Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۴، شماره۵ (شماره پیاپی ۵۸)، آذر و دی ۱۳۹۰، ۱۰۰-۹۲

اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی کاربنوکسولون در رده ی سلولی NB4 لوسمی انسانی

دکتر سید محمد امین موسوی[۱]*، سروش مؤسس غفاری[۲]، دکتر مسعود اسدی[۳]، دکتر ایرج اسودی کرمانی[۴]

۱- استادیار، دکترای تخصصی بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- استاد، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: تاکنون داروهای متفاوتی برای درمان لوسمی پرومیلوسیتیک حاد ارائه شده است، اما هیچ یک باعث درمان کامل بیماری نشده است، لذا تلاش‌های بسیاری برای یافتن داروهای جدید با پتانسیل بالا که قادر به القاء آپوپتوز باشند، در جریان است. اخیراً اثرات ضد سرطانی ترکیبی به نام کاربنوکسولون، در چند رده سلولی گزارش شده است. در مطالعه حاضر اثرات ضد سرطانی کاربنوکسولون در رده سلولی NB4 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، رده سلولی NB4 پس از کشت تحت تأثیر کاربنوکسولون در غلظت‌ها و فواصل زمانی مختلف قرار گرفت. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو به منظور بررسی رشد و زیستائی در سلول‌های NB4 استفاده شد. برای بررسی نوع مرگ سلولی از میکروسکوپ فلورسنت و تکنیک الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز استفاده گردید.

یافته ها: کاربنوکسولون سبب مهار رشد سلول‌های NB4 می‌شود، به طوری که میزان مهار رشد نسبت به کنترل در ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و۲۵۰ میکرومولار به ترتیب ۳۲/۶۵، ۴۷/۵۲، ۶۰/۷۳، ۶۸/۹۱ و ۷۴/۳۳ درصد بود. هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون قطعه قطعه شدن DNA و میکروسکوپ فلوروسنس نشان دهنده وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز پس از تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های بالا بود.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی کاربنوکسولون بر سلول‌های NB4 لوسمی پرومیلوسیتیک انسانی، این دارو می‌تواند به عنوان کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان لوسمی پرومیلوسیتیک مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک، حاد آپوپتوز، کاربنوکسولون، NB4

***نویسنده مسئول:** آذربایجان شرقی، تبریز، دانشگاه تبریز، گروه زیست شناسی جانوری

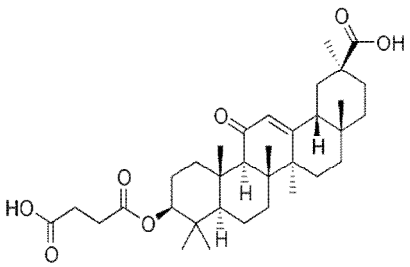
Email: moosav_m@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute Promyelocytic leukemia -APL) مرتبط با زیر نوع M3 لوسمی میلوئید حاد –Acute)myeloid leukemia AML) بوده که در بیش از ۹۵ درصداز بیماران به دلیل یک جابه جائی دو طرفه بین ژن پرومیلوسیتیک لوسمی بر روی کروموزوم ۱۵ و ژن رتینوئیک اسید رسپتور آلفا بر روی کروموزوم ۱۷ در سلول‌های خونی پرومیلوسیتی ایجاد می‌شود. پروتئین هیبرید تشکیل شده باعث مهار تمایز و نیز اختلال در آپوپتوز(مرگ برنامه ریزی شده سلولی) می-گردد(۱). آپوپتوز، یک فرآیند تنظیم شده مرگ سلولی است که باعث حذف آسیب‌ها یا سلول‌های ناخواسته بدون آسیب در ارگانیسم‌های چند سلولی به منظور کنترل رشد وثابت نگاه داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌گردد و از طریق تغییرات ریخت شناسی از جمله چروک خوردگی، سلولی، متراکم شدن کروماتین و تشکیل اجسام آپوپتوتیک مشخص می‌گردد(۲). به طورکلی، داروهایی که در شیمی درمانی به کار می‌روند منجر به القاء آپوپتوز و مهار رشد می‌شوند(۳). اما اثرات جانبی این داروها و مقاومتی که سلول‌های سرطانی نسبت به آنها نشان می‌دهند، از مشکلات و موانع مهم در شیمی درمانی به شمار می‌آیند. طی دو دهه گذشته، آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) و آرسنیک تری اکسید به‌طور موفقیت آمیزی برای درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مطرح شده‌اند. اما به دلیل اثرات جانبی و مقاومت داروئی استفاده از این داروها با محدودیت‌هایی همراه بوده، از اینرو تلاش‌های اخیر در زمینه استفاده از داروهای با پتانسیل بالا که آثار سوء داروهای شیمی درمانی را نداشته و به‌توانند در درمان سلول-های سرطانی مؤثر واقع شوند، متمرکز شده است(۴). در این میان داروی کاربنوکسولون(Carbenoxolone-CBX به عنوان یک عامل القاء کننده آپوپتوز می‌تواند حائز اهمیت باشد(شکل۱). کاربنوکسولون. یک داروی نیمه سنتتیک مشتق شده از ترکیب طبیعی گلیسیرتینیک اسید و با فرمول مولکولی $C_{34}\ H_{50}\ O_7$ می‌باشد که برای اولین بار در سال ۱۹۵۹ سنتز و در سال ۱۹۶۰ به دلیل شباهت ساختاری که با استروئیدها داشت، به عنوان یک عامل ضد التهاب معرفی گردید. سپس این ترکیب به عنوان اولین ترکیب درمانی فعال در درمان زخم معده و دهان شناخته شد(۸-۵). اخیراً خواص ضد سرطانی قابل توجهی از کاربنوکسولون در برخی سرطان‌ها شامل سرطان سینه، ریه و چند سرطان دیگر گزارش شده، ولی تاکنون مطالعه‌ای در مورد لوسمی پرومیلوسیتیک حاد صورت نگرفته است(۹، ۱۰). کاربنوکسولون قادر به القاء استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد نفوذپذیری گذرای میتوکندری(Mitochondrial MPT) -permeability transition و در نتیجه آزادسازی سیتوکروم c بوده و از این‌رو می‌تواند به عنوان یک عامل تحریک کننده آپوپتوز به شمار آید(۱۱). با توجه به اینکه علی رغم پیشرفت‌های درمانی، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد هنوز یک چالش بزرگ محسوب شده و جستجوی راه‌کارها و داروهای مختلف در این راستا از اولویت‌های تحقیقاتی می‌باشد، لذا مطالعه حاضر برای اولین بار به منظور بررسی اثرات مهار رشدی و القاء آپوپتوزی کاربنوکسولون در رده سلولی NB4 به عنوان مدل آزمایشگاهی مناسبی برای لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مورد ارزیابی قرار گرفته است.



شکل ۱. ساختار مولکولی کاربنوکسولون.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی NB4 از بانک سلولی ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI دارای۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک-های استرپتومایسین(۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی سیلین(۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) (سیناژن- ایران) در انکوباتور

www.SID.ir

Archive of SID

با شرایط CO_2 5 درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت مورد تعویض قرارگرفت. برای انجام آزمایشات، پاساژ ۴ یا ۵ سلول‌ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی به کار گرفته شد.

سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار کاربنوکسولون (شرکت سیگما-آمریکا) در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفته، سپس تغییرات ریخت شناسی آنها با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. بدین منظور، غلظت‌های ۵۰ تا ۲۵۰ میکرومولار از کاربنوکسولون در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی حاوی ۲×۱۰^{۴} سلول افزوده و سپس تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو(شرکت سیگما-آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت(۱۲).

جهت بررسی اثرات کاربنوکسولون بر میزان سمیت و مرگ سلولی، آزمون نمک تترازولیوم به کار گرفته شد که بر پایه شکسته شدن نمک تترازولیوم زرد به فورمازان کریستالی ارغوانی رنگ توسط سلول‌های فعال از نظر متابولیکی می‌باشد(۱۳) به این منظور سوسپانسیون سلولی حاوی $۱۰^{۴}$ سلول در محیط کشت درون چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی ریخته شد. پس از تیمار با غلظت‌های ۵۰ تا۲۵۰ میکرومولار از کاربنوکسولون به مدت ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت، ۱۰ میکرولیتر نمک تترازولیو (شرکت رش- آلمان) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد. پس از ۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از کیت و بافر حل کننده برای لیز سلول های موجود و حل کردن کریستال‌های فورمازان استفاده شد. پس از گذشت یک شب جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر چند چاهکی در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت گردید.

برای انجام آزمایش ۲۵ تغییرات ریخت شناسی آپوپتوزیس میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی($۱۰^{۵}\times۵$) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید(شرکت سیگما-آمریکا) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید.

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین منظور تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کاربنوکسولون در فواصل زمانی متفاوت (۴۸-۱۲ساعت) تیمار شد. پس از سانتریفوژ، سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر بافر لیزکننده شامل اتیلن دی آمین ترا استیک اسید(EDTA)۱۰۰ میلی مولار، سدیم دو دسیل سولفات ۰/۸SDS درصد وزنی-حجمی و بافر تریس-اسید کلریدریک۲۰ میلی مولار با ۸ =pH(شرکت مرک - آلمان) لیز و سپس ۱۰ میکرو لیتر RNase A/T1 و پروتئیناز K(شرکت فرمنتاس- آلمان) هر کدام به‌طور جداگانه افزوده شد و در ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای حداقل ۹۰ دقیقه قرار گرفت. پس از افزودن ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ×۶(۳۰ درصد گلیسرول و۲۵ درصد بروموفنول بلو)، هر یک از نمونه‌های موجود در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصدی بارگذاری شد. با انجام الکتروفورز قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و میکروسافت اکسل ۲۰۰۳ و آزمون آماری تی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده‌های با ارزش p کمتر از ۵ درصد از نظر آماری معنی-دار تلقی شدند.

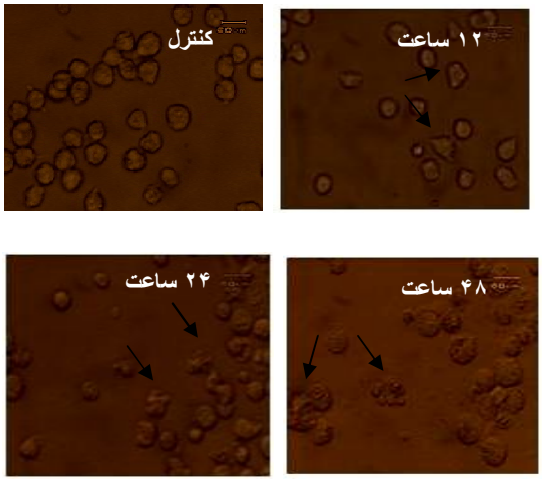
یافته‌ها

مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان‌دهنده وقوع تغییرات ظاهری در سلول‌های تیمار شده با کاربنوکسولون می‌باشد(شکل۲). همان طور که مشاهده می‌شود با افزایش

www.SID.ir

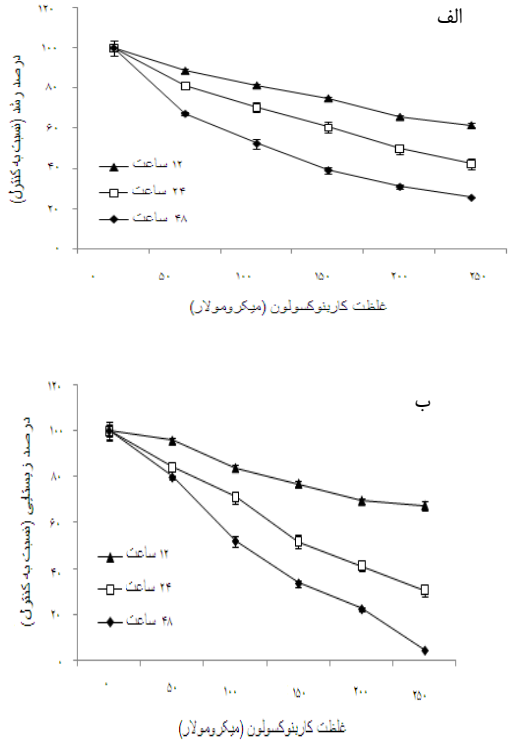
Archive of SID

زمان تغییرات ظاهری چشمگیری در مقایسه با سلول‌های کنترل دیده شد. بررسی بیشتر نشان داد که غشاء سلول‌های NB4 تیمار شده با کاربنوکسولون چروکیده شده و اجسام کوچکی شبیه اجسام آپوپتوتیک شکل گرفتند(شکل۲).



شکل۲. تغییرات ظاهری سلول‌های NB4 تیمار شده با کاربنوکسولون. پس از تیمار سلول‌ها با ۱۰۰ میکرومولار کاربنوکسولون به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت خصوصیات ظاهری آن ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشت نمائی ۴۰x مورد بررسی قرار گرفت. چروکیدگی غشاء و تشکیل اجسام آپوپتوتیک با پیکان نمایش داده شده اند.

همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده، کاربنوکسولون سبب مهار رشد سلول‌های NB4 در غلظت‌های متفاوت ۵۰ تا ۲۵۰ میکرومولار پس از زمان‌های ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت می‌شود. در غلظت ۲۵۰ میکرومولار میزان مهار رشد نسبت به کنترل در زمان‌های ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت به ترتیب ۳۸/۴۴ درصد، ۵۷/۶۵ درصدو ۷۴/۳۳ درصد بود. هم‌چنین در ۴۸ ساعت میزان مهار رشد نسبت به کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار به ترتیب ۳۲/۶۵ درصد، ۴۷/۵۲ درصد، ۶۰/۷۳ درصد، ۶۸/۹۱ درصد، ۷۴/۳۳ درصد بود. اثرات مهار رشدی کاربنوکسولون به صورت معنی‌داری، وابسته به زمان و غلظت تغییر می‌یابد($p<٪۵$) (نمودار۱-الف). در جدول ۱ نیز میزان ارزش p هر داده ذکر گردیده است. میزان زیستایی این سلول‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت(نمودار۱ – ب).در غلظت ۲۵۰ میکرومولار میزان زیستایی نسبت به کنترل در زمان‌های ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت به ترتیب ۳۲/۵ درصد، ۶۹/۶۱ درصد و ۸۹/۶۸ درصدکاهش می‌یابد. هم‌چنین در ۴۸ ساعت میزان زیستایی نسبت به کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰،۱۵۰، ۲۰ و۲۵۰ میکرومولار به ترتیب ۲۰/۲۳ درصد، ۴۸/۰۳ درصد، ۶۶/۴۴ درصد، ۷۷/۷۲ درصد و۸۹/۶۸ درصد کاهش می‌یابد. این نتایج نشان دهنده این است که کاربنوکسولون علاوه بر مهار رشد سلولی در سلول‌های NB4، باعث کاهش زیستایی سلولی نیز می‌گردد و این اثرات وابسته به زمان و غلظت تغییر می‌یابد. بر اساس داده‌های ارائه شده در نمودار ۱، IC_{50}(غلظتی از دارو که باعث مهار ۵۰ درصدی سلول‌ها می‌شود)، ۱۰۰ میکرومولار تعیین شد.



نمودار۱. اثرات کاربنوکسولون رشد و زیستایی سلول‌های NB4، پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از کاربنوکسولون

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مقایسه درصد رشد سلول‌های NB4 در حضور غلظت‌های مختلف کاربنوکسولون.

غلظت (میکرومولار)	درصد رشد نسبت به کنترل		
	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
۰ (کنترل)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۵۰	۹۵/۷۱ (P<۰/۰۵)	۹۰/۲۷ (P<۰/۰۰۱)	۸۳/۳۴ (P<۰/۰۰۱)
۱۰۰	۸۹/۴۱ (P<۰/۰۰۱)	۶۹/۵۱ (P<۰/۰۰۱)	۵۲/۴۸ (P<۰/۰۰۱)
۱۵۰	۸۷/۹۳ (P<۰/۰۰۱)	۶۱/۵۲ (P<۰/۰۰۱)	۴۵/۲۶ (P<۰/۰۰۱)
۲۰۰	۸۵/۷۳ (p<۰/۰۰۱)	۵۳/۷۹ (P<۰/۰۰۱)	۳۵/۰۸ (P<۰/۰۰۱)
۲۵۰	۸۲/۵۶ (P<۰/۰۰۱)	۴۹/۳۵ (P<۰/۰۰۱)	۳۱/۶۷ (P<۰/۰۰۰۱)

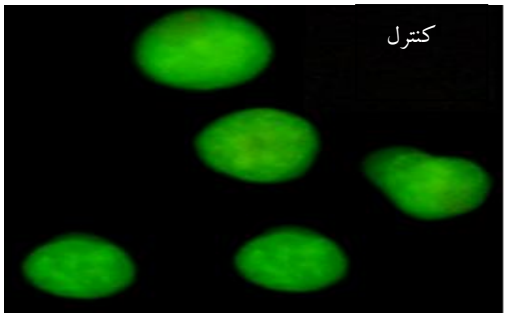
نتایج حاصل از بررسی اثر کاربنوکسولون بر مرگ سلولی در سلول‌های NB4 در غلظت‌های ۵۰ تا ۲۵۰ میکرومولار با استفاده از آزمون نمک تترازولیوم در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌گردد، در غلظت ۲۵۰ μM میزان جذب(OD) نسبت به کنترل در زمان‌های ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۶۶، ۰/۳۶ و ۰/۱۹ بود و هم‌چنین در ۴۸ ساعت میزان جذب نسبت به کنترل در غلظت‌های۵۰، ۱۰۰ ، ۱۵۰، ۲۰۰ و۲۵۰ میکرومولار به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۴۷، ۰/۴۱، ۰/۳۳ و ۰/۱۹ بود، مفهوم این است که با گذشت زمان و افزایش غلظت میزان سمیت کاربنوکسولون به طور معنی‌داری(p<٪۵) افزایش یافته، به‌طوری که بیشترین میزان سمیت کاربنوکسولون در سلول‌های NB4 در غلظت ۲۵۰ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد(جدول۲).

جدول۲. مقایسه میزان جذب نسبت به کنترل

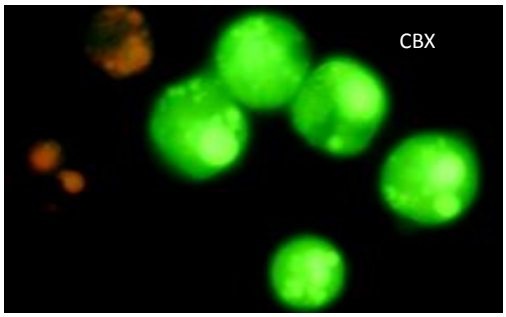
غلظت (میکرومولار)	میزان جذب نسبت به کنترل		
	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
۰(کنترل)	۱	۱	۱
۵۰	۰/۸۹)۰/۰۵(p<	۰/۷۸ (P<۰/۰۵)	۰/۷۴ P<۰/۰۰۱)
۱۰۰	۰/۷۴ (p<۰/۰۰۱)	۰/۶۰ (P<۰/۰۰۱)	۰/۴۷ (P<۰/۰۰۱)
۱۵۰	۰/۷۵ (p<۰/۰۰۱)	۰/۵۵ (P<۰۰۱۰)	۰/۴۲ (P<۰/۰۰۱)
۲۰۰	۰/۷۴ (p<۰/۰۰۱)	۰/۵۳ (P<۰/۰۰۱)	۰/۳۴ (P<۰/۰۰۱)
۲۵۰	۰/۶۷ (p<۰/۰۰۱)	۰/۳۷ (P<۰/۰۰۱)	۰/۱۹ (P<۰/۰۰۱)

به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط کاربنوکسولون از میکروسکوپ فلورسنت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، سلول‌های NB4 تیمار شده با کاربنوکسولون(۱۰۰ میکرومولار) پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، دارای کروماتین بسیار فشرده یا قطعه قطعه به رنگ سبز یا نارنجی درخشان می‌باشند. که حاکی از القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول‌ها توسط کاربنوکسولون می‌باشد. به منظور بررسی بیشتر آپوپتوز، از تکنیک الکتروفورز با کمک ژل آگارز استفاده شد. قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های تیمار شده با کاربنوکسولون و عدم مشاهده آن در سلول‌های کنترل، یکی دیگر از شاخص‌های وقوع مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های NB4 می‌باشد(شکل۴).

الف)



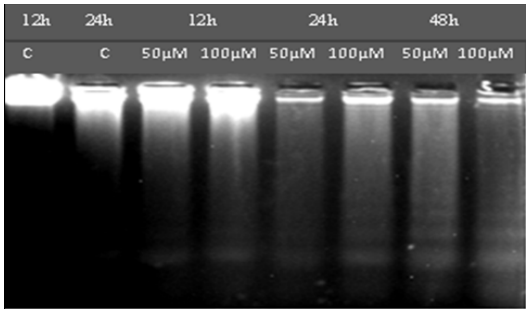
ب)



شکل۳. اثر کاربنوکسولون بر تغییرات ریخت شناسی آپوپتوز سلول‌های NB4. پس از تیمار سلول‌ها با ۱۰۰ میکرومولار کاربنوکسولون به مدت ۴۸ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴. بررسی اثرات آپوپتوزی کاربنوکسولون بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های NB4

بحث

اگرچه تا کنون روش‌ها و داروهای متعددی برای درمان مبتلایان به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد به کار گرفته شده اما هنوز هم تلاش‌های گسترده‌ای در جهت یافتن ترکیبات مؤثری که پتانسیل تومورکشی بیشتری داشته و قادر به القاء آپوپتوز باشند، در جریان است(۱۴). در مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داده شد که کاربنوکسولون به صورت وابسته به غلظت و زمان سبب مهار رشد و زیستائی سلول‌های NB4 به عنوان مدل مناسبی برای لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می‌شود. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که کاربنوکسولون قادر به مهار رشد و زیستایی به صورت وابسته به زمان و غلظت در رده سلولی NB4 می‌باشد. داده‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که کاربنوکسولون در محدوده غلظتی ۵۰ تا ۲۵۰ میکرومولار و در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث مهار رشد و کاهش زیستایی در سلول‌های NB4 می‌شود. بر اساس این داده‌ها، IC_{50} حدود ۱۰۰ میکرومولار تعیین و برای مطالعه آپوپتوز از این غلظت استفاده گردید.

در محدوده نزدیک به غلظت‌های مطالعه ما اثرات مهار رشدی کاربنوکسولون در سرطان های دیگر نیز به اثبات رسیده است (۱۷-۱۵). به عنوان مثال در مطالعات صورت گرفته بر روی سلول‌های هلا(Hela) انسانی نشان داده شده که این دارو در غلظت‌های بالاتر(۴۰۰ میکرومولار) و در مدت زمان بیشتری(۱۶ ساعت) منجر به مهار رشد و کاهش زیستایی در این سلول‌ها می‌شود(۱۵). در محدوده غلظتی میکرومولار و زمان‌های تیمار مشابه با این مطالعه، اثرات مهار رشدی داروهای ضد سرطانی دیگر نیز در سلول‌های NB4 نشان داده شده است. به عنوان مثال بررسی‌های صورت گرفته نشان داده‌اند که لواستاتین در غلظت حدود ۱۲/۵ میکرومولار و ترکیب دیگری به نام اوریدونین در غلظت ۱۶ میکرومولار و پس از ۴۸ ساعت، سبب مهار رشد در سلول‌هایNB می‌شوند(۱۶، ۱۷).

داده‌های به دست آمده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA و میکروسکوپ فلورسنت در مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های NB4 تیمار شده با کاربنوکسولون علاوه بر مهار رشد، دچار آپوپتوز نیز شدند. القاء آپوپتوز توسط کاربنوکسولون تاکنون در چندین مدل in-vitro,in-vivo گزارش شده است. مطالعات نشان داده‌اندکه غلظت ۱۰میکرومولار از کاربنوکسولون قادر به القاء آپوپتوز در میتوکندری کبد رت و هم‌چنین در ناحیه بازال جفت رت می‌گردد(۱۸، ۱۹). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار از کاربنوکسولون پس از ۱۲ ساعت، منجر به قطعه قطعه شدن DNA و تغییرات ریخت شناسی مشابه آپوپتوز در سلول های NB4 می‌گردد. این بدان مفهوم است که نوع مرگ سلولی القاء شده توسط کاربنوکسولون در سلول‌هایNB4 در محدوده غلظتی مورد مطالعه از نوع آپوپتوز می‌باشد. از آنجا که آپوپتوز یک مکانیسم دفاعی سلول در برابر سرطانی شدن بوده و با توجه به این که اختلال در این فرآیند به عنوان یک عامل مهم در ایجاد و گسترش سرطان به شمار می‌آید، لذا اثر کاربنوکسولون در القاء آپوپتوز می‌تواند حائز اهمیت باشد.

چندین مکانیسم در ارتباط با نحوه اثر القا آپوپتوزی کاربنوکسولون مطرح است. مطالعات وسیعی بر روی کاربنوکسولون صورت گرفته که بیانگر ایجاد نفوذپذیری گذرای میتوکندری در نتیجه القاء استرس اکسیداتیو توسط این دارو می‌باشد، که می‌تواند منجر به راه‌اندازی مسیر داخل سلولی آپوپتوز گرد(۱۱). کاربنوکسولون با دارا بودن ساختاری شبه گلوکوکورتیکوئیدی قادر به واکنش متقاطع با رسپتورهای

www.SID.ir

Archive of SID

گلوکوکورتیکوئیدی و مینرالوکورتیکوئیدی و در نتیجه القاء آپوپتوز بواسطه اتصال به رسپتور هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی می‌باشد(۲۰). به علاوه مطالعات آزمایشگاهی متفاوت اثرات مهاری داروی کاربنوکسولون را در ارتباط بین سلولی از نوع اتصال منفذ دار تأیید کرده است(۲۱، ۲۲). مکانیسم اصلی اثر کاربنوکسولون در سلول‌های NB4 مشخص نبوده و نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که کاربنوکسولون قادر به مهار رشد و القاء آپوپتوز در رده سلولی NB4 می‌باشد. با توجه به اثرات ضد سرطانی کاربنوکسولون و آنالوگ‌های دارویی آن، این دارو می‌تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان خون مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مصوب کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی تحت عنوان بررسی اثرات ضد سرطانی کاربنوکسولون بر رده‌های سلولی سرطان خون می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز که حمایت مالی قسمتی از این تحقیق را به عهده داشته اند، ابراز می‌دارند.

منابع

1. Ma ukanovi -Golubovi L, Jelenkovi AV, Milenovi MM, Marjanovi G, Dimitrijevi E. Thrombosis in acute promyelocytic leukemia patients treated by All- trans retinoic acid (ATRA) - a prospective research thrombosis induced by ATRA treatment. Facta universitatis-series: Medicine and Biology. 2008; 15(2):41-5.

2. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. Journal of biochemistry and molecular biology. 2005; 38(4): 391-8.

3. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, et al. Discovery of 4-Aryl-4 H-chromenes as a New Series of Apoptosis Inducers Using a Cell-and Caspase-Based High-Throughput Screening Assay. 3. Structure-Activity Relationships of Fused Rings at the 7, 8-Positions. Journal of medicinal chemistry. 2007;50(12):2858-64.

4. BRUGNOLI F, GRASSILLI S, BENEDUSI M, CAPITANI S, BERTAGNOLO V. RNA interference in the study of molecular mechanisms activated during agonist induced differentiation of acute promyelocytic leukemia derived promyelocytes. MINERVA BIOTECNOLOGICA. 2008; 20:39-49.

5. Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. The AAPS Journal. 2006;8(2):239-53.

6. Khorasani MZ, Hosseinzadeh SA, Vakili A. Effect of cental microinjection of Carbenoxolone in an experimental model of focal cerebral ischemia. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. 2009;22(4):349-54.

7. Isbrucker R, Burdock G. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (Glycyrrhiza sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2006; 46(3):167-92.

8. Hausmann W, Tarnoky A. Biochemical effects of short-term treatment with carbenoxolone disodium. British journal of pharmacology and chemotherapy. 1966; 26(2): 412-20.

9. Hundertmark S, Buhler H, Rudolf M, Weitzel H, Ragosch V. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells. Journal of endocrinology. 1997; 155(1):171-80.

10. Trovato-Salinaro A, Trovato-Salinaro E, Failla M, Mastruzzo C, Tomaselli V, Gili E, et al. Altered intercellular communication in lung fibroblast cultures from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respiratory Research. 2006; 7(1): 1-9.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Salvi M, Fiore C, Battaglia V, Palermo M, Armanini D, Toninello A. Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening. Endocrinology. 2005;146(5):2306-12.
12. Ahmadi AH, Moosavi SMA, Hosseinpour FMA. The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line. Arak Medical University Journal(AMUJ). 2010; 13:1-11.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983;65(1-2):55-63.
14. Schimmer AD. Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2008;21(1):5-11.
15. Kawashima D, Asai M, Katagiri K, Takeuchi R, Ohtsuka K. Reinvestigation of the effect of carbenoxolone on the induction of heat shock proteins. Cell Stress and Chaperones. 2009; 14(5):535-43.
16. Guo F, Cen J, Chen Z. In vitro effect of lovastatin on NB4 promyelocytic leukemia cells]. Zhonghua xue ye xue za zhi= Zhonghua xueyexue zazhi. 2001;22(11):584-8.
17. Huang R, Lin D, Wu X, Peng J, Lin Q, Pan X, et al. Apoptotic effect of oridonin on NB4 cells and its mechanism. Leukemia & lymphoma. 2005;46(4):593-7.
18. Pivato LS, Constantin RP, Ishii Iwamoto EL, Kelmer Bracht AM, Yamamoto NS, Constantin J, et al. Metabolic effects of carbenoxolone in rat liver. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2006; 20(5): 230-40.
19. Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan A, Burton PJ. Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. Biology of reproduction. 2000;63(6):1913-7.
20. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Clinical cancer research. 2002;8(6):1681-94.
21. Winmill RE, Hedrick MS. Gap junction blockade with carbenoxolone differentially affects fictive breathing in larval and adult bullfrogs. Respiratory physiology & neurobiology. 2003;138(2-3):239-51.
22. Paraguassu-Braga F, Borojevic R, Bouzas L, Barcinski M, Bonomo A. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. Cell Death & Differentiation. 2003;10(9):1101-8.

www.SID.ir