

القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش درصد Sub- G_1 متعاقب تیمار سلول های Nalm-6 با مهار کننده سنتتیک hTERT

محدثه زارعی^۱، داوود بشاش^۲

چکیده

سابقه و هدف

به دلیل نقش تلومراز در تکثیر نامحدود اکثر سلول های سرطانی از جمله بدخیمی های خونی، مهار تلومراز به عنوان روش مناسبی جهت درمان سرطان ها مطرح می باشد. هدف از مطالعه، بررسی اثر BIBR1532 که یک مهار کننده سنتتیک hTERT می باشد، بر روی فعالیت متابولیک، میزان ساخت DNA، تغییرات چرخه سلولی و بیان ژن های $p21$ ، $p73$ ، Bax و Bad در سلول های Nalm-6 (رده سلولی لوئمی لنفوبلاستیک حاد) بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی به منظور بررسی اثر BIBR1532، سلول ها در حضور غلظت های مختلف دارو کشت داده شدند و متعاقباً آزمون های BrdU cell proliferation assay، Microculture Tetrazolium، Flowcytometric cell cycle arrest و Quantitative real-time انجام شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده نشان داد که BIBR1532 دارای اثر مهار بر فعالیت متابولیک و ساخت DNA سلول های رده Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان می باشد. هم چنین نتایج حاکی از افزایش بیان mRNA ژن های Bad، Bax، $p73$ و $p21$ بود که خود متعاقباً با توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش مرحله Sub- G_1 همراه می باشد.

نتیجه گیری

از آن جایی که تیمار با داروی BIBR1532 در رده سلولی Nalm-6 سبب القاء توقف چرخه سلولی و فعال شدن مسیر آپوپتوز می گردد، لذا می توان از افزوده شدن درمان های مبتنی بر داروهای آنتی تلومراز به عنوان یک استراتژی جدید در درمان مبتلایان به لوئمی لنفوبلاستیک حاد بهره جست.

کلمات کلیدی: لوئمی لنفوبلاستیک حاد، BIBR1532، تلومراز

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷

۱- کارشناس ارشد خون شناسی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - گروه هماتولوژی - تهران - ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD خون شناسی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - گروه هماتولوژی - میدان قدس - خیابان دربند - تهران - ایران - کدپستی: ۱۹۷۱۶۵۳۳۱۲

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، شایع‌ترین سرطان دوران کودکی بوده و حدود ۳۰٪ از سرطان‌های این دوران را به خود اختصاص می‌دهد. هر چند بیشترین شیوع ALL مربوط به سنین ۲ تا ۵ سال می‌باشد، با این حال، احتمال ابتلا به این لوسمی در افراد جوان و مسن نیز وجود دارد (۱). علی‌رغم میزان بالای پاسخ به درمان در این بیماری، مقاومت به درمان‌های متداول و عود بیماری، هم‌چنان به عنوان یک معضل مهم مطرح است (۲). بدیهی است که درک کامل مکانیسم‌هایی که سبب مقاومت در برابر داروهای شیمی‌درمانی می‌شوند، می‌تواند سبب معرفی درمان‌های جدید در این بیماری شود (۳). اگر چه ماهیت کلینیکی سرطان‌ها بسیار هتروژن می‌باشد، اما اکثر تومورها در تعداد محدودی از ویژگی‌ها هم‌چون توانایی تکثیر نامحدود، رشد غیر قابل کنترل، تهاجم به بافت‌ها و انتشار متاستاتیک مشترک هستند (۴). بسیاری از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که کسب توانایی تکثیر نامحدود در سلول‌های سرطانی که عمدتاً ناشی از فعالیت آنزیم تلومراز است، مهم‌ترین مرحله در پیشرفت سرطان می‌باشد (۵). تلومراز، آنزیمی است که بعد از همانندسازی فعال شده و باعث افزودن تعداد نسبتاً زیادی نوکلئوتید به انتهای کروموزوم‌ها می‌شود. این آنزیم که یک کمپلکس چند پروتئینی با ساختار ریبونوکلئوپروتئین است، دارای فعالیت ترانس کریپتاز معکوس (RT) بوده و قادر است از روی RNA، مولکول DNA تولید کند (۶-۸). مشخص شده است که آنزیم تلومراز در ۹۰٪ از بدخیمی‌ها افزایش بیان دارد، این در حالی است که در سلول‌های نرمال این آنزیم بیان نشده و غیرفعال می‌باشد. مطالعه‌های بسیاری نشان می‌دهد که هدف قرار دادن فعالیت تلومراز در بسیاری از تومورها سبب تداخل در عملکرد تلومر و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود (۹)؛ از این رو می‌توان از مهارکننده‌های تلومراز به عنوان اهداف درمانی امیدوار کننده در مهار رشد و تکثیر سرطان بهره جست.

در میان این دسته از داروها، BIBR1532 به عنوان مهارکننده اختصاصی hTERT توجه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است (۱۰). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که مهار

تلومراز با استفاده از BIBR1532 در بسیاری از سلول‌های سرطانی هم‌چون پروستات، پستان، ریه و فیبروسارکوما منجر به کاهش طول تلومر و القاء مرگ سلولی می‌شود (۱۱). هم‌چنین اثر سائیتوتوکسیک مستقیم این دارو در کوتاه مدت، بدون تأثیر بر سلول‌های نرمال، بر روی سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد و لوسمی لنفوییدی مزمن نیز به صورت وابسته به دوز و زمان نشان داده شده است (۱۲). نتایج حاصل از مطالعه اخیر توسط شی و همکاران نشان داد که استفاده از این دارو در سرطان سینه سبب القاء آپوپتوز از طریق مهار تلومر و توقف چرخه سلولی در مرحله G₁ می‌شود (۱۳). با توجه به این که مشخص شده است که بیان آنزیم تلومراز در مبتلایان به ALL افزایش دارد، لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا کارایی استراتژی مبتنی بر استفاده از داروهای آنتی‌تلومراز را در رده سلولی Nalm-6 (Pre-B ALL cell) بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تیمار درویی:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های Nalm-6 (سلول‌های رده لوسمی لنفوبلاستیک حاد) به صورت سوسپانسیون در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۲ میلی‌مولار از ال-گلوتامین، ۱۰٪ FBS، پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ U/mL و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ µg/mL در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ از CO₂ کشت داده شدند. برای تیمار دارویی سلول‌ها از داروی BIBR1532 (آمریکا-بیوسانس) که به صورت پودر می‌باشد، استفاده شد. محلول ذخیره BIBR1532 در غلظت ۱ mM و به واسطه حل کردن این دارو در DMSO استریل تهیه شد. محلول ذخیره را در میکروتیوب‌ها تقسیم کرده و آن‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری کردیم. به منظور تعیین اثرات بهینه BIBR1532، دو متغیر دوز و زمان در نظر گرفته شد؛ بدین ترتیب که سلول‌های سرطانی Nalm-6 با غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۶۰ میکرومولار از دارو طی مدت زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. در این مطالعه، سلول‌های تیمار نشده با دارو به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده است. در ضمن به منظور افزایش بهره‌وری کار

و بررسی مقایسه‌ای، تمامی آزمایش‌ها برای هر دوز و زمان به صورت تریپلیکیت انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی:

برای بررسی اثر مهار داری داروی BIBR1532 بر روی فعالیت متابولیک سلولی، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر در حضور یا عدم حضور دارو به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

بعد از اتمام زمان تیمار، محلول MTT در غلظت ۵mg/mL به سلول‌های درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، پلیت حاوی سلول‌ها با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. در ادامه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان ساخت DNA:

اثر مهار داری BIBR1532 بر روی تکثیر سلول‌های Nalm-6 از طریق تعیین میزان مشارکت برموداکسی‌یوریدین در DNA سلول‌های Nalm-6 با استفاده از BrdU-based cell proliferation ELISA kit طبق دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک درون پلیت ۹۶ تایی در حضور یا عدم حضور BIBR1532 کشت داده شدند. ۱۲ ساعت مانده به انتهای زمان انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر محلول BrdU که در کیت موجود می‌باشد، به سلول‌ها افزوده شد؛ در ادامه و با استفاده از محلول FixDenat، سلول‌ها فیکس شده و DNA آن‌ها دناتوره گشت. سلول‌ها با آنتی‌بادی علیه BrdU که با آنزیم پراکسیداز کتروگه می‌باشد، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و در انتهای این زمان، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و آن هم به منظور پایان دادن به عملکرد آنزیم پراکسیداز، از محلول اسید سولفوریک ۱ مولار استفاده شد. در انتها، میزان رنگ ایجاد شده در هر

چاهک با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج nm ۴۵۰ خوانده شد. در نهایت و برای محاسبه اثر مهار داری BIBR1532 بر روی تکثیر و بررسی میزان کاهش ساخت DNA سلول‌های Nalm-6 تیمار شده از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد ساخت DNA} = \frac{\text{OD exp}}{\text{OD cont}} \times 100$$

در این فرمول، OD exp و OD cont به ترتیب بیانگر جذب نوری سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌باشد.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

برای استخراج RNA از محلول TriPure Isolation (روش) Reagent طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های Nalm-6 با BIBR1532 و متعاقب گذشت ۲۴ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. در ادامه کار، برای انجام واکنش رونویسی معکوس و جهت ساخت cDNA از (فرمتاز) RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد.

حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ μL بود و محتویات آن شامل ۴ μL از بافر PCR 5X، ۲ μL از dNTP، ۱ μL از راندم هگزامر، ۱ μL آب تیمار شده با DEPC، ۱ μL مهار کننده RNase (۲۰ U/μL)، ۱ μL ترانس کریپتاز معکوس M-MULV (۲۰۰ U/μL) و ۱ μg از RNA مورد آزمایش به ازای هر واکنش می‌باشد. محتوی مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت، واکنش ساخت cDNA به واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایان پذیرفت. cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real-time PCR

سایز (bp)	آغازگر معکوس (5'-3')	آغازگر جلوبرنده (5'-3')	ژن
۱۱۱	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	HPRT
۱۳۰	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	CCTGTCAGTGTCTTGTACCCT	p21
۱۰۸	CTCAGCAGATTGAAGTGGGC	GTCAAGCCGGGGGAATAATGA	p73
۲۴۲	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	Bax
۲۴۹	CCCATCCCTTCGTCGTCCT	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	Bad

می‌باشد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت، الگوی رنگ‌پذیری DNA با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفته و داده‌ها با استفاده از نرم افزار WINMDI آنالیز شدند.

آنالیز آماری:

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. اختلاف معنادار بین متغیرهای آزمایش با استفاده از آزمون t دو دامنه تعیین شد. هم چنین به منظور مقایسه بین گروه کنترل و نمونه‌های آزمایش شده از آزمون دانست استفاده گردید. مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

BIBR1532 به صورت وابسته به دوز و زمان باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 می‌شود:

به منظور بررسی اثر BIBR1532 بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 از روش MTT استفاده شد. طی بررسی‌های صورت گرفته بر روی سلول‌های تیمار شده، در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مشخص گردید که داروی BIBR1532 سبب کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌شود. در سلول‌های تیمار شده، با افزایش غلظت داروی BIBR1532 فعالیت متابولیک سلول‌ها به صورت وابسته به دوز کاهش می‌یابد. هم چنین نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش زمان مواجهه سلول‌ها با دارو نیز میزان تاثیرگذاری سایتوتوکسیک این مهارکننده

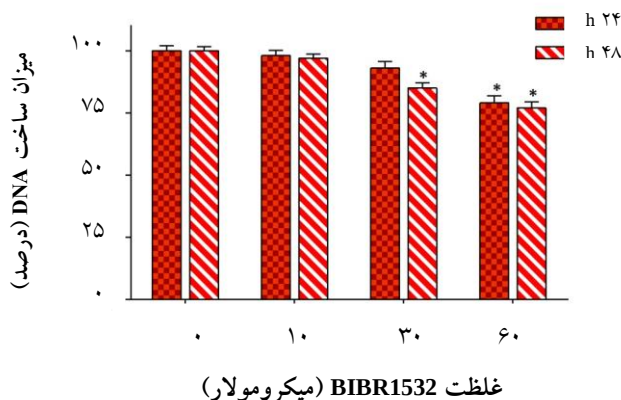
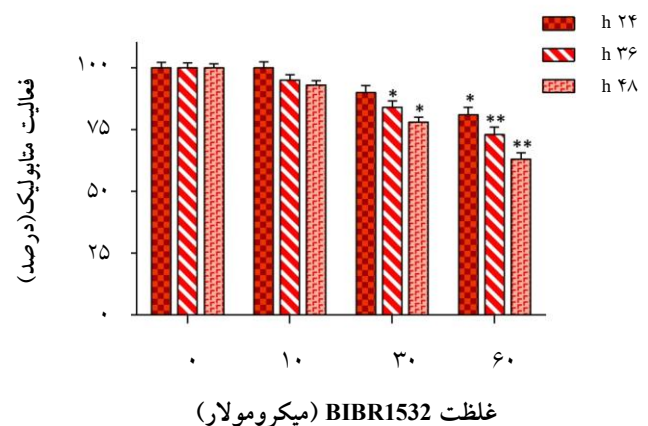
اندازه‌گیری کمی بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR:

آزمایش Real-time PCR در دستگاه Light-cycler (روش) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ μ L از SYBR Premix Ex Taq (تاکارا)، ۲ μ L از cDNA، ۰/۵ μ L از هریک از آغازگرها (۱۰ pmol) و ۷ μ L آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۵ چرخه برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. هم‌زمان HPRT (هایپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز) برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (جدول ۱).

بررسی فعالیت چرخه سلولی:

ابتدا تعداد 10^6 سلول به همراه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ FBS، در چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای ریخته شد. در ادامه، سلول‌ها با دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۶۰ میکرومولار از داروی BIBR1532 تیمار و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، سلول‌ها را با دور ۲۰۰۰ rpm/min سانتریفیوژ کرده و در محلول PBS معلق نمودیم. سپس سلول‌ها به وسیله اتانول ۷۰٪ تثبیت شدند و در ادامه پس از افزودن ۱ mL محلول PI master mix که حاوی ۹۵۰ μ L از PBS و ۴۰ μ L از معرف PI

تشدید می‌شود. غلظت $10 \mu M$ دارو اثر چشمگیری در کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های Nalm-6 ندارد، این در حالی است که دوز $30 \mu M$ از دارو طی مدت زمان ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب این شاخص را به 90% ، 84% و 78% کاهش می‌دهد (نمودار ۱). هم چنین با افزایش غلظت دارو به $60 \mu M$ شاهد کاهش بیشتر فعالیت متابولیک به ترتیب به میزان 81% ، 73% و 63% در زمان‌های ذکر شده بودیم. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که داروی BIBR1532 هم به طور وابسته به دوز و هم به طور وابسته به زمان سبب مهار فعالیت متابولیکی سلول‌های Nalm-6 می‌شود.



نمودار ۲: اثر داروی BIBR1532 بر روی ساخت DNA در رده سلولی Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌های Nalm-6 در تعداد ۵۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ای تحت تأثیر مقادیر مختلف BIBR1532 قرار گرفته و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($mean \pm SD$) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر $p < 0.05$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

نمودار ۱: بررسی اثر BIBR1532 بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌های Nalm-6 در تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ای تحت تأثیر مقادیر مختلف BIBR1532 قرار گرفته و به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($mean \pm SD$) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر $p < 0.05$ و **، بیانگر $p < 0.01$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

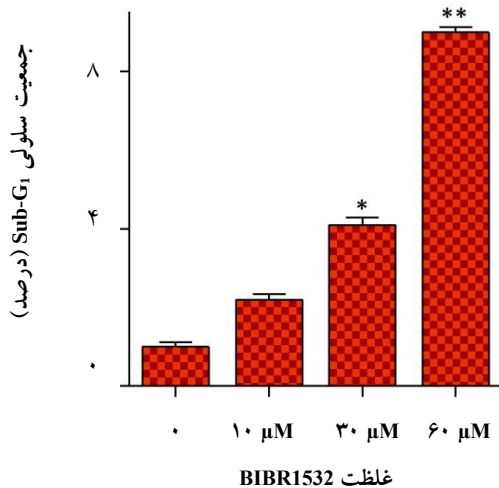
BIBR1532 موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش جمعیت سلولی در Sub- G_1 می‌شود:

برای تعیین این که آیا اثر مهار داروی BIBR1532 می‌تواند منسوب به تغییرات در چرخه سلولی باشد، سلول‌های Nalm-6 با دوزهای $10 \mu M$ ، $30 \mu M$ و $60 \mu M$ برای ۲۴ ساعت تیمار داده شده و با استفاده از روش

BIBR1532 به طور وابسته به دوز و زمان سبب کاهش ساخت DNA می‌شود:

به منظور بررسی اثر آنتی‌پرولیفراتیو داروی BIBR1532 بر روی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6، از آزمون BrdU استفاده شد. طی بررسی‌های وابسته به دوز در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با

BIBR1532 در رده سلولی Nalm-6 احتمالاً از طریق فعال کردن مسیر آپوپتوتیک می‌باشد.

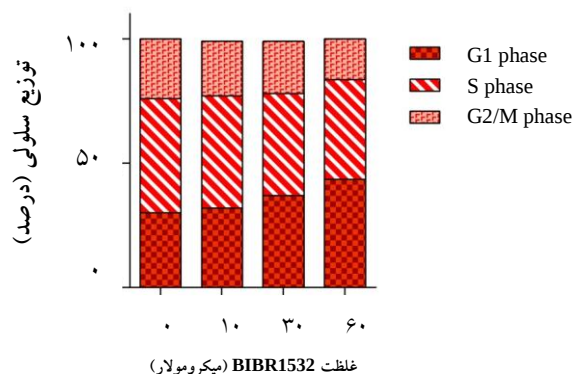


نمودار ۴: BIBR1532 جمعیت سلولی Sub-G1 را افزایش می‌دهد. افزایش این پیک به منزله افزایش آپپتوز در سلول‌ها تلقی شده و می‌توان نتیجه گرفت که داروی BIBR1532 به طور وابسته به دوز سبب القاء آپپتوز در سلول‌های Nalm-6 می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر $p < 0.05$ و **، بیانگر $p < 0.01$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

با افزایش غلظت BIBR1532 میزان رونویسی از ژن‌های پروآپوپتوتیک *Bax*، *Bad*، *p73* و *p21* افزایش می‌یابد:

به منظور آن که بدانیم آیا اثر سایتوتوکسیک دارو از طریق فعال شدن مسیر آپپتوز رخ می‌دهد، میزان فعالیت رونویسی برخی از ژن‌های پروآپوپتوتیک مهم هم چون *Bax*، *Bad*، *p73* و *p21* اندازه‌گیری شد. تیمار سلول‌های Nalm-6 با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میکرومولار BIBR1532 طی مدت زمان ۲۴ ساعت، به طور چشمگیری سبب افزایش بیان mRNA ژن‌های *p21*، *p73* و *Bax* می‌شود (نمودار ۵). نتایج حاصل نشان داد که غلظت ۶۰ میکرومولار دارو سبب افزایش ۵ برابری رونویسی از ژن *p21* و هم چنین افزایش تقریباً ۴/۵ برابری mRNA ژن‌های *Bax* و *p73* شد. با توجه به نتایج داده‌ها می‌توان نتیجه

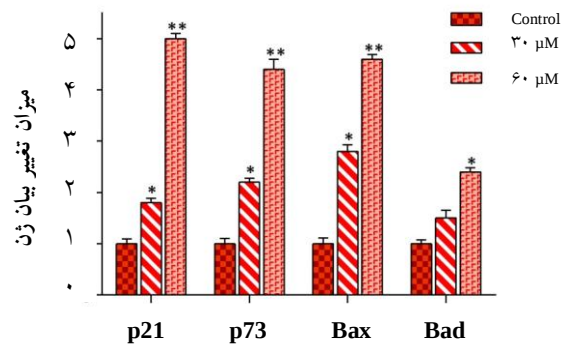
فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که در سلول‌های Nalm-6 افزایش غلظت BIBR1532 موجب افزایش مختصر درصد سلول‌ها در مرحله G_1 می‌شود (نمودار ۳). بدین ترتیب که درصد سلول‌ها در مرحله G_1 در گروه کنترل ۳۰٪ و در دوزهای ۱۰ μM، ۳۰ μM و ۶۰ μM طی تیمار ۲۴ ساعته به ترتیب ۳۲٪، ۳۷٪ و ۴۳٪ می‌باشد. هم چنین، نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که دوز ۶۰ μM از دارو سبب کاهش معنادار جمعیت سلولی در مرحله G_2/M نیز می‌شود؛ به طوری که تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با کاهش ۵۰ درصدی سلول‌های این مرحله نسبت به جمعیت سلولی فاز G_2/M در گروه کنترل همراه می‌باشد.



نمودار ۳: BIBR1532 سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و کاهش جمعیت سلولی G_2/M می‌شود. افزایش درصد سلول‌های Nalm-6 در مرحله G_1 و هم چنین کاهش معنادار جمعیت سلول‌های مرحله G_2/M طی تیمار ۲۴ ساعته با داروی BIBR1532 نشان‌دهنده اعمال اثر مهاري دارو در الگوی چرخه سلولی می‌باشد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر $p < 0.05$ و **، بیانگر $p < 0.01$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

علاوه بر این، درصد سلول‌های وارد شده به مرحله Sub- G_1 که بیانگر سلول‌های آپپتوتیک است نیز به طور قابل توجه و آن هم به طور وابسته به دوز افزایش یافته است (نمودار ۴). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که اثرات مهاري اعمال شده توسط داروی

گرفت که داروی BIBR1532 به طور وابسته به دوز سبب افزایش بیان ژنهای پروآپتوتیک می شود.



نمودار ۵: افزایش میزان رونویسی از ژنهای پروآپتوتیک Bad ، p21 و p73 ، Bax طی تیمار با BIBR1532 سلولهای Nalm-6 با دوزهای معین از BIBR1532 (30 μM و 60 μM) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. در ادامه و بعد از استخراج RNA و ساخت cDNA ، میزان بیان mRNA هر یک از ژنها با استفاده از روش RQ-RT-PCR اندازه گیری شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر $p < 0.05$ و **، بیانگر $p < 0.01$) نشان دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث

مطالعه ها نشان داده است که p73 می تواند به ژنهای هدف p53 متصل شده و به واسطه فعال کردن برخی ژنهای پروآپتوتیک هدف مثل Bax و p21 ، سبب افزایش مرگ برنامه ریزی شده در سلول شود (۱۴). هم چنین مشخص شده است که p21 خود نیز به عنوان یک کیناز مهارگر وابسته به چرخه سلولی، در هنگام القاء آسیب به DNA سلول افزایش یافته و سبب مهار چرخه سلولی در مرحله G₁ می شود (۱۶، ۱۵). با توجه به این نکته که تکثیر نامحدود سلولها، که عمدتاً از طریق حفظ طول تلومر اتفاق می افتد، مشخصه اصلی بسیاری از سرطانها است، لذا امروزه هدف قرار دادن مکانیسم های مسئول حفظ طول تلومر به عنوان یک هدف درمانی خاص مورد توجه وافر قرار گرفته است (۵). در این مطالعه و برای ارزیابی اثر BIBR1532 در لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) و هم چنین جهت درک مکانیسم دقیقی از

سایتوتوکسیسیتی این دارو، سلولهای Nalm-6 مشتق از pre-B ALL با غلظتهای مختلف از این مهارکننده تیمار شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که بر خلاف دوز پایین دارو (10 μM) که طی گذشت مدت زمان کوتاه قادر به مهار رشد و کاهش درصد زنده مانده سلولها نمی باشد، دوزهای بالای دارو (≤ 30 میکرومولار) قادرند بر روی درصد زنده مانده و هم چنین قدرت تکثیر سلولها تاثیر مهاری قابل ملاحظه ای بگذارند. مطالعه ها نشان داده اند که مهار تلومراز با استفاده از داروی BIBR1532 در بسیاری از سلولهای سرطانی هم چون پستان، ریه، کندروسارکوما و لوسمی پرومیلوسیتیک حاد منجر به کاهش طول تلومر و القاء مرگ سلولی می شود (۲۱-۱۷). ال دالی و همکارانش نیز مشخص کردند که اگر چه BIBR1532 دارای اثر آنتی پرولیفراتیو بر روی سلولهای بیماران مبتلا به AML و CLL و همین طور سلولهای مشتق شده از این بیماریها می باشد، اما بر روی سلولهای طبیعی هماتوپوئیک هیچ اثر سایتوتوکسیکی نداشت (۱۲).

نتایج حاصل از این مطالعه هم چنین نشان داد که BIBR1532 می تواند الگوی چرخه سلولی را در رده سلولی Nalm-6 تغییر دهد؛ بدین ترتیب که افزایش جمعیت سلولی در فاز Sub-G₁ متعاقب تیمار سلولها، بیانگر القاء آپوپتوز و کاهش سلولهای G₂/M تأییدی بر اثر آنتی پرولیفراتیو دارو می باشد. شی و همکاران نیز نشان دادند که استفاده هم زمان از داروی BIBR1532 و Paclitaxel سبب افزایش آپوپتوز و کاهش پرولیفراسیون در سلولهای سرطانی سینه می شود؛ با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده شد که استفاده از BIBR1532 در سرطان سینه سبب القاء آپوپتوز از طریق مهار تلومر و توقف چرخه سلولی در مرحله G₁ (مستقل از وضعیت ER ، HER-2 و p53) می شود (۱۳). هم چنین طی مطالعه های صورت گرفته بر روی سلولهای سرطانی اندومترال مشخص شده است که این مهار کننده سبب القاء آپوپتوز و جلوگیری از متاستاز این سلولها نیز می شود (۲۲).

در مواقعی که آسیب DNA شدید باشد، سلول آسیب

آمده در این مطالعه، پارک نشان داد که استفاده از داروی BIBR1532 در سلول‌های مقاوم به سیس‌پلاتین سبب مهار hTERT و در نتیجه افزایش بیان Bax، آزاد شدن سیتوکروم C و در نهایت آپوپتوز می‌شود (۲۴).

نتیجه‌گیری

با انجام این مطالعه مشخص شد داروی BIBR1532 سبب مهار فعالیت متابولیک و ساخت DNA به طور وابسته به دوز و زمان در سلول‌های Nalm-6 می‌شود. هم چنین این دارو باعث افزایش بیان ژن‌های $p21$ و $p73$ و متعاقب آن افزایش جمعیت سلولی در مرحله G_1 و کاهش درصد سلولی در مرحله G_2/M می‌شود. به علاوه جمعیت سلولی در پیک $Sub-G_1$ که نشان‌دهنده آپوپتوز است، نیز افزایش یافت که این یافته با افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک Bax و Bad تأیید شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، می‌توان به افزوده شدن داروهای مبتنی بر استراتژی آنتی‌تومورال به رژیم درمانی بیماران لوسمیک به عنوان راهکار درمانی امیدبخش امیدوار بود.

دیده از طریق راه‌اندازی مسیر آپوپتوز خود را تخریب می‌کند. تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد $p73$ که از جمله اعضاء خانواده $p53$ می‌باشد، دارای نقش کلیدی در فعال کردن مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌باشد (۱۵). در واقع، متعاقب بروز آسیب DNA، فاکتور رونویسی $p73$ می‌تواند با اتصال به DNA برخی از ژن‌های پروآپوپتوتیک هم چون Bax و $p21$ سبب فعال شدن مسیر آپوپتوتیک در سلول شود (۱۵، ۱۰). به علاوه گزارش شده است که $p73$ می‌تواند با محدود کردن میزان رونویسی از ژن hTERT منجر به مهار فعالیت آنزیم تلومراس نیز گردد (۱۶، ۱۴). هم چنین $p21$ نیز که یک فاکتور رونویسی شناخته شده وابسته به $p53$ می‌باشد، می‌تواند با القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و یا القاء آپوپتوز، مقدمات مربوط به ترمیم DNA و یا تخریب سلول آسیب‌دیده را فراهم آورد (۲۳). مطابق با مطالب اشاره شده، نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز حاکی از این است که توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش مقدار DNA در $Sub-G_1$ با افزایش رونویسی از ژن پروتئین‌های پروآپوپتوتیک هم چون $p73$ ، $p21$ ، Bax و Bad همراه می‌باشد. مشابه با نتایج به دست

References :

- Braoudaki M, Lambrou GI, Vougas K, Karamolegou K, Tsangaris GT, Tzortzatou-Stathopoulou F. Protein biomarkers distinguish between high-and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 52.
- Stankovic T, Marston E. Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Srp Arh Celok Lek* 2008; 136(3-4): 187-92.
- Goto H. Childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: Biology and recent treatment progress. *Pediatr Int* 2015; 57(6): 1059-66.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
- Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clin Cancer Res* 2007; 13(17): 4960-3.
- Mason M, Schuller A, Skordalakes E. Telomerase structure function. *Curr Opin Struct Biol* 2011; 21(1): 92-100.
- Barma DK, Elayadi A, Falck JR, Corey DR. Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13(7): 1333-6.
- Bashash D, Ghaffari SH, Mirzaee R, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase inhibition by non-nucleosidic compound BIBR1532 causes rapid cell death in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2013; 54(3): 561-8.
- Sumi M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Gotoh A, Shin-Ya K, et al. A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *Int J Oncol* 2004; 24(6): 1481-8.
- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hanel N, Kauffmann I, Priepke H, et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J* 2001; 20(24): 6958-68.
- Shay JW, Keith WN. Targeting telomerase for cancer therapeutics. *Br J Cancer* 2008; 98(4): 677-83.
- El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, Pantic M, Waller CF, Martens UM. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood* 2005; 105(4): 1742-9.
- Shi Y, Sun L, Chen G, Zheng D, Li L, Wei W. A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines. *Target Oncol* 2015; 10(4): 565-73.
- Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, et al. $p73$ Induces apoptosis via

- PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 8076-83.
- 15- John K, Alla V, Meier C, Pützer BM. GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria. *Cell Death Differ* 2011; 18(5): 874-86.
 - 16- Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Stiewe T. Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. *Oncogene* 2006; 25(6): 813-26.
 - 17- Wardi L, Alaaeddine N, Raad I, Sarkis R, Serhal R, Khalil C, *et al.* Glucose restriction decreases telomerase activity and enhances its inhibitor response on breast cancer cells: possible extra-telomerase role of BIBR 1532. *Cancer Cell Int* 2014; 14: 60.
 - 18- Liu W, Yin Y, Wang J, Shi B, Zhang L, Qian D, *et al.* Kras mutations increase telomerase activity and targeting telomerase is a promising therapeutic strategy for Kras-mutant NSCLC. *Oncotarget* 2016 Jun 18. [Epub ahead of print]
 - 19- Pantic M, Zimmermann S, Waller CF, Martens UM. The level of telomere dysfunction determines the efficacy of telomerase-based therapeutics in a lung cancer cell line. *Int J Oncol* 2005; 26(5): 1227-32.
 - 20- Parsch D, Brassat U, Brümmendorf TH, Fellenberg J. Consequences of telomerase inhibition by BIBR1532 on proliferation and chemosensitivity of chondrosarcoma cell lines. *Cancer Invest* 2008; 26(6): 590-6.
 - 21- Bashash D, Ghaffari SH, Kazerani M, Hezaveh K, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Time-Dependent Inhibitory Effect of Non-Nucleosidic Telomerase Inhibitor on NB4 Cell Proliferation through Transcriptional Suppression of Catalytic Subunit. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2014; 10(4): 335-46 . [Article in Farsi]
 - 22- Kong W, Lv N, Wysham WZ, Roque DR, Zhang T, Jiao S, *et al.* Knockdown of hTERT and Treatment with BIBR1532 Inhibit Cell Proliferation and Invasion in Endometrial Cancer Cells. *J Cancer* 2015; 6(12): 1337-45.
 - 23- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75(4): 805-16.
 - 24- Park YP, Kim KD, Kang SH, Yoon DY, Park JW, Kim JW, *et al.* Human telomerase reverse transcriptase (hTERT): a target molecule for the treatment of cisplatin-resistant tumors. *Korean J Lab Med* 2008; 28(6): 430-7.

Original Article

Induction of G₁ Cell Cycle Arrest and Increased Sub-G₁ Population upon Treatment of Nalm-6 Cells with Synthetic Inhibitor of hTERT

Zareii M.¹, Bashash D.¹

¹Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

As the role of telomerase in unlimited proliferation is a common feature of the majority of human cancers including hematological malignancies, thus inhibition of this enzyme has been proposed as a novel strategy in cancer therapeutics. This study was performed to investigate the effect of BIBR1532, a synthetic inhibitor of hTERT, on metabolic activity, DNA synthesis rate, cell cycle activity, and expression of pro-apoptotic genes such as p21, p73, Bax, and Bad in Nalm-6 pre-B ALL cells.

Materials and Methods

In an experimental study, to investigate the effect of BIBR1532, Nalm-6 leukemic cells were cultured in the presence of various concentrations of the inhibitor and consequently MTT assay, BrdU cell proliferation assay, flowcytometric cell cycle analysis, and quantitative real-time PCR were applied.

Results

Our results revealed that BIBR1532 induces an inhibitory effect on metabolic activity and DNA synthesis rate of Nalm-6 cells in a dose- and time-dependent manner. Moreover, we found that BIBR1532 exerts an inductive effect on mRNA expression level of Bax, Bad, p73, and p21, which in turn leads to G₁ cell cycle arrest and increased sub-G₁ cell population.

Conclusions

Since treatment with BIBR1532 could arrest the cell cycle activity in Nalm-6 cells and activate cellular apoptotic pathway, anti-telomerase-based therapy may be regarded as a novel promising strategy for ALL treatment.

Key words: Acute Lymphoid Leukemia, BIBR1532, Telomerase

Received: 3 Feb 2016

Accepted: 7 Sep 2016

Correspondence: Bashash D., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
Postal Code: 1971653312, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22721150
E-mail: david_5980@yahoo.com