

اثر مهار کننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6)

نرگس قاسمی مهر^۱، زینت یزدانی^۱، علیرضا فارسی نژاد^۲، روح‌اله میرزایی خلیل آبادی^۲، احمد فاطمی^۳

چکیده

سابقه و هدف

در حالی که تلومراز در ۹۰٪-۸۵٪ سرطان‌ها از جمله در لوسمی لنفوبلاستیک حاد بیان می‌شود، در سلول‌های طبیعی بیان ناچیزی داشته و مهار آن می‌تواند یک رویکرد درمانی هدفمند برای درمان سرطان باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز سلول‌های NALM-6 بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف MST-312 تیمار شدند. سپس در زمان‌های مختلف زنده مانی سلولی با آزمون تریپان‌بلو، فعالیت متابولیک سلولی با روش رنگ سنجی MTT، آپوپتوز سلولی به روش فلوسیتومتری با استفاده از اتصال به آنکسین 7AAD/V- و آپوپتوز در سطح ژن با بررسی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بیش از ۵۰٪ کاهش در زنده مانی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸ میکرومولار MST-312 به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد. مقادیر میانگین و انحراف معیار درصد زنده مانی در زمان‌های صفر و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۲/۵ ± ۹۳/۵٪ به دست آمد. فعالیت متابولیک سلولی پس از تیمار ۴۸ ساعته در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار به ترتیب ۶٪، ۱۹/۶۹٪ و ۵۶/۹٪ کاهش یافت. مواجهه ۴۸ ساعته سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312، منجر به افزایش ۲۰٪ در آپوپتوز سلولی، افزایش ۲/۱۱ برابری بیان ژن Bax و کاهش ۶۱/۰ برابری بیان ژن Bcl-2 گردید.

نتیجه‌گیری

MST-312 با مهار تلومراز و القای آپوپتوز در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد NALM-6، می‌تواند به عنوان کاندیدی جدید برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیشنهاد شود.

کلمات کلیدی: تلومراز، آپوپتوز، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۲- PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - میدان پژوهش - کرمان - ایران - کدپستی:

۹۹۱۶۹۶۴۴۰۷

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یک بدخیمی خونی ناشی از تکثیر و تجمع بیش از حد پیش‌سازهای لنفوسیتی در مغز استخوان و خون محیطی می‌باشد (۱). شایع‌ترین علائم بالینی شامل تب، کاهش وزن و خستگی است که گاهی "همراه با بزرگی طحال، کبد و غدد لنفاوی و خونریزی‌های زیر جلدی به صورت پتشی و پورپورا می‌باشد (۲، ۳). هم چنین رشد بیش از حد پیش‌سازهای بدخیم لنفوئیدی باعث اشغال مغز استخوان شده و علائم مرتبط با آن شامل: کم خونی، ترمبوسیتوپنی و نوتروپنی بروز می‌کند (۴). علی‌رغم این که عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی به عنوان فاکتورهای دخیل در وقوع این بیماری معرفی شده‌اند، اما هنوز اتیولوژی آن مبهم باقی مانده است (۵). لوسمی لنفوبلاستیک حاد در تمام سنین رخ می‌دهد. هر چند در بزرگسالان کمتر از ۱٪ از بدخیمی‌ها را شامل می‌شود، اما در کودکان (با یک پیک وقوع در سنین ۲-۵ سال) از شیوع بالاتری برخوردار بوده و به عنوان شایع‌ترین بدخیمی سنین کودکی مطرح می‌باشد، به طوری که ۲۵٪ کل بدخیمی‌ها و ۸۰٪ لوسمی‌های حاد کودکان را شامل می‌شود (۶-۹). هر چند درمان ALL با رژیم‌های شیمی درمانی موفقیت‌آمیز بوده است، اما با اثرات سیتوتوکسیک بر روی بافت‌ها و مرگ و میر مرتبط با درمان همراه است. هم چنین در ۲۰٪-۱۵٪ موارد ALL کودکان و ۵۰٪ موارد ALL بزرگسالان، عود رخ می‌دهد که در مقایسه با بیماری اولیه، موارد عود با مقاومت به درمان و بقای ضعیف همراه است. بنابراین لزوم کاربرد هدف‌های درمانی جدید به منظور کاهش این مشکلات ضروری به نظر می‌رسد (۱۰، ۹). یکی از ویژگی‌های شاخص و مشترک که در اکثر سرطان‌ها مشاهده می‌شود، توانایی تکثیر نامحدود سلول‌هاست، که به واسطه بیان بالای آنزیمی به نام تلومراز حاصل می‌شود. تلومراز از طریق بازسازی توالی تلومر از مرگ سلولی ناشی از رسیدن طول تلومر به حد بحرانی جلوگیری کرده و به سلول قدرت نامیرایی و تکثیر نامحدود می‌دهد (۱۱). از آن جایی که سلول طبیعی تقریباً فاقد فعالیت آنزیم تلومراز می‌باشد، در نتیجه استفاده از عوامل مهارکننده تلومراز

نمی‌تواند روی این سلول‌ها اثر ویژه‌ای داشته باشد. این درحالی است که تلومراز در ۹۰٪-۸۵٪ سرطان‌های انسانی دوباره فعال می‌شود. با توجه به نیاز سلول‌های سرطانی به سطح بالای آنزیم تلومراز برای ادامه روند تکثیر، تلومراز می‌تواند یک هدف مناسب در درمان و مهار سرطان به حساب آید (۱۳، ۱۲). در لوسمی لنفوبلاستیک حاد، سطح فعالیت آنزیم تلومراز در نمونه مغز استخوان گرفته شده از بیماران به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه افراد طبیعی است و تلومراز به عنوان یک مارکر بدخیمی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد تلقی می‌شود (۱۵، ۱۴). از جمله مهارکننده‌های تلومراز می‌توان به ترکیبات مشتق از اپیگالوکاتچین گالات (EGCG)، مثل MST-312 اشاره کرد. EGCG (Epigallocatechin gallate) یک کاتچین اصلی چای سبز است که به صورت مؤثری تلومراز را مهار و رشد سلول را متوقف می‌کند (۱۶). MST-312 که مهارکننده تلومراز شماره ۹ نام دارد، فعالیت وابسته به دوز داشته، به طوری که در دوزهای پایین (۰/۷۵ میکرومولار) فعالیت ضد تلومرازی دارد و در دوزهای بالا (۲ میکرومولار)، سلول را به سمت مرگ سلولی سوق می‌دهد (۱۷). در مطالعه‌های گذشته اثر MST-312 بر القای آپوپتوز به واسطه افزایش ژن‌های شروع‌کننده آپوپتوز مانند Bax و هم چنین کاهش بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز مانند Bcl-2 نشان داده شده است (۱۸). هدف مطالعه حاضر بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز رده سلولی NALM-6 می‌باشد. با توجه به مطالعه‌های گذشته، رده سلولی NALM-6 دارای فعالیت بالای آنزیم تلومراز می‌باشد (۲۰، ۱۹). چنانچه مهار تلومراز بتواند مرگ سلولی را در رده سلولی NALM-6 القا کند، می‌توان مهار تلومراز را به عنوان استراتژی درمانی سودمندی در درمان ALL معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در یک مطالعه تجربی، رده سلولی NALM-6 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)

و ۱٪ پنی سیلین -استرپتومایسین (۱۰۰ U/mL) پنی سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین) در انکوباتور با رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. محلول ذخیره MST-312 (سیگما آلد ریچ، آمریکا) با جرم مولی ۳۸۰/۳۵ گرم بر مول تهیه شد. برای تهیه محلول ذخیره، ۵ میلی گرم دارو در ۱ میلی لیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد و غلظت ۱۳/۱۴ میلی مولار (۱۳۱۴۰ میکرومولار) به دست آمد. محلول کار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در حجم ۵۰۰ میکرولیتر تهیه و حجم مناسب برای به دست آمدن غلظت های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار تعیین شد.

سنجش زنده ماننی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان بلو:

برای بررسی درصد زنده ماننی سلولی، سلول های NALM-6 با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو سنجش شدند. این آزمون در واقع روشی کمی برای تعیین درصد سلول های زنده و مرده است. تریپان بلو از غشای هر دو سلول زنده و مرده عبور می کند ولی تنها سلول های زنده به دلیل داشتن فعالیت حیاتی قادر به دفع رنگ تریپان بلو می باشند. به عبارت دیگر در این آزمون سلول های زنده به صورت سفید و شفاف و سلول های مرده به رنگ آبی تیره در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده اند. سلول ها در پلیت کشت سلولی ۱۲ خانه با تراکم 2×10^5 سلول در هر خانه کشت داده شده و با غلظت های ۰، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار داروی MST-312 تیمار شدند. پس از پایان انکوباسیون در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سوسپانسیون سلولی با محلول تریپان ۰/۴٪ (سیگما، آلد ریچ، آمریکا)، به نسبت ۱ به ۱ مخلوط شدند. پس از ۱ الی ۲ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط مورد نظر بر روی لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ بررسی شد. سلول های زنده (شفاف) و مرده (آبی) شمارش شدند و زنده ماننی سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$= \text{درصد زنده ماننی}$$

$$= 100 \times (\text{تعداد کل سلول ها} / \text{تعداد سلول های زنده})$$

سنجش فعالیت متابولیک سلول های NALM-6 با روش رنگ سنجی MTT:

اثر غلظت های مختلف MST-312 بر روی فعالیت متابولیک سلول های NALM-6 با استفاده از روش رنگ سنجی MTT بررسی شد. MTT یک روش رنگ سنجی سریع، حساس و دقیق و بر پایه احیای نمک های تترازولیوم زرد رنگ 3-4,5 dimethyl thiazol-2-yl-2-5 (Zolium bromide) diphenyltetra متابولیکی سلول زنده توسط آنزیم های دهیدروژناز میتوکندریایی می باشد که در نتیجه فرآیند احیا، بلورهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل می شود.

سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به وسیله روش های اسپکتروفتومتری مقدار سنجی می شود. میزان بلور فورمازان ایجاد شده می تواند نشان دهنده درصد سلول های زنده باشد. روش کار بدین صورت انجام گرفت که سلول های NALM-6 (1×10^4 سلول در هر چاهک) با غلظت های ۰، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار داروی MST-312 تیمار و به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. حجم نهایی هر چاهک ۱۰۰ µL بود. ۴۸ ساعت پس از تیمار، پلیت ها با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محیط چاهک ها با وارونه کردن پلیت خارج شد. ۱۰۰ µL محلول MTT (۰/۵ mg/mL) در PBS فیلتر شده -سیگما آلد ریچ، آمریکا) به هر چاهک اضافه و تکمه سلولی به آرامی در محلول MTT حل شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون، به منظور حل شدن بلورهای بنفش رنگ فورمازان، ۱۰۰ µL محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده و جهت ظاهر شدن رنگ به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر مخلوط شد. میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. در پایان، میزان فعالیت متابولیک (باقای سلولی) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$= \text{درصد فعالیت متابولیک سلولی}$$

$$= 100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست})$$

سنجش آپتوز:

اثر داروی MST-312 بر روی آپتوز رده سلولی NALM-6 به وسیله رنگ آمیزی هم زمان با آنکسین-V و AAD-7 توسط کیت آپتوز FITC آنکسین-V (بیوساینس BD، آمریکا) Detection Kit II بررسی شد. سلول های NALM-6 در پلیت کشت سلول ۱۲ خانه با تراکم 2×10^5 سلول در هر خانه کشت داده شدند و با غلظت های مورد نظر (۰، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار) MST-312 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند (حجم نهایی هر چاهک ۲ میلی لیتر بود). نمونه با غلظت ۰ میکرومولار مورد تیمار دارویی قرار گرفت و به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بعد از اتمام انکوباسیون، محتویات هر چاهک به فالكون های مجزا منتقل شد. به منظور جمع آوری سلول ها، سانتریفوژ با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محیط رویی خارج و توده سلولی دو بار با PBS شستشو داده شد (هر بار با ۱ میلی لیتر PBS و سانتریفوژ با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه). پس از خارج کردن PBS رویی به هر توده سلولی، $100 \mu\text{L}$ بایندینگ بافر (۱x)، $5 \mu\text{L}$ آنکسین-V-FITC و $5 \mu\text{L}$ محلول رنگ 7-AAD اضافه شد. پس از یک ورتکس ملایم، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، $400 \mu\text{L}$ بایندینگ بافر (۱x) به سوسپانسیون سلولی اضافه و آنالیز با فلوسیتومتری انجام شد. برای هر نمونه مشخصات ۱۰۰۰۰ سلول ضبط شد و اطلاعات خروجی دستگاه با استفاده از نرم افزار Cell Quest آنالیز گردید. سلول هایی که آنکسین مثبت و 7-AAD منفی بودند، در فاز اولیه آپتوز و سلول هایی که هم آنکسین و هم 7-AAD مثبت بودند به عنوان سلول های فاز نهایی آپتوز در نظر گرفته شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

پس از ۴۸ ساعت از تیمار سلول ها با دوز ۴ میکرومولار MST-312، RNA سلول به صورت دستی و با استفاده از محلول جداسازی Tri-pure (رُوش-Tri-pure isolation Reagent) استخراج شد. به طور خلاصه سلول ها با مقدار تقریبی $10^6 \times 5$ سلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور

rpm ۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به توده سلولی یک میلی لیتر از محلول Tripure اضافه شده و سلول ها با استفاده از پیپتاژ و حرکت محکم دست لیز شدند. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم اضافه شده و پس از بستن درب میکروتیوب به مدت ۳۰ ثانیه با حرکت محکم دست تکان داده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۲۲۰۰ سانتریفوژ شدند. در این مرحله ۳ فاز تشکیل شد، فاز رویی که شامل RNA می باشد برداشته شده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۲۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی خالی و به رسوب RNA، ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵٪ اضافه گردید. میکروتیوب ها چندین مرتبه سروته شدند و سپس ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ اعمال شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور rpm ۷۵۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس مایع رویی تخلیه، رسوب خشک و در ۲۰ میکرولیتر آب DEPC (DEPC Treated سیگما، آلد ریچ، Water) حل شد و در پایان ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ و ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد همراه با حرکت ملایم انجام گرفت. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و به وسیله میزان جذب نمونه ها در طول موج ۲۶۰ nm اندازه گیری شد. از نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نیز برای بررسی میزان خلوص RNA استفاده شد که دامنه بین ۱ تا ۲ به عنوان بهترین خلوص در نظر گرفته می شود. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، نمونه RNA بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد. چنانچه RNA کیفیت مطلوبی داشته باشد بایستی باندهای S ۲۸ و S ۱۸ مربوط به RNA ریبوزومی (rRNA) مشاهده شوند. به منظور حذف آلودگی DNA از RNA از کیت DNase Treatment (فرمنتاز) استفاده شد. به طوری که به ازای هر نمونه، ۱ میکروگرم از RNA به همراه ۱ میکرولیتر buffer DNase I Reaction ۱۰X و ۱ میکرولیتر DNase I با آب

حجم مورد نیاز (میکرولیتر)	ماده مورد استفاده
۴	Reaction Buffer ۵ X
۱	Random ۶ mers (۱۰۰ μM)
۲	dNTP (۱۰ mM)
۱	Ribolock Rnase Inhibitor ۱ (۲۰ U/μL)
۱	RevertAid M-Mul V (۲۰۰ U/μL)
دما و زمان واکنش در ترموسایکلر بر اساس کیت: • ۲۵ درجه به مدت ۵ دقیقه • ۴۲ درجه به مدت ۱ ساعت • ۷۰ درجه به مدت ۵ دقیقه	

جدول ۲: نحوه تهیه مسترمیکس واکنش Real Time PCR

حجم مورد نیاز (میکرولیتر)	ماده مورد استفاده
۵	مستر میکس گرین ۲ X (آمپلیکون)
۰/۵	آغازگر جلوبرنده
۰/۵	آغازگر معکوس
۰/۵	cDNA
۳/۵	آب تهی از نوکلئاز

جدول ۳: برنامه مورد استفاده برای واکنش Real Time PCR

مرحله واکنش	دما درجه سانتی گراد	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
فعال سازی اولیه	۹۵	۹۰۰	۱ چرخه
فعال سازی اولیه	۹۵	۱۵	۴۰ چرخه
طویل سازی	۶۵	۶۰	

عاری از نوکلئاز به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد.

در نهایت، ۱ میکرولیتر از محلول ۵۰ میلی مول EDTA برای توقف واکنش افزوده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای ساخت cDNA از کیت ساخت DNA مکمل (RevertAid First Strand DNA complementary DNA (cDNA) Synthesis kit from Fermentas) تهیه شد. این کیت امکان ساخت DNA از روی RNA را فراهم می کند. در این مرحله به محصول واکنش DNase Treatment که حاوی ۱۱ میکرولیتر RNA می باشد، ۹ میکرولیتر از مستر تهیه شده اضافه شد و حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسید (جدول ۱). برای مطمئن شدن از ساخت cDNA، واکنش PCR برای ژن بتا اکتین انجام گرفت و سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ران شد. حضور باند مربوط به تکثیر بتا اکتین مشاهده شد، که دال بر حضور الگوی DNA و ساخت cDNA می باشد.

واکنش کمی Real Time PCR:

واکنش Real Time PCR به منظور بررسی بیان نسبی ژن های Bcl2 و BaX در گروه تیمار شده و کنترل بعد از تیمار سلول های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار -MST- 312 انجام شد.

مستر میکس ۲X گرین (Real Q Plus 2x Master Mix) آمپلیکون - گرین) برای انجام واکنش Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۴-۲).

جدول ۱: مستر میکس تهیه شده برای واکنش ترانس کریپتاز

معکوس Transcription

جدول ۴: توالی آغازگرهای معکوس و جلوبرنده ژن های Bcl-2، Bax و β actin

نام ژن	توالی آغازگر جلوبرنده	توالی آغازگر معکوس
β actin	CCAACCGCGAGAAGATGA	TCCATCACGATGCCAGTG
Bax	AGGATCGAGCAGGGCGAATG	TCAGCTTCTTGTTGGACGCA
Bcl-2	ATCGCCTGTGGATGACTGAG	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG

یافته‌ها

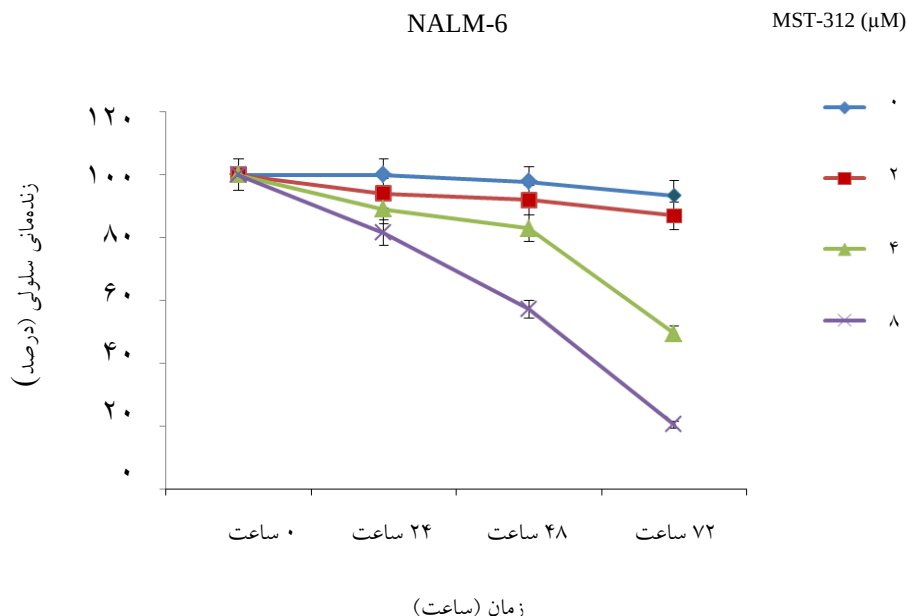
سنجش زنده‌مانی سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

تأثیر غلظت‌های مختلف MST-312 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی NALM-6 با آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو بررسی گردید. نتایج نشان داد که زنده‌مانی این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان به طور قابل توجهی کاهش یافت. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸ میکرومولار MST-312، در طول ۴۸ ساعت، بیش از ۵۰٪ کاهش زنده‌مانی نشان دادند ($p < 0/001$). از آن جایی که به دنبال مواجهه سلول‌ها با MST-312 در طول ۲۴ ساعت اثر قابل توجهی بر روی زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده نشد، هم‌چنین در طول ۷۲ ساعت سلول‌ها با کاهش شدید زنده‌مانی مواجهه شدند، زمان ۴۸ ساعت به عنوان زمان مناسب برای سایر آزمایش‌ها انتخاب شد (نمودار ۱).

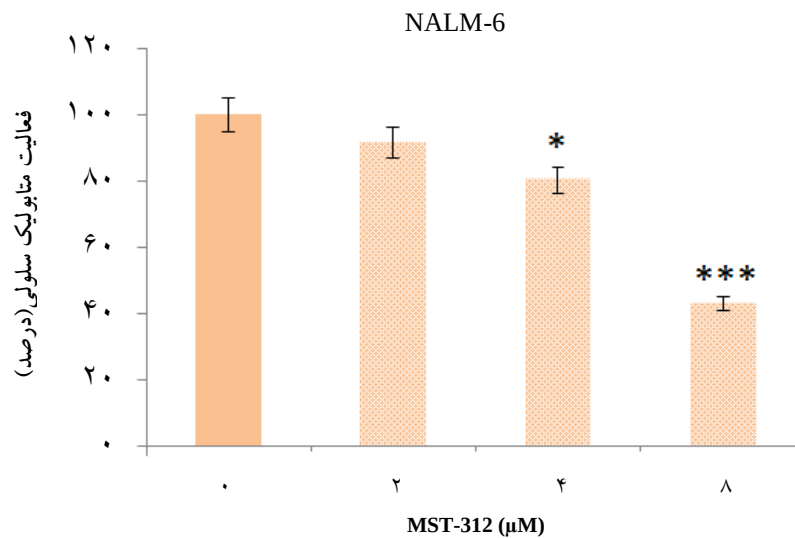
واکنش در دستگاه روتور ژن Q (کیاژن) انجام و با استفاده از نرم‌افزار REST، داده‌های حاصل از آن آنالیز گردید. برای تایید اختصاصی بودن محصولات تولید شده، آنالیز منحنی ذوب (melting curve) صورت گرفت. در این آنالیز محصولاتی که دارای طول و توالی یکسانی باشند دمای ذوب مشابهی داشته و منحنی ذوب آن‌ها روی هم قرار می‌گیرد. از ژن بتا‌اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی (House keeping) جهت نرمالیزه کردن نتایج بیان ژن‌ها استفاده شد. بیان هر ژن سه بار تکرار گردید و بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta CT$ طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

آنالیز آماری:

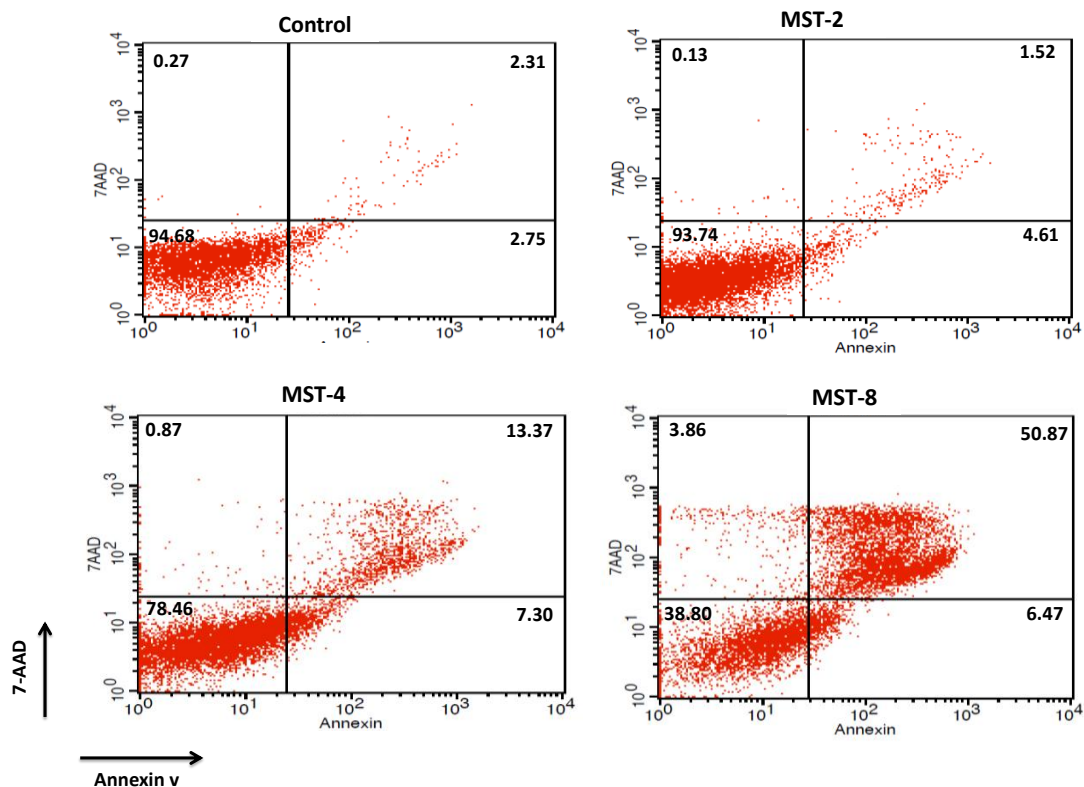
داده‌های حاصل از آزمایش‌ها به نرم‌افزار SPSS ۲۲ وارد و توسط آزمون آماری paired-samples T Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.



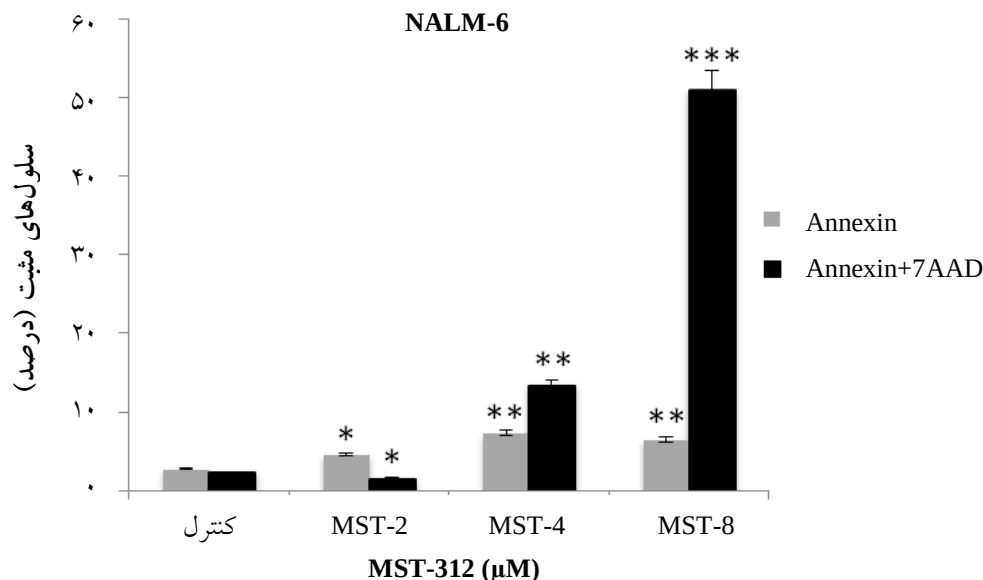
نمودار ۱: MST-312 باعث کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های NALM-6 می‌شود. سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف MST-312 مواجه شدند و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه، زنده‌مانی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو، بررسی شد. زنده‌مانی سلول‌های NALM-6، پس از تیمار کوتاه مدت با MST-312 به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافت.



نمودار ۲: MST-312 باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 می‌شود. سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف MST-312 تیمار شدند و بعد از ۴۸ ساعت فعالیت متابولیک سلولی با آزمون رنگ‌سنجی MTT بررسی شد. فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 مواجهه شده با MST-312 به طور قابل توجهی به صورت وابسته به دوز کاهش یافت ($p < 0.05$ * و $p < 0.001$ ***).



شکل ۱: سلول‌های NALM-6 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۴ میکرومولار MST-312، از نظر اتصال به آنکسین-۷/۷-AAD مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های آنکسین منفی/7-AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده، سلول‌های آنکسین مثبت/7-AAD منفی به عنوان سلول‌های مراحل اولیه آپتوز، سلول‌های آنکسین مثبت/7-AAD مثبت به عنوان سلول‌های مراحل انتهایی آپتوز و سلول‌های آنکسین منفی/7-AAD مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک تلقی شدند.



نمودار ۳: اثر آپوپتوزی وابسته به دوز MST-312 بر رده سلولی NALM-6 مشاهده شد. MST-312 بر آپوپتوز رده سلولی NALM-6 سلول‌های NALM-6 به مدت ۴۸ ساعت با دوزهای مختلف MST-312 تیمار شدند. سپس این سلول‌ها از نظر اتصال به آنکسین-7AAD/v مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های آنکسین منفی/7AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده، سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD منفی به عنوان سلول‌های مراحل اولیه آپوپتوز، سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD مثبت به عنوان سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز و سلول‌های آنکسین منفی/7AAD مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک تلقی شدند. تقریباً ۲۰٪ آپوپتوز در مواجهه ۴۸ ساعته با غلظت ۴ میکرومولار مشاهده شد. نتیجه از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است ($p < 0.05$ ، *، $p < 0.01$ ، ** و $p < 0.001$ ***).

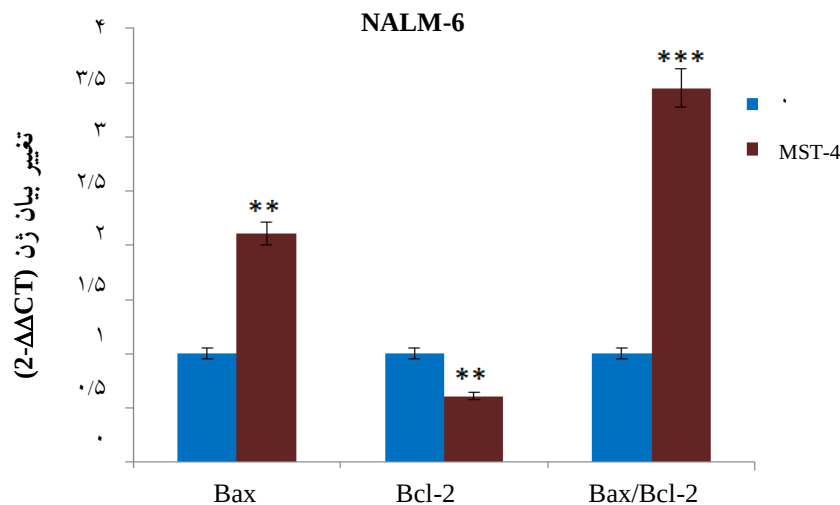
سنجش میزان آپوپتوز سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

بعد از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار، از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II به منظور بررسی اثر MST-312 بر روی آپوپتوز سلول‌های NALM-6 استفاده شد. سلول‌هایی که آنکسین و 7-AAD منفی بودند به عنوان سلول‌های زنده، سلول‌هایی که آنکسین مثبت و 7-AAD منفی بودند به عنوان سلول‌های مرحله اولیه آپوپتوز، سلول‌هایی که برای آنکسین و 7-AAD مثبت بودند به عنوان سلول‌های مراحل نهایی آپوپتوز و سلول‌های آنکسین منفی و 7-AAD مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

انکوباسیون کوتاه مدت با MST-312 به طور مشخص سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD منفی و سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD مثبت را افزایش می‌دهد که

سنجش فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

به منظور بررسی اثر دوزهای مختلف MST-312 بر روی فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد (نمودار ۲). همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، فعالیت متابولیک سلول‌ها که نشان‌دهنده میزان سلول‌های زنده است، به طور قابل توجهی در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف MST-312 در طول ۴۸ ساعت کاهش یافت که نشان‌دهنده اثر کشندگی وابسته به دوز MST-312 بر روی این سلول‌ها می‌باشد. به طوری که در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار، میزان فعالیت متابولیک سلولی به ترتیب ۶۹/۱۹ و ۹۶/۵۶ درصد کاهش پیدا کرد که این کاهش در دوزهای ۴ و ۸ به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (مقادیر $p < 0.05$ و $p < 0.001$ به ترتیب برای دوزهای ۴ و ۸ میکرومولار MST-312).



نمودار ۴: MST-312، بیان ژن *Bcl2* را کاهش و بیان ژن *Bax* و نسبت *Bax/Bcl2* را افزایش می‌دهد. پس از ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312، RNA سلول‌ها استخراج و cDNA ساخت شد. نتایج Real Time PCR به روش سایبرگرین و با نشانگرهای اختصاصی نشان داده شده است. مقادیر با بیان ژن $\beta actin$ نرمالیزه شده‌اند ($p < 0.01$ و $p < 0.001$).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار ۴۸ ساعته با MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی، کاهش فعالیت متابولیک سلولی و افزایش آپوتوز سلولی در رده سلولی NALM-6 می‌شود. در حال حاضر انتخاب یک ویژگی مشخص در سلول‌های سرطانی که بتواند به عنوان شاخصی برای درمان هدفمند سرطان مورد استفاده قرار گیرد، از اهمیت به سزایی برخوردار است. یکی از ویژگی‌های اختصاصی در اکثر سرطان‌ها، بیان بالای آنزیم تلومراز است که با بازسازی توالی تلومر به سلول قدرت نامیرایی و تکثیر نامحدود می‌دهد (۱۱). از آن جایی که سلول طبیعی تقریباً فاقد فعالیت آنزیم تلومراز است، در نتیجه استفاده از عوامل مهار کننده تلومراز نمی‌تواند روی این سلول‌ها اثر ویژه‌ای داشته باشد، در حالی که تلومراز در ۹۰٪-۸۵٪ سرطان‌های انسانی دوباره فعال می‌شود و با توجه به نیاز سلول‌های سرطانی به سطح بالای آنزیم تلومراز برای ادامه روند تکثیر و نقش به سزای آن در روند تومورزایی، تلومراز می‌تواند یک هدف مناسب در درمان و مهار سرطان به حساب آید (۱۲). ازجمله در لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، سطح فعالیت آنزیم تلومراز در نمونه مغز استخوان گرفته شده از بیماران در زمان

نشان‌دهنده تاثیر آپوتوتیک این دارو بر سلول‌های NALM-6 می‌باشد (نمودار ۳). همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، غلظت ۴ میکرومولار که با آپوتوز قابل توجهی همراه بود، به عنوان غلظت مورد نظر برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت ($p < 0.01$).

بررسی سطح بیان ژن پیش‌آپتوزی *Bax* و ژن ضد آپتوزی *Bcl-2* در سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

به منظور بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوتوز شامل *Bax* و *Bcl-2*، از غلظت ۴ میکرومولار MST-312 که در بررسی فلوسایتومتری با آپوتوز قابل توجهی همراه بود استفاده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312، افزایش ۲/۱۱ برابری بیان ژن *Bax* و کاهش ۰/۶۱ برابری بیان ژن *Bcl2* در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.01$). هم چنین نسبت *Bax/Bcl-2* افزایش ۳/۴۵ برابری ($p < 0.001$) (نمودار ۴). نسبت به گروه کنترل نشان داد که تاییدی بر آپوتوز القا شده توسط MST-312 در این سلول‌ها است ($p < 0.001$).

هم چنین بررسی اثر MST-312 بر روی رده سلولی سرطان کولورکتال توسط S سیونگ و همکارانش نشان داد MST-312 باعث کاهش فعالیت متابولیک، کاهش قابل توجه جمعیت سلول‌های سرطانی و آپوپتوز سلولی می‌شود. اثر MST-312 در ترکیب با داروی مورین باعث افزایش قابل توجه تاثیر این دارو بر رده سلولی سرطان کولورکتال شد (۲۷). در مطالعه دیگری که توسط گورانگ و همکارانش انجام شد، MST-312 باعث کاهش قابل توجه فعالیت تلومراز و توقف رشد در سلول‌های سرطان سینه شد (۲۸). سیمیا و همکارانش نشان دادند MST-312 باعث کوتاه شدن طول تلومر و مهار رشد سلول‌های سرطانی و به عنوان کاندیدی قابل اعتماد برای هدف قرار دادن تلومراز معرفی گردید (۲۹).

در مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر روی رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6)، که در مطالعه‌های گذشته بیان بالایی از آنزیم تلومراز در این رده سلولی گزارش شده است، سلول‌های NALM-6 تحت تیمار کوتاه مدت (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته) با غلظت‌های مختلف MST-312 قرار گرفتند و زنده‌مانی سلولی در زمان‌های معین سنجیده شد (۲۰، ۱۹). با توجه به این که در زمان ۲۴ ساعت اثر قابل توجهی بر روی زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده نشد، هم چنین در زمان ۷۲ ساعت میزان زنده‌مانی سلولی به صورت چشمگیری کاهش داشت، زمان ۴۸ ساعت به منظور بررسی‌های بیشتر انتخاب شد. نتایج ما نشان داد که تیمار کوتاه مدت با MST-312 موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. هم چنین بررسی فعالیت متابولیک سلولی به دنبال تیمار ۴۸ ساعته با MST-312، به صورت قابل توجهی کاهش می‌یابد. از طرفی MST-312 باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها شده که این آپوپتوز در سطح ژن با افزایش ژن آپوپتوزی Bax و ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 نیز تایید شد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعه‌های مشابه در تحت تاثیر قرار دادن سلول‌های سرطانی به صورت اختصاصی به واسطه مهارکننده‌های تلومراز و از جمله MST-312 و هم چنین با توجه به نقش موثر

تشخیص یا در زمان عود مجدد، به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه افراد طبیعی است و تلومراز به عنوان یک مارکر بدخیمی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد تلقی می‌شود (۱۵، ۱۴). در حال حاضر انواع مهارکننده‌های تلومراز به تنهایی یا در ترکیب با داروهای دیگر در فازهای I و II کارآزمایی‌های بالینی جهت درمان انواع سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۳-۲۱). MST-312 که مهارکننده تلومراز شماره ۹ نام دارد، یک ترکیب مشتق شده از چای سبز است که به صورت وابسته به دوز باعث مهار آنزیم تلومراز شده و سلول را به سمت مرگ سوق می‌دهد (۱۷). در مطالعه‌های پیشین بر روی تومورهای مغزی و ریه، دو اثر متفاوت وابسته به زمان از MST-312 نشان داده شده است. یک اثر کوتاه مدت که به دنبال مواجهه کوتاه مدت (برای مثال ۷۲ ساعته) رخ می‌دهد و همراه با آسیب به DNA، توقف چرخه سلولی در مراحل G2/M و کاهش زنده‌مانی سلولی است. این اثر به دلیل تخریب کمپلکس تلومراز و برداشته شدن اثر پوششی تلومراز از روی DNA تلومر و در نتیجه شناسایی تلومر به عنوان یک دورشته آزاد توسط مسیر کینازی ATM ایجاد می‌شود. اثر طولانی مدت (بیش از ۱/۵ ماه) به دنبال مواجهه طولانی مدت و در اثر عدم جبران طول تلومر توسط تلومراز و کوتاه شدن تلومر رخ می‌دهد (۲۶-۲۴).

به علاوه مطالعه‌های قبلی ما در مواجهه کوتاه مدت سلول‌ها با MST-312، بیانگر اثر آپوپتوتیک وابسته به دوز و زمان MST-312 بر روی رده‌های سلولی میلوم مالتیپل (U266) و لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (NB4 و HL60) بود. هم چنین نتیجه بررسی آنالیز چرخه سلولی در سلول‌های تیمار شده با MST-312 تاییدکننده توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M در رده‌های سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد بود. علاوه بر این هیچ گونه اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوزی از این مهارکننده بر روی جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی فرد سالم (PBMC) در مواجهه مشابه از نظر غلظت و زمان مشاهده نشد. این موضوع نشان‌دهنده اثر اختصاصی تومور MST-312 می‌باشد (۱۸).

MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی، فعالیت متابولیک و افزایش آپتوز سلولی می‌شود. با توجه به نتایج این مطالعه، MST-312 با مهار تلومراز و القای آپتوز در سلول‌های NALM-6 می‌تواند به عنوان کاندیدی در درمان ALL پیشنهاد شود.

تلومراز در روند بدخیمی‌ها از جمله لوسمی لنفوبلاستیک حاد، MST-312 می‌تواند به عنوان کاندیدی در درمان ALL پیشنهاد شود.

نتیجه‌گیری

تیمار کوتاه مدت سلول‌های سرطانی NALM-6 با

References:

- Mei L, Ontiveros EP, Grif EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Blood Reviews Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev* 2015; 29(4): 243-9.
- Nesheli HM, Moghaddam TG, Zahedpasha Y, Norouzi AR. Acute Lymphoblastic Leukemia with Eosinophilia and Strongyloides stercoralis Hyperinfection Case Presentation. *Iran J Pediatr* 2011; 21(4): 549-52.
- Pahloosye A, Hashemi A, Mirmohammadi SJ, Atefi A. Presenting Clinical and Laboratory Data of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Iran J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 1(3): 71-7.
- Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017; 7(6): e577.
- Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnett D. Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(9): 1608-11.
- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381(9881): 1943-55.
- Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015; 121(15): 2517-28.
- Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int* 2018; 60(1): 4-12.
- Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2012; 30(14): 1663-9.
- Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman PV, Harris MH, Stevenson K, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* 2014; 5: 3469.
- Dong X, Liu A, Zer C, Feng J, Zhen Z, Yang M, et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 133.
- Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* 2013; 39(5): 444-56.
- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). *Int J Oncol* 2012; 41(5): 1561-9.
- Kustanovich AM, Savitskaya TV, Potapnev MP. Telomerase Activity and Telomere Length in Malignant Cells of Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Exp Oncol* 2003; 25(1): 69-73.
- Plasschaert SLA, Kamps WA, Vellenga E, de Vries EGE, de Bont ESJM. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: A question of maturation? *Cancer Treat Rev* 2004; 30(1): 37-51.
- Schneider WC. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J Biol Chem* 1945; 161: 293-303.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai E V, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(21): 10114-8.
- Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-κB pathway. *Tumour Biol* 2015; 36(11): 8425-37.
- Kanno S, Kitajima Y, Kakuta M, Osanai Y, Kurauchi K, Ujibe M, et al. Costunolide-induced apoptosis is caused by receptor-mediated pathway and inhibition of telomerase activity in NALM-6 cells. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(5): 1024-8.
- Bashash D, Zareii M, Safaroghli-Azar A, Omrani MD, Ghaffari SH. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Hematology* 2017; 22(6): 330-40.
- Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, Fernandez-Marcelo T, Iniesta P, Ortiz-de-Solorzano C, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer* 2011; 10: 96.
- Gurung RL, Lim HK, Venkatesan S, Lee PSW, Hande

- MP. Targeting DNA-PKcs and telomerase in brain tumour cells. *Mol Cancer* 2014; 13: 232.
- 23- Baerlocher GM, Oppliger Leibundgut E, Ottmann OG, Spitzer G, Odenike O, McDevitt MA, et al. Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. *N Engl J Med* 2015; 373(10): 920-8.
- 24- Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2(4): 257-65.
- 25- Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57(3): 191-214.
- 26- Wong VCH, Ma J, Hawkins CE. Telomerase inhibition induces acute ATM-dependent growth arrest in human astrocytomas. *Cancer Lett* 2009; 274(1): 151-9.
- 27- Chung SS, Oliva B, Dwabe S, Vadgama JV. Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST-312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. *Int J Oncol* 2016; 49(2): 487-98.
- 28- Gurung RL, Lim SN, Low GKM, Hande MP. MST-312 alters telomere dynamics, gene expression profiles and growth in human breast cancer cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2014; 7(4-6): 283-98.
- 29- Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K, et al. Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(9): 657-65.

Original Article

The effect of telomerase inhibitor MST-312 on apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell line NALM-6

Ghasemimehr N.¹, Yazdani Z.¹, Farsinejad A.R.¹, Mirzaee Khalilabadi R.¹, Fatemi A.¹

¹Department of Hematology and Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract

Background and Objectives

There have been continuous efforts in telomerase-targeted therapy for cancer treatment because telomerase expression is significantly increased in about 85- 90% of human cancers while its expression is usually silenced in normal cells.

Materials and Methods

Throughout this experimental study, NALM-6 cells were treated with different concentrations of telomerase inhibitor, MST-312 at different times. Then, cell viability and metabolic activity were evaluated by trypan blue and MTT assays; cell apoptosis was also evaluated by flow cytometry using Annexin V Apoptosis Detection Kit. In addition, the expression of BAX and BCL2 genes was evaluated in the treated cells using Quantitative Real-time PCR.

Results

A dose-and time-dependent decrease was observed in the viability of NALM-6 cells after exposure with different concentration of MST-312. Over 50% decrease was observed in the viability of the cells treated with 8 μ M of MST-312 after 48 h. The cytotoxic effect of MST-312 was dose- dependent, with approximately 6, 19.69 and 56.9% reduction in metabolic activity of NALM-6 cells after 48 h exposure with 2, 4, and 8 μ M of MST-312, respectively. Approximately 20% apoptosis was observed in NALM-6 cells treated with 4 μ M of MST-312 after 48 h. Gene expression analysis also showed that 4 μ M of MST-312 led to upregulation of BAX and downregulation of Bcl-2 genes.

Conclusions

Inhibition of telomerase activity by MST-312 can be proposed as a new candidate for the treatment of acute lymphoblastic leukemia.

Key words: Telomerase, Apoptosis, Acute Lymphoid Leukemia

Received: 8 Apr 2018

Accepted: 9 May 2018

Correspondence: Fatemi A., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Department of Hematology and Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences.

Postal Code: 7619794435, Kerman, Iran. Tel: (+9834) 32112007; Fax: (+9834) 31325375

E-mail: ahmad.fatemi2@gmail.com