کاهش میزان Survivin که تبع آن به افزایش میزان آپوپتوز منجر شده [۲۰] و هم‌چنین این نتیجه با مطالعه‌های که به اثر بربرین در میزان بیان ژن Survivin در بیماران CLL دارد، هم‌راستا است [۲۱]. از طرف دیگر مطالعه اثر بربرین بر روی سل لاین‌های سرطان معده (SW480) بیانگر این مطلب است که این دارو با اثر بر روی سیکل سلولی و توقف آن در فاز G0 باعث کاهش بقا در این سلول‌ها شده که خود نشان‌دهنده این می‌باشد که این دارو از روش‌های متفاوت اثر خود را بر روی سلول‌های سرطانی می‌گذارد [۲۲]. در مطالعه دیگری که بر روی کارسینومای پروستات انسانی LNCaP و DU145، انجام گردید نتایج به دست‌آمده در این مطالعه، با نتایج پژوهش ما هم‌خوانی داشت، که در پژوهش مذکور این دارو به صورت وابسته به دوز و زمان در این سلول‌ها ($P<0/005$) باعث افزایش میزان آپوپتوز گردید. در همین مطالعه با بررسی اثر بربرین بر رویسلول‌های اپیتلیال پروستات انسانیغیر سرطانی PWR-1E مشاهده گردید که این دارو باعث افزایش محسوسی در آپوپتوز نشده که همانند نتیجه مطالعه ما بر روی سلول‌های غیر سرطانی بود [۲۳]. هم‌چنین در مطالعه اثر اپوپتوزی بربرین در سلول‌های MCF-7 سرطان سینه، قطعات DNA Internucleosomal به‌وضوح در غلظت ۲۵µ/mol مشاهده شد که درنتیجه آپوپتوز تأخیری است و هم‌راستا با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق بود [۹]. هم‌چنین در مطالعه‌ای مشابه با بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطان متوجه اثر آپوپتوزی دارو در این سلول‌ها به واسطه کاهش میزان ژن Survivin و کاهش میزان COX-2 می‌شود [۲۴].

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به نتایج حاضر داروی بربرین باعث کاهش میزان بقا و افزایش آپوپتوز سلول‌های بیماران CLL شده بدون این‌که تأثیر محسوسی بر کاهش بقا و افزایش آپوپتوز این سلول‌ها در افراد سالم گردد و در مقایسه با فلودارابین که داروی مرسوم برای درمان CLL است، عمل‌کرد بهتری داشته است زیرا فلودارابین با افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های افراد سالم نشان می‌دهد که به صورت اختصاصی عمل نکرده و باعث اثرات مخرب برای روی سلول‌های سالم داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از دانشگاه علوم پزشکی سمنان به خاطر تامین مالی جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه دوره دستیاری داخلی مصوب دانشگاه علوم پزشکی سمنان می‌باشد که نویسندگان از حمایت‌های آنان تشکر می‌نمایند. همین‌طور باید از زحمات بی شائبه سر کار خانم سلاخ که جهت تهیه و جمع آوری نمونهها به ما کمک شایانی کردند تقدیر و تشکر کنیم.

منابع

[1] Herishanu Y, Polliack A. Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. Transfus Apher Sci2005; 32: 85-97.

[2] Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol 2005; 16: 113-123.

[3] Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. Oncotarget 2014; 5: 309-325.

[4] Battle TE, Arbiser J, Frank DA. The natural product honokiol induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. Blood 2005; 106: 690-697.

[5] Angelo LS, Kurzrock R. Turmeric and green tea: a recipe for the treatment of B-chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res 2009; 15: 1123-1125.

[6] Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine. Phytother Res 2008; 22: 999-1012.

[7] Lin CC, Kao ST, Chen GW, Ho HC, Chung JG. Apoptosis of human leukemia HL-60 cells and murine leukemia WEHI-3 cells induced by berberine through the activation of caspase-3.Anticancer Res2006; 26: 227-242.

[8] Letašiová S, Jantová S, Múčková M. Berberine—antiproliferative activity in vitro and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. Cancer lett 2006; 239: 254-262.

[9] Patil JB, Kim J, Jayaprakasha G. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. Eur J Pharmacol 2010; 645: 70-78.

[10] Wang L, Liu L, Shi Y, Cao H, Chaturvedi R, Calcutt MW, et al. Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor. PloS One 2012; 7: e36418.

[11] Piyanuch R, Sukhthankar M, Wandee G, Baek SJ. Berberine, a natural isoquinoline alkaloid, induces NAG-1 and ATF3 expression in human colorectal cancer cells. Cancer lett 2007; 258: 230-240.

[12] Choi MS, Oh JH, Kim SM, Jung HY, Yoo HS, Lee YM, Moon DC, Han SB, Hong JT. Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells. Int J Oncol 2009; 34: 1221.

[13] Meeran SM, Katiyar S, Katiyar SK. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 229: 33-43.

[14] Katiyar SK, Meeran SM, Katiyar N, Akhtar S. p53 cooperates berberine- induced growth inhibition and apoptosis of non- small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo. Mol Carcinog 2009; 48: 24-37.

[15] Abdalla A, Kokhaei P, Hansson L, Mellstedt H, Österborg A. Idiotype vaccination in patients with myeloma reduced circulating myeloma cells (CMC). Ann Oncol 2008; 19: 1172-1179.

[16] Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, Wiestner A, Alizadeh AA, Arthur DC, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. Blood 2004; 104: 1428-1434.

[17] Palma M, Kokhaei P, Lundin J, Choudhury A, Mellstedt H, Osterborg A. The biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol 2006; 17: x144.

[18] Scott EN, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Development of dietary phytochemical chemopreventive agents: biomarkers and choice of dose for early clinical trials. Cancer Prev Res 2009; 2: 525-530.

[19] Yang N, Wang J, Liu C, Song Y, Zhang S, Zi J, et al. Berberine and limonin suppress IgE production by human B cells and peripheral blood mononuclear cells from food-allergic patients. Ann Allergy Asthma Immunol2014; 113: 556-564. e4.

[20] Pandey A, Vishnoi K, Mahata S, Tripathi SC, Misra SP, Misra V, et al. Berberine and curcumin target survivin and STAT3 in gastric cancer cells and synergize actions of standard chemotherapeutic 5-fluorouracil. Nutr Cancer 2015; 67: 1295-1306.

[21] Jaafarinejad H, Ghanizadeh N, Ghahremanfard F, Barati M, Manouchehri Doulabi E, Kokhaei P. Effect of Beberine on the survivin gene expression in peripheral blood mononuclear cell of chronic lymphocytic leukemia patients in vitro. Koomesh 2017; 19: 227-232.

[22] Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. Eur J Pharmacol 2012; 688: 14-21.

[23] Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. Mol Cancer Ther2006; 5: 296-308.

[24] Pazhang Y, Ahmadian S, Javadifar N, Shafiezadeh M. COX-2 and survivin reduction may play a role in berberine-induced apoptosis in human ductal breast epithelial tumor cell line. Tumor Biol 2012; 33: 207-214.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of berberine on cancer cell viability of chronic lymphocytic leukemia patients in *in vitro*

Farahnaz Ghahremanfard[3] (M.D), Arash Aghabeigi[3] (M.D), Ehsan Manouchehri[1, 2, 6] (M.Sc.), Mehrnoosh Pashaei[1, 2] (M.Sc.), Majid Mirmohammadkhani[4] (M.D), Mahdieh Shokrollahi Barough[1] (M.Sc.), Fatemeh Pak[1] (Ph.D), Mohammad Faranoush[5] (M.D), Parviz Kokhaei[*1, 6] (Ph.D)

1-Cancer Research Center and Department of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2- Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3- Internal Medicine Department, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

4- Research Center for Social Determinants of Health, Department of Community Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

5- Pediatric Growth and Development Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6- Immune and Gene Therapy Lab, Cancer Centre Karolinska, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

(Received: 8 Mar 2016; Accepted: 12 Jun 2016)

Introduction*:*Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world. CLL generally affects older people by the accumulation and proliferation of B lymphocytes with markers CD19+, CD20+, CD5+ and CD23+ specified. In this way, berberine, including natural compounds with isoquinoline alkaloids structure, that has a potential anti-cancer effect. Berberin decreased survival and increased apoptosis of cancer cell lines in *in vitro*. In this study, the effect of berberine on cell survival and apoptosis in PBMC patients and healthy donors in the presence or absence of berberine and also comparison between bernerine and fludarabine were investigated.

Materials and Methods*:*Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 12 patients and 6 healthy donors were isolated by using ficoll technique and PBMC cells seeded into the 96 well culture plate using medium RPMI1640+ AB+ serum with doses ranging from 5 to 200 μM of Berberine. The survival and apoptosis percentage of these cells was measured by MTT and Annexin V/7AAD (Flowcytometery).

Results*:*Our results suggest a reduction in PBMC survival in CLL patients treated with berberine with $P<0.05$ as compared to patients cells which not treated. Comparing PBMC survival treated with berberine to cells treated with fludarabine showed no significant change ($P>0.05$). Correspondingly, increasing PBMC apoptosis in patients treated with berberine was observed rather than the cells were not adjacent to berberine ($P<0.05$) and also compared with PBMC apoptosis treated with fludarabine which shown no significant difference ($P >0.05$). However, we don't have this increasing in healthy donors.

Conclusion*:* Berberine leads to reduced viability and elevated levels of apoptosis in PBMCs of CLL Patients. Berberin showed no significant effects on PBMCs of healthy donor viability and apoptosis. Apoptosis induction by berberin is comparable to fludarabine as a standard treatment for CLL patients. Berberine might be a good candidate for clinical trial for CLL patients.

Keywords*:* B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia, Berberine, Fludarabine, Apoptosis, Annexin 5A

* Corresponding author. Tel: +98 23033451336

p_kokha@yahoo.com

www.SID.ir