

تأثیر تیموکینون بر بقای سلول‌های سرطانی خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

مریم محمدلو^۱ (M.Sc)، مارال همتی^۱ (M.Sc)، مریم عبداللهی^۱ (M.Sc)، مهرنوش پاشایی^۲ (Ph.D)، فرحناز قهرمانفرد^۱ (M.D)، پرویز کوخایی^۳ (Ph.D)*

۱- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

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

۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- بیولینیکوم، دپارتمان پاتولوژی و آنکولوژی، بیمارستان و دانشگاه کارولینسکا، استکهلم، سوئد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

p.kokha@yahoo.com

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۳۹۰۶۸۶

چکیده

هدف: اخیراً در درمان لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) که به عنوان یک اختلال لنفوپرولیفراتیو با گسترش سلول‌های B⁺CD23+CD5 مونوکلونال بالغ در خون محیطی، بافت‌های لنفاوی ثانویه و مغز استخوان مشخص می‌شود، استراتژی‌های درمانی جدید که مسیرهای بیولوژیکی حیاتی را هدف قرار می‌دهند به روی کار آمده‌اند. تیموکینون نوعی ماده فعال زیستی اصلی موجود در روغن سیاه دانه است که دارای اثرات ضدتوموری است و این اثرات را عمدتاً با القای آپوپتوز در سلول‌های توموری اعمال می‌کند. این مطالعه به بررسی تأثیرات ضد توموری تیموکینون بر سلول‌های سرطانی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن در شرایط آزمایشگاهی پرداخته است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) ۶ بیمار مبتلا به CLL و ۶ فرد سالم با ۱/۵ µg/mL تیموکینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. میزان سیتوتوکسیسیتی و آپوپتوز سلول‌ها به روش MTT و فلوسایتومتری، مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان سیتوتوکسیسیتی در سلول‌های PBMCs بیماران مبتلا به CLL متعاقب تیمار با تیموکینون در مقایسه با سلول‌های تیمارنشده این بیماران، به طور معناداری افزایش یافت ($P=0/021$). نتایج فلوسایتومتری نشان داد که تیموکینون به صورت معناداری موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های PBMCs بیماران مبتلا به CLL در مقایسه با افراد سالم شد ($P=0/001$). علاوه بر این، تیموکینون به طور قابل ملاحظه‌ای میزان آپوپتوز سلول‌های تیمار شده را در گروه CLL در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده افزایش داد ($P=0/006$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که تیموکینون دارای پتانسیل درمانی امیدوارکننده‌ای به عنوان یک عامل ضد توموری در درمان لوسمی لنفوسیتی مزمن مطرح است و این اثر را عمدتاً از طریق القای مرگ سلولی اعمال می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوسیتی مزمن، تیموکینون، آپوپتوز، گلبول‌های سفید تک هسته‌ای

مقدمه

بیماری CLL در مردان ۲ برابر بیش‌تر از زنان می‌باشد و سن متوسط تشخیص این بیماری در حدود ۷۰-۷۲ سالگی می‌باشد [۴]. لوسمی لنفوسیتی مزمن معمولاً به آرامی رشد می‌کند و سال‌ها بدون علامت باقی می‌ماند. به طور کلی به دو فرم تهاجمی و غیرتهاجمی بروز می‌کند که در حالت غیر تهاجمی تا چندین سال نیاز به درمان ندارند ولی در حالت تهاجمی نیاز به درمان سریع دارند، به علاوه CLL غیر تهاجمی می‌تواند به فرم تهاجمی پیشرفت کند [۵]. ترکیب

لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic lymphocytic leukemia-CLL) با تکثیر و تجمع لنفوسیت‌های B-⁺CD5⁺CD19⁺ در خون محیطی، مغز استخوان و ارگان‌های لنفاوی ثانویه مشخص می‌شود [۱، ۲]. این بیماری شایع‌ترین لوسمی جوامع غربی است و در کشورهای آسیایی کم‌ترین میزان شیوع را دارد، هم‌چنین در ایران شیوع CLL بین ۱۵-۱۱ درصد از انواع مختلف لوسمی می‌باشد [۳]. خطر ابتلا به

جمع‌آوری شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران (نیما) با شناسه اخلاق IR.NIMAD.REC.1397.389 ق ل ر ۵۵ تایید شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) و کشت سلولی. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از نمونه‌های خون محیطی توسط گرادیان چگالی فایکول (Amersham Pharmacia Biotech, سوئد) جدا شدند. به طور خلاصه، نمونه‌های خون محیطی رقیق شده با بافر فسفات (PBS) بر روی فایکول اضافه شدند. سپس لوله‌های حاوی محلول فایکول و خون به مدت ۲۵ دقیقه، با دور $400 \times g$ و با دمای $20-22$ درجه سانتی‌گراد با کم‌ترین میزان شتاب و ترمز سانتریفیوژ شدند. سپس در محیط کشت سرم انسانی و ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۸ درصد رطوبت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده در ۳ گروه مختلف کشت داده شدند. گروه اول تحت عنوان vehicle که سلول‌ها توسط حلال داروی مورد نظر، DMSO کشت داده شد، گروه دیگر تحت عنوان Treat توسط داروی تیموکینون با غلظت بهینه $1/5 \mu\text{g/mL}$ تیمار شدند و گروه سوم بدون هیچ گونه تیماری تحت عنوان گروه کنترل (Untreat) کشت داده شدند.

بررسی میزان بقای سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیسیته تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای، از تست $MTT [3-(4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl})-2,5\text{-diphenyltetrazolium bromide}]$ استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا، $1/5 \times 10^5$ سلول تک هسته‌ای بیماران CLL و افراد سالم در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و میزان $1/5 \mu\text{g/mL}$ تیموکینون (GLPBI0، آمریکا) به چاهک‌ها افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، پلیت سلولی در به مدت ۵ دقیقه با دور $1000 \times g$ سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. در ادامه ۱۵۰ میکرولیتر حلال (دی متیل سولفوکسید) به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Stat Fax 4300 Microplate) قرائت شد.

بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. بررسی میزان آپوپتوز القا شده

شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی [۶] با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با استفاده از مولکول‌های کوچک جدید (مانند ایپروتینیب، ایدالیسیب و ونتوکلاکس) درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به CLL است [۷-۹]. با این وجود، بیماران دچار مقاومت دارویی می‌شوند و بعد از چند مرحله درمان با عوامل دارویی به آن‌ها مقاوم می‌شوند و در نتیجه پاسخ دارویی مورد نظر حاصل نمی‌گردد. بنابراین، تحقیقات برای یافتن عوامل دارویی جدید همچنان ادامه دارد. در سال‌های اخیر نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که مواد طبیعی گیاهان نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان دارند، که دارای عوارض جانبی کم‌تری هستند [۱۰، ۱۱]. این ترکیبات می‌توانند بیان ژن را با مکانیسم‌های مولکولی اپی‌ژنتیک تحت تاثیر قرار دهند [۱۲]. تقریباً ۳۸ درصد از داروهای ضد سرطانی که در ۴۰ سال گذشته تأیید شده‌اند، یک ماده طبیعی یا از مشتقات آن بوده‌اند [۱۳]. گیاه سیاه دانه با نام علمی *Nigella sativa L.* از خانواده Ranunculaceae است [۱۴]. اثرات فارماکولوژیک سیاه دانه شامل اثرات ضد التهابی و آنتی‌کسیدانی [۱۵] و همچنین اثرات ضد میکروبی [۱۶] و ضد انگلی [۱۷] از این گیاه گزارش شده است. همچنین مطالعات گسترده‌ای در زمینه خواص ضد سرطانی سیاه دانه و ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون بر روی سرطان‌های مختلف از جمله کولون [۱۸]، سینه [۱۹]، سارکوما [۲۰]، معده [۲۱] صورت گرفته است. ماده تیموکینون یک اثر بازدارنده انتخابی بر رشد سلول‌های سرطانی دارد و با چندین فرآیند سرطان‌زایی مانند رگ‌زایی، مهاجرت سلولی و تهاجم از طریق تعدیل مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی سلول‌های سرطانی، از جمله استیلایسیون و متیلایسیون DNA یا دمتیلایسیون یا استیلایسیون هیستون‌ها، تداخل می‌کند [۲۲-۲۴]. با این حال، فعالیت‌های ضد لوسمی تیموکینون و اثر آن بر آپوپتوز سلول‌های CLL هنوز به طور کامل بررسی نشده است. در این مطالعه، توانایی تاثیر تیموکینون را بر روی بقای سلول‌های لوسمی لئوسیتی مزمن در محیط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب و گروه‌بندی بیماران CLL و افراد سالم. شش بیمار مبتلا به لوسمی لئوسیتی مزمن تازه تشخیص داده شده و ۶ فرد سالم بر اساس معیارهای کارگروه بین‌المللی لوسمی لئوسیتی مزمن (IWCLL) [۲۵] از بیمارستان‌های کوثر و رسول اکرم (ص) انتخاب شدند. حدود ۱۰ میلی‌لیتر خون کامل محیطی از همه شرکت‌کنندگان در یک لوله استریل حاوی ضد انعقاد هپارین، پس از کسب رضایت آگاهانه کتبی

اثرسایتوتوکسیسیستی تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. اثر سایتوتوکسیسیستی تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به CLL با روش MTT در ۲۴ ساعت ارزیابی شد (شکل ۱). میزان سایتوتوکسیسیستی تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای بیماران CLL در مقایسه با سلول‌های افراد سالم در مجاورت با تیموکینون ($1/5 \mu\text{g/mL}$) به مدت ۲۴ ساعت، به صورت معناداری افزایش داشته است ($P=0/013$). هم‌چنین تیموکینون دارای سایتوتوکسیسیستی بالایی در سلول‌های CLL در گروه سلول‌های تیمار شده با تیموکینون (Treat) در مقایسه با گروه تیمار نشده (Untreat) بوده است ($P=0/021$) در حالی‌که میزان سایتوتوکسیسیستی تیموکینون در سلول‌های گروه DMSO (حلال دارو) در مقایسه با گروه تیمار شده با تیموکینون و گروه تیمار نشده تفاوت معناداری نداشت (به ترتیب $P=0/078$ و $P=0/131$)

اثر تیموکینون بر آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران CLL در مقایسه با افراد سالم پس از ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌ها با تیموکینون ($\mu\text{g/mL}$) $1/5$ با استفاده از کیت آپوپتوز مورد سنجش قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ (A و B) آمده است، میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران CLL در مقایسه با گروه افراد سالم به صورت معناداری افزایش نشان می‌دهد ($P=0/001$) هم‌چنین تیموکینون موجب افزایش معنادار میزان آپوپتوز سلول‌های CLL در گروه تیمار شده با تیموکینون در مقایسه با گروه تیمار نشده با تیموکینون (Untreat) شده است ($P=0/006$). میزان آپوپتوز سلول‌ها در گروه تیمار شده با تیموکینون در مقایسه با گروه DMSO نیز افزایش معناداری داشت ($P=0/019$)؛ در حالی‌که بین گروه Untreat و DMSO تفاوتی مشاهده نشد ($P=0/711$). قسمت‌های C و D شکل ۲ نشان‌دهنده نتایج فلوسایتومتری می‌باشد.

توسط تیموکینون با استفاده از تکنیک Annexin V متصل شده به رنگ FITC و AAD-7 انجام شد. ابتدا تعداد 10^5 سلول در هر 300 میکرولیتر محیط کشت در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها از چاهک‌ها جمع‌آوری و با بافر اتصال‌دهنده (Calcium-binding buffer) شست‌وشو داده شدند. در ادامه میزان 5 میکرولیتر از ترکیب Annexin V-FITC و AAD (Biolegend, USA)-7 به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. میزان آپوپتوز سلول‌ها پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در تاریک و دمای اتاق با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (Partec, Münster, Germany) قرائت و با استفاده از نرم‌افزار فلو جو نسخه ۷ (FLOWJO LLC, آمریکا) آنالیز شد.

آنالیز آماری. تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم نسخه ۸ (GraphPad Prism) انجام شد. برای بررسی نحوه توزیع متغیرهای عددی پیوسته از آزمون شایبرو ویلک استفاده شد. به منظور مقایسه اثرات داروی تیموکینون بین دو گروه بیماران مبتلا به CLL و افراد سالم از تست Unpaired t test و برای مقایسه بین سه گروه Untreat, treat, DMSO از تست ANOVA استفاده شد.

نتایج

ویژگی‌های بالینی بیماران CLL و افراد سالم. در این مطالعه ۶ فرد مبتلا به CLL درمان نشده با میانگین سنی $58/9 \pm 67/77$ سال و ۶ فرد سالم با میانگین سنی $52/4 \pm 17/49$ سال شرکت کردند. مشخصات دموگرافیک بیماران و افراد سالم شامل اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی در جدول ۱ خلاصه شده است.

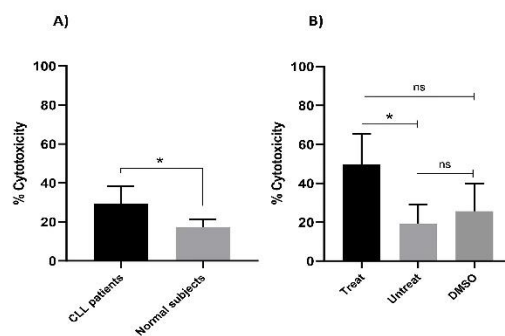
جدول ۱- اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی بیماران مبتلا به CLL و افراد سالم شرکت کننده در مطالعه

مرحله بیماری (Rai) (Stage)	تعداد گلبول سفید/میکرولیتر	سن	جنسیت	
I	120×10^3	۶۴	زن	بیماران مبتلا به CLL
0	18×10^3	۴۷	مرد	
II	54×10^3	۵۰	زن	
IV	112×10^3	۵۵	زن	
0	31×10^3	۷۳	زن	افراد سالم
I	46×10^3	۶۳	مرد	
-	5×10^3	۵۷	مرد	
-	$7,2 \times 10^3$	۵۳	مرد	
-	10×10^3	۵۶	زن	
-	$4/3 \times 10^3$	۴۹	مرد	
-	$9/1 \times 10^3$	۴۵	زن	
-	$5/6 \times 10^3$	۵۳	زن	

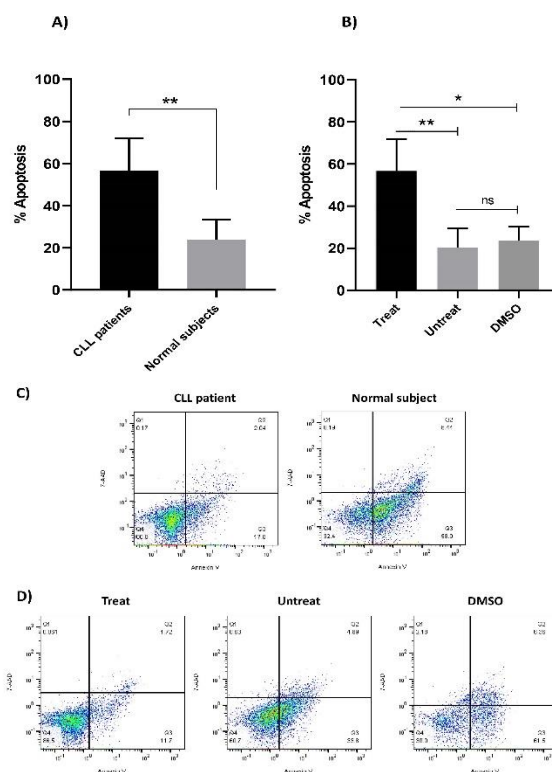
بحث و نتیجه گیری

اگرچه در سال‌های اخیر با ظهور روش‌های درمان انتخابی، درمان افراد مبتلا به بیماری لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) دچار تحول عظیمی شده است، اما بسیاری از بیماران دچار عود مجدد شده و برخی از آن‌ها قادر به تحمل عوارض جانبی حاصل از داروها نیستند [۲۶]. با توجه به این موضوع، یافتن راهی جدید برای درمان موثر این افراد هم‌چنان متصور است.

یکی از نگرانی‌های اصلی شیمی‌درمانی سرطان، عوارض جانبی ناشی از هدف قرار دادن غیر اختصاصی سلول‌های طبیعی و سرطانی توسط داروهای درمانی است. تاکید زیادی بر کشف ترکیبات جدیدی شده است که سلول‌های تومور را به طور موثرتر و انتخابی با حداقل اثرات سمی روی سلول‌های طبیعی هدف قرار می‌دهد. بنابراین، امروزه محققان مطالعات ضد سرطانی را بر روی عصاره‌های گیاهی و همچنین ترکیبات طبیعی بر اساس خواص بیوشیمیایی آپوتوز انجام داده‌اند [۲۷]. درمان‌های سنتی به‌خصوص با فرآورده‌های طبیعی مشتق شده از گیاهان از زمان‌های قدیم به‌منظور پیشگیری و درمان انواع بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در مطالعات اخیر استفاده از داروهای گیاهی و مشتقات آن‌ها در درمان سرطان‌ها مورد توجه واقع شده است. از جمله داروهای گیاهی که خاصیت ضد سرطان دارد، داروی تیموکینونین می‌باشد [۲۹،۲۸]. تیموکینون ماده فعال زیستی اصلی موجود در روغن سیاه دانه (*Nigella sativa*) است و اثربخشی آن در برابر سرطان مورد آزمایش قرار گرفته شده است. بسیاری از محققان مکانیسم اثر تیموکینون و استعداد آن برای القای آپوتوز و مهار رشد تومور را مورد مطالعه قرار داده‌اند. تا به امروز، پتانسیل شیمی‌درمانی تیموکینون در بالین مورد آزمایش قرار گرفته نشده است. با این حال، مطالعات متعدد اثرات ضد سرطانی امیدوارکننده آن را در مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند [۳۱،۳۰]. مطالعات بالینی مختلف در مدل‌های موشی مانند سرطان سینه، سرطان کبد و سرطان پانکراس، اثر ضد سرطانی تیموکینون را به واسطه کاهش تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی، به تعویق انداختن متاستاز این سلول‌ها و ممانعت از فرایند رگ‌زایی تاکید می‌کنند [۲۳]. مطالعه حاضر، در نوع خود اولین مطالعه‌ی این دارو بر روی سلول‌های Primary بیماران مبتلا به CLL بوده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که مجاور کردن PBMC سلول‌های بیماران مبتلا به CLL با داروی تیموکینون با دوز ۱/۵ میکرومولار با زمان ۲۴ ساعت منجر به کاهش معنادار میزان بقا در این سلول‌ها می‌شود. هم‌چنین نتایج به دست آمده



شکل ۱. بررسی اثر تیموکینون بر بقای PBMC بیماران CLL و افراد سالم. (A) بررسی سائیتوتوکسیسیته تیموکینون بر PBMC افراد سالم مجاور شده با تیموکینون نسبت به سلول‌های PBMC بیماران CLL مجاور شده با تیموکینون اثر معنی داری را نشان داد. (B) بررسی اثر تیموکینون در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (Untreat) و همچنین سلول‌های مجاور شده با حلال دارو (DMSO) در PBMC بیماران CLL. نتایج نشانگر سائیتوتوکسیسیته بالای تیموکینون سلول‌های مجاور شده با تیموکینون نسبت به سلول‌های گروه Untreat نشان داد. در حالیکه خاصیت سائیتوتوکسیسیته تیموکینون در سلول‌های گروه (DMSO حلال دارو) در مقایسه با گروه Treat و Untreat تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



شکل ۲. بررسی اثر تیموکینون بر میزان آپوتوز PBMC بیماران CLL و افراد سالم. (A) بررسی اثر تیموکینون بر میزان آپوتوز در PBMC افراد سالم مجاور شده با تیموکینون نسبت به سلول‌های PBMC بیماران CLL مجاور شده با تیموکینون اثر معنی داری را نشان داد. (B) بررسی اثر تیموکینون بر میزان آپوتوز سلول‌های PBMC بیماران CLL و مقایسه آن با سلول‌های مجاور نشده (Untreat) و سلول‌های مجاور شده با حلال دارو (DMSO). تیموکینون باعث افزایش آپوتوز در سلول‌های PBMC نسبت به سلول‌های مجاور نشده گردید، همچنین اختلاف میزان آپوتوز در اثر مجاورت با تیموکینون نسبت به گروه DMSO قابل توجه و معنادار بوده است. (C) شکل حاکی از تجزیه تحلیل فلوسائیتومتری از اثر تیموکینون بر میزان آپوتوز PBMC افراد سالم. (D) شکل حاکی از تجزیه تحلیل فلوسائیتومتری از اثر تیموکینون بر میزان آپوتوز PBMC بیماران CLL.

آپوتوز در سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد مورد بررسی قرار دادند، نتایج این مطالعه نشان داد که تیموکینون باعث مهار تکثیر سلولی و آپوتوز در سلول‌های لوسمی میلوئید حاد می‌شود [۳۵]. در امتداد مطالعاتی که در حیطه‌ی تاثیرات ضدسرطانی تیموکینون انجام شده است، مطالعه‌ی دیگری پتانسیل ضد توموری تیموکینون و مکانیسم‌های عمل آن را در سلول‌های A549 (رده سلولی سرطان ریه انسان) مورد ارزیابی قرار داد. نتایج حاصل از آن نشان داد که تیموکینون به طور قابل توجهی منجر به کاهش بقا و افزایش آپوتوز در سلول‌های توموری ریه انسان می‌شود و همچنین منجر به افزایش بیان پروتئین تنظیمی آپوتوز یعنی P53 می‌شود، همچنین در این مطالعه مشخص شد که درمان با تیموکینون به طور قابل توجهی نسبت Bax/Bcl-2 را در سلول‌های سرطانی ریه افزایش داده است همچنین آپوتوز وابسته به کاسپاز را با فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ فعال کرده است [۳۶]. با توجه به یافته‌های مطالعات هم‌راستا با مطالعه ما در سلول‌های سرطانی دیگر و یافته‌های مطالعه حال حاضر که نشان‌دهنده‌ی تاثیر تیموکینون بر کاهش بقا و افزایش آپوتوز سلول‌های PBMC بیماران مبتلا به CLL است، پیشنهاد می‌شود مکانیسم‌های اثر داروی تیموکینون بر آپوتوز سلول‌های PBMC در ارتباط با تنظیم کاهنده بیان BCL2 با توجه به این موضوع که سلول‌های CLL دارای بیان افزایشی پروتئین آنتی‌آپوتوزی BCL2 نسبت به سلول‌های نرمال می‌باشند، تنظیم افزایشنده بیان Bax و یا تحریک فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ در مطالعات آینده مورد مطالعه قرار بگیرد، بنابراین برای بررسی دقیق مکانیسم اثر این دارو در درمان بیماران CLL نیاز به گسترش مطالعات *In vitro* و *In vivo* در این حیطه همواره احساس می‌شود. از مهم‌ترین محدودیت‌های این طرح پژوهشی کم بودن تعداد نمونه‌های دسترس بیماران مبتلا به CLL بود، در پژوهش‌های آینده جامعه آماری بیشتر از اطلاعات دقیق‌تر از مکانیسم عمل این دارو را برای ما فراهم خواهد آورد.

با توجه به نتایج حاضر داروی تیموکینون باعث کاهش میزان بقا و افزایش آپوتوز سلول‌های CLL شده بدون این‌که تاثیر مخرب محسوسی بر روی سلول‌های PBMC افراد سالم بگذارد. این مطالعه یک تلاش موفقیت‌آمیز برای ارزیابی اثر ترکیبات گیاهی بر CLL به عنوان گزینه‌ای برای ترکیب با درمان‌های رایج است. تحقیقات پیش‌تری برای درک بهتر تاثیر تیموکینون در یک محیط بالینی مورد نیاز است. امید است این دارو به عنوان یک گزینه درمانی در بیماری CLL در نظر گرفته شود.

از مطالعه ما در مورد سلول‌های افراد نرمال بر روی PBMC افراد سالم بیانگر این مسئله است که تیموکینون بر روی سلول‌های نرمال اثر کشندگی خاصی نداشته است و برای این سلول‌ها سمی نیست. نتایج به دست آمده از کار ما با نتایج حاصل از کار Landa Zeenelabdin Ali Salim و همکارانش که با هدف بررسی اثرات ضد لوسمی در شرایط *in vitro* و *in vivo* تیموکینون بر سلول‌های WEHI-3 انجام شده بود در یک راستا بوده و این دارو سمیت بالایی در برابر رده سلولی WEHI-3 نشان داد که با افزایش آپوتوز اولیه تایید شد [۳۲]. پس از بررسی تاثیر سایتوتوکسیسیته‌ی داروی تیموکینون بر روی PBMC افراد مبتلا به CLL با استفاده از روش MTT برای بررسی نوع اثر مهاری که داروی تیموکینون می‌تواند بر روی این سلول‌ها داشته باشد، به بررسی تاثیر این دارو بر روی میزان آپوتوز تیموکینون بر روی PBMC این بیماران پرداخته شد. آپوتوز یکی از اشکال مرگ سلولی فیزیولوژیکی یا فعال یا یک مسیر کلیدی برای تنظیم هموستاز و مورفوزن سلول‌های پستانداران است و با چندین بیماری به ویژه سرطان مرتبط است [۳۳]. آپوتوز، فروپاشی هماهنگ یک سلول را توصیف می‌کند که مشخصه آن حفره حفره شدن غشاء، انقباض سلولی، متراکم شدن کروماتین و تکه‌تکه شدن DNA و به دنبال آن بلعیده شدن سریع این اجسام آپوتوتیک توسط سلول‌های فاگوسیت حرفه‌ای است. آپوتوز به طور گسترده‌ای به عنوان محافظت ذاتی بافت در برابر عوامل سرطان‌زا با مهار بقا و کنترل رشد جمعیت‌های سلولی پیش سرطانی و تومورها در مراحل مختلف سرطان‌زایی شناخته می‌شود [۲۷]. با تأمل در این دانش، مکانیسم عمل بسیاری از عوامل ضد سرطانی که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند، به طور خاص برای تنظیم مسیر آپوتوز مورد هدف قرار گرفته است و بر نقش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در حفظ هموستاز طبیعی تأکید می‌کند.

در مطالعه حاضر خاصیت ضد آپوتوزی تیموکینون را بر جمعیت سلول‌های PBMC با استفاده از Annexin V مورد سنجش قرار گرفت. نشان داده شد که Annexin V به شدت و به طور خاص با فسفاتیدیل سرین تعامل دارد و می‌تواند برای تشخیص آپوتوز با هدف قرار دادن از دست دادن تقارن غشای پلاسمایی استفاده شود [۳۴]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که درمان با تیموکینون قادر به القای مرگ سلولی از طریق آپوتوز در سلول‌های PBMC بیماران مبتلا به CLL است. نتایج به دست آمده از کار ما با نتایج حاصل از کار Musalli و همکارانش در یک راستا می‌باشد که در سال ۲۰۱۹ تاثیر داروی تیموکینون را بر مهار تکثیر سلولی و القا

[10] Taylor WF, Jabbarzadeh E. The use of natural products to target cancer stem cells. *Am J Cancer Res* 2017; 7: 1588-1605.

[9] Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J* 2018; 8: 93.

<https://doi.org/10.1038/s41408-018-0131-2>
PMid:30283014 PMCID:PMC6170426

[11] Sauter ER. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Exp Rev Clin Pharmacol* 2020; 13: 265-285.

<https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218>
PMid:32154753

[12] Ratovitski EA. Anticancer natural compounds as epigenetic modulators of gene expression. *Curr Genom* 2017; 18: 175-205.

<https://doi.org/10.2174/1389202917666160803165229>
PMid:28367075 PMCID:PMC5345332

[13] Fatfat Z, Fatfat M, Gali-Muhtasib H. Therapeutic potential of thymoquinone in combination therapy against cancer and cancer stem cells. *World J Clin Oncol* 2021; 12: 522-543.

<https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i7.522>
PMid:34367926 PMCID:PMC8317652

[14] Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Rehman MU, Qamar W, et al. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmace J* 2019; 27: 1113-1126.

<https://doi.org/10.1016/j.isps.2019.09.008>
PMid:31885471 PMCID:PMC6921197

[15] Amizadeh S, Rashtchizadeh N, Khabbazi A, Ghorbanihaghjo A, Ebrahimi AA, Vatankhah AM, et al. Effect of *Nigella sativa* oil extracts on inflammatory and oxidative stress markers in Behcet's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Avicenna J Phytomed* 2020; 10: 181.

[16] Nawarathne NW, Wijesekera K, Wijayarathne WM, Napagoda M. Development of novel topical cosmeceutical formulations from *Nigella sativa* L. with antimicrobial activity against acne-causing microorganisms. *Scientific World J* 2019; 2019.

<https://doi.org/10.1155/2019/5985207>
PMid:31485198 PMCID:PMC6710770

[17] Hamada F, Abdel-Aziz H, Badr F, Moustafa A, Rashad A. The mutagenic effect of praziquantel in *S. mansoni*-infected mice. *Arab J Lab* 1992; 18: 301-311.

[18] Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cummin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2003; 45: 195-202.

https://doi.org/10.1207/S15327914NC4502_09
PMid:12881014

[19] Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KH. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 464-475.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.030>
PMid:21679698

[20] Awad E. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. *Phytomedicine* 2005; 12: 100-107.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.003>
PMid:15693715

[21] Bargi R, Hosseini M, Asgharzadeh F, Khazaei M, Shafei MN, Beheshti F. Protection against blood-brain barrier permeability as a possible mechanism for protective effects of thymoquinone against sickness behaviors induced by lipopolysaccharide in rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2021; 16. (Persian)

<https://doi.org/10.5812/jjnpp.67765>

[22] Khan MA, Tania M, Wei C, Mei Z, Fu S, Cheng J, et al. Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget* 2015; 6: 19580.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3973>
PMid:26023736 PMCID:PMC4637306

[23] Khan MA, Tania M, Fu S, Fu J. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget* 2017; 8: 51907.

تشکر و قدردانی

تحقیق گزارش شده در این نشریه توسط کمیته گزنت پژوهشگر فرهیخته با شماره ۹۷۷۴۶۲ از موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران (نیمداد) به شناسه IR.NIMAD.REC.1397.389 تصویب و پشتیبانی شد.

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: پرویز کوخایی، مهنوش پاشایی و مریم محمدلو: ایده و طراحی مطالعه، فرحناز قهرمانفرد، مریم محمدلو و مریم عبداللهی: جمع‌آوری نمونه‌ها و داده‌ها، مارال همتی: آنالیز و تفسیر نتایج، مریم محمدلو و مارال همتی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 401-413.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.009>
PMid:26193078 PMCID:PMC4715999

[2] Kokhaei P. B-cell chronic lymphocyte leukemia (B-CLL). *Koomesh* 1386; 9: 1-12. (Persian).

[3] Koochi F, Salehiniya H, Shamlou R, Eslami S, Ghoghogh ZM, Kor Y, Rafiemanesh H. Leukemia in Iran: Epidemiology and morphology trends. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2015; 16: 7759-7763.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7759>
PMid:26625794

[4] Pulte D, Redaniel MT, Bird J, Jeffreys M. Survival for patients with chronic leukemias in the US and Britain: age-related disparities and changes in the early 21st century. *Eur J Haematol* 2015; 94: 540-545.

<https://doi.org/10.1111/ejh.12468>
PMid:25315799

[5] Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, Balatti V, Pearl DK, Acunzo M, et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 3072-3079.

<https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333484>
PMid:21636858 PMCID:PMC3175784

[6] Sadeghnejad A, Hemati M, Pashaei M, Rasouli Nejad Z, Ghahremanfar F, Kokhaei P. Effect of IL-27 on activity of bone marrow NK cells of patient with B-chronic lymphocytic leukemia in vitro. *Koomesh* 1399; 23: 131-138. (Persian)

<https://doi.org/10.29252/koomesh.23.1.131>

[7] Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N E J Med* 2014; 370: 1101-1110.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313984>
PMid:24401022

[8] Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink A, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 2010; 376: 1164-1174.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61381-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61381-5)
PMid:20888994

growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1789-96.

<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0124>

PMid:18644991 PMCID:PMC2587125

[31] Al-Johar D, Shinwari N, Arif J, Al-Sanea N, Jabbar AA, El-Sayed R, et al. Role of *Nigella sativa* and a number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats. *Phytother Res* 2008; 22: 1311-1323.

<https://doi.org/10.1002/ptr.2487>

PMid:18570215

[32] Salim LZ, Othman R, Abdulla MA, Al-Jashamy K, Ali HM, Hassandarvish Pet al. Thymoquinone inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and in vitro. *PLoS One* 2014; 9: e115340.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115340>

PMid:25531768 PMCID:PMC4274020

[33] Goldsworthy TL, Conolly RB, Fransson-Steen R. Apoptosis and cancer risk assessment. *Mutat Res* 1996; 365: 71-90.

[https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90013-5](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90013-5)

PMid:8898990

[34] Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000; 256: 12-18.

<https://doi.org/10.1006/excr.2000.4834>

PMid:10739646

[35] Musalli MG, Hassan MA, Sheikh RA, Kalantan AA, Halwani MA, Zeyadi M, et al. Thymoquinone induces cell proliferation inhibition and apoptosis in acute myeloid leukemia cells: Role of apoptosis-related WT1 and BCL2 genes. *Eur J Cell Sci* 2019; 1: 2-9.

<https://doi.org/10.34154/2019-EJCS-0101-02-09/auraass>

[36] Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol* 2019; 234: 10421-10431.

<https://doi.org/10.1002/jcp.27710>

PMid:30387147

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17206>

PMid:28881699 PMCID:PMC5584300

[24] Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, et al. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol Rep* 2013; 29: 571-578.

<https://doi.org/10.3892/or.2012.2165>

PMid:23232982

[25] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-5456.

<https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906>

PMid:18216293 PMCID:PMC2972576

[26] Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood* 2015; 125: 2062-2067.

<https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603670>

PMid:25573991 PMCID:PMC4467871

[27] Edris AE. Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. *Curr Clin Pharmacol* 2009; 4: 43-46.

<https://doi.org/10.2174/157488409787236137>

PMid:19149500

[28] Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 2009; 109: 3012-3043.

<https://doi.org/10.1021/cr900019j>

PMid:19422222

[29] Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood* 2015; 125: 2062-2067.

<https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603670>

PMid:25573991 PMCID:PMC4467871

[30] Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, et al. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor

The effect of Thymoquinone on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) viability of patients with B-Chronic Lymphocytic Leukemia

Maryam Mohammadlou (M.Sc)^{1,2}, Maral Hemati (M.Sc)^{1,2}, Maryam Abdollahi (M.Sc)^{1,2}, Mehrnoosh Pashaei (Ph.D)⁴, Farahnaz Ghahremanfard (M.D)¹, Parviz Kokhaei (Ph.D)^{*3,5}

1- Cancer Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

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

3- Dept. of Immunology, School of Medicine, Arak, University of Medical Science, Arak, Iran

4- Dept. of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- BioClinicum, Department of Oncology-Pathology Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden

* Corresponding author. +98 9127390686 p_kokha@yahoo.com

Received: 30 Aug 2022; Accepted: 14 Mar 2023

Introduction: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) as a lymphoproliferative disorder that is characterized by the expansion of monoclonal, mature CD5+CD23+ B cells in the peripheral blood, secondary lymphoid tissues, and bone marrow is facing with advent of new therapies targeting crucial biological pathways. Thymoquinone (TQ) is the major bioactive constituent in black seed oil (*Nigella sativa*) and has been found to exert anti-tumor impacts mainly through the induction of apoptosis. This study aimed to evaluate the in vitro anti-leukemia effects of TQ on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of CLL patients.

Materials and Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 6 patients and 6 healthy donors were treated with 15 µg/ml of TQ for 24 h. The cytotoxic effect of TQ was assessed using the MTT assay. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis of PBMCs.

Results: Treatment with TQ increased the cytotoxicity of PBMCs of CLL patients more significantly than in Untreated cells ($P=0.021$). Flow cytometry results indicated that TQ exhibited a significant apoptotic impact on PBMCs of CLL patients compared to the healthy subjects ($P=0.001$). TQ also induced marked apoptosis in CLL cells compared to the Untreated cells ($P=0.006$).

Conclusion: Our findings reveal that TQ possesses promising therapeutic potential as an anti-tumor agent for treating CLL mainly through the induction of cell apoptosis and cytotoxicity.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia, Thymoquinone, Apoptosis, Mononuclear Leukocytes