خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۴ زمستان ۹۲ (۳۴۶-۳۳۵)

مقاله پژوهشی

مهار تکثیر سلول‌های NB4 به طور وابسته به زمان تحت تاثیر مهارکننده غیر نوکلئوتیدی تلومراز از طریق کاهش رونویسی زیر واحد کاتالیتیک

داود بشاش[۱]، سید حمیداله غفاری[۲]، مریم کازرانی[۳]، کبریا هزاوه[۴]، کامران علی مقدم[۴]، اردشیر قوام‌زاده[۴]

چکیده

سابقه و هدف

به دلیل فعالیت تلومراز در تکثیر نامحدود اکثر سلول‌های سرطانی از جمله بدخیمی‌های خونی مانند لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد(APL)، مهار تلومراز روش مناسبی جهت درمان می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثر BIBR1532 ، مهارکننده غیرنوکلئوزیدیکی، بر روی مهار تکثیر سلولی و بیان ژن hTERT که به عنوان جزء اصلی در فعالیت تلومراز نقش دارد، پرداختیم.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، به منظور بررسی اثر BIBR1532 ، سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلفی از دارو کشت داده شدند و آزمون‌های Trypan blue exclusion assay، BrdU cell proliferation assay و Quantitative real-time PCR جهت بررسی اثر دارو بر درصد زنده‌مانی، تکثیر سلولی و بیان mRNA ژن hTERT در زمان‌های متفاوت صورت گرفت.

یافته‌ها

BIBR1532 قادر به کاهش درصد زنده‌مانی و مهار تکثیر سلول‌ها می‌باشد. تیمار سلول‌ها با BIBR1532 در غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میکرومولار پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به صورت وابسته به دوز و زمان منجر به کاهش میزان ساخت DNA سلول‌ها گردید. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که داروی BIBR1532 همراه با افزایش غلظت دارو و زمان تیمار سلول‌ها به طور قابل توجهی منجر به کاهش میزان mRNA ژن hTERT می‌گردد.

نتیجه گیری

با توجه به طول تلومر کوتاه و فعالیت بالای آنزیم تلومراز در بیماران APL و هم‌چنین اثر بخشی داروی BIBR1532 در القای اثر آنتی پرولیفراتیو در رده سلولی NB4 ، می‌توان درمان‌های مبتنی بر استراتژی آنتی‌تلومرازی را به عنوان راه‌کار درمانی مناسب در بیماران APL مد نظر قرار داد.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتی حاد، BIBR1532 ، تلومراز

تاریخ دریافت : ۹۱/۶/ ۴
تاریخ پذیرش : ۹۱/۸/۳۰

۱- PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ کارگر شمالی ـ تهران ـ ایران ـ کدپستی: ۱۴۱۱۱
۳- کارشناس ارشد خون‌شناسی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ بیمارستان شریعتی ـ تهران ـ ایران
۴- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد(APL)، یکی از زیر گروه‌های AML (AML-M3) می‌باشد. APL معمولاً در سنین ۵۰-۴۰ سالگی رخ داده و حدود ۱۵٪-۱۰٪ انواع AML را به خود اختصاص می‌دهد(۱). این بیماری در اثر نقص در بلوغ گلبول‌های سفید در رده میلوئیدی به وجود می‌آید که طی آن روند بلوغ در سلول‌های رده گرانولوسیتی در مرحله پرومیلوسیت متوقف می‌شود. تقریباً ۹۵٪ از بیماران مبتلا به APL دارای جابه‌جایی بین کروموزوم ۱۵ و۱۷ هستند[(۲۲ : ۱۲)q(۱۵:۱۷)t] که منجر به الحاق ژن RARα (ژن کدکننده گیرنده رتینوئیک اسید) با ژن PML می‌گردد(۲). به دلیل انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC) که ظاهراً ناشی از آزاد شدن مواد پیش انعقادی از گرانول‌های سلول‌های لوسمیک است، مشکلات خونریزی در این بیماری شایع بوده و از جمله علل اصلی مرگ و میر این بیماران محسوب می‌شود(۳). در سال ۱۹۸۵ معرفی ATRA که مشتقی از ویتامین A است، افقی جدید در تاریخچه درمان APL گشود و از میزان مرگ و میر بیماری به طور قابل توجهی کاست. با این حال و علی‌رغم اثر بخشی این دارو در درمان APL، درصدی از بیماران دچار عود شده و در نهایت به مرگ بیمار منجر می‌شود(۴).

علی‌رغم این حقیقت که ماهیت بالینی سرطان بسیار متنوع است، اما اکثر تومورها در تعداد محدودی از ویژگی‌ها هم چون توانایی تکثیر نامحدود، رشد غیر قابل کنترل، تهاجم به بافت‌ها و انتشار متاستاتیک مشترک می‌باشند(۵). مطالعه‌های انجام شده طی دو دهه گذشته نشان داده است که کسب توانایی تکثیر نامحدود که با حفظ طول تلومر مرتبط است، مهم‌ترین مرحله در ایجاد سرطان می‌باشد(۶). هم چنین مشخص شده است که مهم‌ترین مکانیسم برای غلبه بر محدودیت تکثیر ناشی از کوتاه شدن طول تلومر، فعال شدن آنزیمی به نام تلومراز است که افزایش فعالیت آن در بیش از ۸۵٪ بدخیمی‌های انسان گزارش شده است(۷). تلومراز آنزیمی است که از یک جزء RNA به نام hTERC و یک جزء کاتالیتیک تحت عنوان hTERT تشکیل شده است(۸). مشخص شده است که فعالیت تلومراز طی روند بلوغ و تکامل عمدتاً از طریق رونویسی ژن hTERT تنظیم می‌شود(۹). از آن‌جایی که اکثر سلول‌های سوماتیک hTERT را بیان نمی‌کنند، فاقد فعالیت تلومراز می‌باشند؛ از سوی دیگر، اکثریت سلول‌های سرطانی hTERT را بیان کرده و تلومراز مثبت می‌باشند(۹). با توجه به این امر، تلومراز و به ویژه hTERT ، به عنوان اهداف درمانی بسیار امیدوارکننده جهت درمان سرطان‌ها معرفی شده و اخیراً مهارکنندگان تلومراز به عنوان راه‌کارهای درمانی جدید، مورد توجه شایان قرار گرفته‌اند. در میان این دسته از داروها، BIBR1532 که یک مهارکننده غیرنوکلئوزیدی - غیرپپتیدی است، افق بسیار روشنی در درمان سرطان‌ها گشوده است(۱۰).

این دارو به طور اختصاصی موجب مهار آنزیم تلومراز می‌شود و بر روی آنزیم‌های DNA پلی‌مراز، RNA پلی‌مراز و هم چنین سایر اعضای آنزیم‌های ترانس کریپتاز معکوس بی‌تاثیر است. این ترکیب، یک مهارکننده غیر رقابتی آنزیم تلومراز محسوب می‌شود؛ به این ترتیب که محل اتصال دارو متمایز از محل داکسی ریبو نوکلئوتیدها و آغازگر است(۱۱). در واقع BIBR1532 به محل کاتالیتیک آنزیم متصل نمی‌شود و همین امر آن را از سایر مهارکننده‌ها از جمله ترکیبات نوکلئوزیدیک و یا الیگونوکلئوتیدی متمایز می‌سازد(۱۲).

تاکنون بررسی‌های گوناگونی در مورد تاثیر این ترکیب بر روی سلول‌های سرطانی مختلف صورت گرفته و نشان داده شده است که BIBR1532 موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی ریه، سینه، فیبروسارکوما و پروستات می‌شود(۱۰).

این دارو دارای اثرات وابسته به دوز بوده و سرعت و اثر آن به طول اولیه تلومر در سلول سرطانی بستگی دارد. با توجه به آن که تقریباً ۹۰٪ بیماران مبتلا به APL دارای تلومرهایی با طول کوتاه و فعالیت تلومراز بالا می باشند، لذا به نظر می‌رسد این بیماران کاندید مناسب برای درمان با مهارکنندگان تلومراز باشند(۱۳). به این منظور و برای بررسی کارآیی استفاده از استراتژی آنتی‌تلومراز در بیماری APL، سلول‌های رده NB4 با غلظت‌های متفاوت از داروی BIBR1532 تیمار شدند و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (رده سلولی انسانی APL) به صورت سوسپانسیون در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ mM از L -گلوتامین ، ۱۰٪ FBS ، پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ unit/mL و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ µg/mL در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ از CO_2 کشت داده شدند. سلول‌های NB4 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد و برای بررسی حضور t(۱۵ ;۱۷) با روش استاندارد کاریوتایپینگ انجام شد. هم چنین این رده سلولی برای حضور mRNA ژن ترکیبی PML/RARα نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

تیمار دارویی با BIBR1532 :

برای تیمار دارویی سلول‌ها، از داروی BIBR1532 (آمریکا، بیوساینس) که به صورت پودر می‌باشد، استفاده شد. محلول ذخیره BIBR1532 در غلظت ۱ mM و به واسطه حل کردن این دارو در DMSO استریل ۰/۱٪ تهیه شد. محلول ذخیره BIBR1532 را در میکروتیوب‌ها تقسیم کرده و آن‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری کردیم. به منظور تعیین اثرات بهینه دارو، ۲ متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی، با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میکرومولار از داروی BIBR1532 تیمار شدند و به ترتیب پس از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. در ضمن به منظور افزایش بهره‌وری کار و بررسی مقایسه‌ای، تمامی آزمایش‌ها برای هر دوز و زمان به صورت داپلیکیت انجام شد.

تعیین درصد زنده بودن و بررسی منحنی رشد لگاریتمی سلول‌ها:

برای بررسی اثر مهاری داروی BIBR1532 بر روی شاخص زنده مانی و منحنی رشد لگاریتمی سلول‌ها، سلول‌های NB4 به تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول در هر mL در حضور یا عدم حضور داروی BIBR1532 انکوبه شده و به مدت ۱۰روز نگهداری شدند. سلول‌ها هر سه روز یک بار پاساژ داده شده و مجدداً تیمار می‌شدند. به طور پیوسته، هر ۲۴ ساعت شاخص زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بررسی شد. برای انجام آزمایش، در شرایط استریل میزان ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را برداشته و داخل یک میکروتیوب ریختیم. سپس هم حجم آن تریپان‌بلو اضافه کرده و پس از گذشت چند دقیقه یک قطره از آن را برداشته و با استفاده از لام نئوبار و در خانه‌های مربوط به شمارش گلبول سفید شمارش انجام شد(ضریب رقت ۲ می‌باشد). در ادامه، با شمارش سلول‌های مرده و با استفاده از فرمول زیر درصد زنده بودن سلول‌ها تعیین گردید.

$$\text{درصد زنده بودن سلول‌ها} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{مجموع سلول‌های زنده و مرده}} \times ۱۰۰$$

بررسی میزان ساخت DNA و درصد تکثیر سلولی:

اثر مهاری BIBR1532 بر روی تکثیر سلول‌های NB4 از طریق تعیین میزان مشارکت برمو داکسی یوریدین در DNA سلول‌های NB4 با استفاده از BrdU-based cell proliferation ELISA kit طبق دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک درون پلیت ۹۶ تایی در حضور یا عدم حضور داروی 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 گردید. سلول‌ها با آنتی‌بادی علیه BrdU که با آنزیم پراکسیداز کنژوگه می‌باشد، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و در انتهای این زمان، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB افزوده گردید. 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 الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰nm خوانده شد. برای محاسبه اثر مهاری داروی BIBR1532 بر روی تکثیر سلول‌های NB4 و بررسی میزان کاهش ساخت DNA سلول‌های تیمار شده، از فرمول زیر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

استفاده شد:

میزان مهار تکثیر (٪) = ۱ − $\frac{OD\ exp}{OD\ cont}$ × ۱۰۰

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

اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی:

در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر سایتوتوکسیک دارو بر توان متابولیک سلول، از روش MTT استفاده شد. پس از تیمار سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰^{۳} سلول به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گشت(هر سری به صورت سه تایی انجام شد). چاهکی که فقط حاوی محیط کشت فاقد سلول بود، به عنوان بلانک دستگاه الایزا ریدر و چاهک‌های شامل محیط کشت و سلول(بدون افزودن دارو) به عنوان کنترل زنده سلول به کار رفت. پلیت مورد آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ از CO_2 قرار گرفت. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده شده و پس از شیک به مدت ۵ دقیقه، پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد.

سپس پلیت را با دور g ۳۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم، پس از سانتریفوژ مایع رویی را دور ریخته و به رسوب ته پلیت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه کردیم. پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه، پلیت را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه نمودیم. سپس پلیت را جهت قرائت در دستگاه الایزا ریدر قرار داده و جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۵۷۰ نانومتر خواندیم.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

برای استخراج RNA از سلول‌های مورد مطالعه، از کیت High Pure RNA Isolation (رُوش) طبق دستورالعمل استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های NB4 با داروی BIBR1532 و متعاقب گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج شده و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانو دراپ ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از Revert Aid First Strand cDNA (Takara BIO) Synthesis Kit استفاده شد.

حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ میکرولیتر بود و محتویات آن شامل ۴µL بافر PCR 5X ، ۲µL از DNTP ، ۱µL راندم هگزامر، ۱µL آب تیمار شده با DEPC ، µL ۱ مهار کننده RNase (۲۰ U/µL)، ۱ µL ترانس کریپتاز معکوس M-MULV (۲۰۰ U/µL) و ۱ µg از RNA مورد آزمایش به ازاء 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 شدند و در نهایت، واکنش ساخت cDNA به واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۰ درجه پایان پذیرفت. cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام آزمون Real-time PCR :

آزمون Real-time PCR در دستگاه light cycler (رُوش) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازاء هر واکنش، ۱۰µL از SYBR Premix Ex Taq (تاکارا بیو)، ۲µL از محصول cDNA، ۰/۵ µL از هر یک از آغازگرها(۱۰ pmol) و ۷ µL 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 سیکل برای دناتوراسیون(۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد(جدول ۱).

آنالیز آماری:

برای انجام مطالعه‌های آماری از SPSS ۱۸ استفاده شد. اختلاف معنادار بین متغیرهای آزمایش با استفاده از آزمون student two tailed تعیین شد. مقادیر به دست آمده با $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون Real-time PCR

ژن	Accession number	آغازگر جلوبرنده ('۳-'۵)	آغازگر معکوس ('۳-'۵)	سایز(bp)
HPRT	NM-۰۰۰۱۹۴	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
hTERT	NM-۱۹۸۲۵۳	TGACACCTCACCTCACCCAC	CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC	۹۵

یافته‌ها

BIBR1532 به طور وابسته به دوز و زمان باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های NB4 می‌شود:

پس از کشت رده سلولی NB4 در حضور غلظت‌های مختلف دارو، درصد زنده‌مانی سلول‌ها جهت بررسی تاثیر دارو به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که داروی BIBR1532 بر روی سلول‌های NB4 دارای اثر مستقیم آنتی‌پرولیفراتیو وابسته به دوز و زمان می‌باشد؛ به طوری که درصد زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده در محیط کشت با افزایش غلظت دارو و در طول زمان در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده(کنترل) به طور قابل توجه کاهش یافت(نمودار ۱). تیمار سلول‌ها در حضور تمام غلظت‌های دارویی به غیر از غلظت ۱۰ میکرومولار در اثر گذشت زمان با کاهش زنده‌مانی سلول‌ها همراه بوده است(جدول ۲). کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از تیمار با دوز ۹۰ میکرومولار آغاز شده و تمامی سلول‌های تیمار شده با این غلظت دارویی در روز هفتم مرده بودند. همان گونه که در نمودار ۱ ارایه شده است، با افزایش غلظت دارو شاهد افزایش تاثیر آنتی‌پرولیفراتیو BIBR1532 علیه رده سلولی NB4 می‌باشیم؛ در این خصوص دوزهای ۶۰ و ۹۰ میکرومولار در روز ششم به ترتیب ۸۳٪ و ۹۵٪ زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش دادند، این در حالی است که تاثیر دوز ۳۰ میکرومولار کمتر بوده و با کاهش ۲۶ درصدی در این روز همراه بوده است. بررسی سلول‌ها تا روز دهم نشان می‌دهد که تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار بر روی زنده‌مانی سلول‌های NB4 تاثیر نداشته است.

مهار تکثیر سلولی و کاهش میزان ساخت DNA:

به منظور بررسی اثر آنتی پرولیفراتیو داروی BIBR1532 و تعیین اثربخشی آن بر روی تکثیر و ساخت DNA در رده سلولی NB4 ، آزمون BrdU انجام شد؛ در این آزمون، میزان مشارکت برمو داکسی یوریدین در DNA سلول‌های تیمار شده بیانگر میزان ساخت DNA در این سلول‌ها می‌باشد. طی بررسی‌های وابسته به دوز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مشخص گردید که داروی BIBR1532 هم به طور وابسته به دوز و هم وابسته به زمان قادر به مهار تکثیر سلول‌های NB4 است. غلظت ۱۰ µM دارو هیچ‌گونه اثری در مهار میزان ساخت DNA سلول‌ها نداشت، در حالی که در غلظت ۳۰µM، فعالیت تکثیر سلول‌ها در زمان‌های ذکر شده به ترتیب به ۹۶٪، ۸۳٪ و ۷۶٪ کاهش یافت(نمودار ۲). با افزایش غلظت دارو و مطالعه نتایج به دست آمده، مشخص شد که کاهش تکثیر و مهار ساخت DNA در غلظت‌های ۶۰ و ۹۰ میکرومولار بیشتر از غلظت ۳۰ میکرومولار بوده است؛ به گونه‌ای که میزان تکثیر سلول‌های NB4 تیمار شده به مدت ۷۲ ساعت با دوزهای ۶۰ و ۹۰ میکرومولار به ترتیب به ۵۵ و ۳۰ درصد کاهش پیدا کرد. نتایج به دست آمده نمایانگر مؤثر بودن داروی BIBR1532 در مهار رشد سلول‌های سرطانی APL بوده و با توجه به این نتایج می‌توان به این نکته پی برد که هر چه سلول‌ها زمان طولانی‌تری تحت تیمار با داروی BIBR1532 قرار گرفته باشند، میزان رشدشان کمتر می‌شود. هم چنین در دوزهای بالاتر ممانعت از رشد سلولی سریع‌تر و به میزان بیشتری صورت می‌گیرد.

BIBR1532 به طور وابسته به دوز و زمان باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 می‌شود:

در این مطالعه و به منظور بررسی اثر داروی BIBR1532 در مهار فعالیت متابولیک رده سلولی NB4 ، آزمایش MTT انجام شد. در طی بررسی‌های وابسته به دوز

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

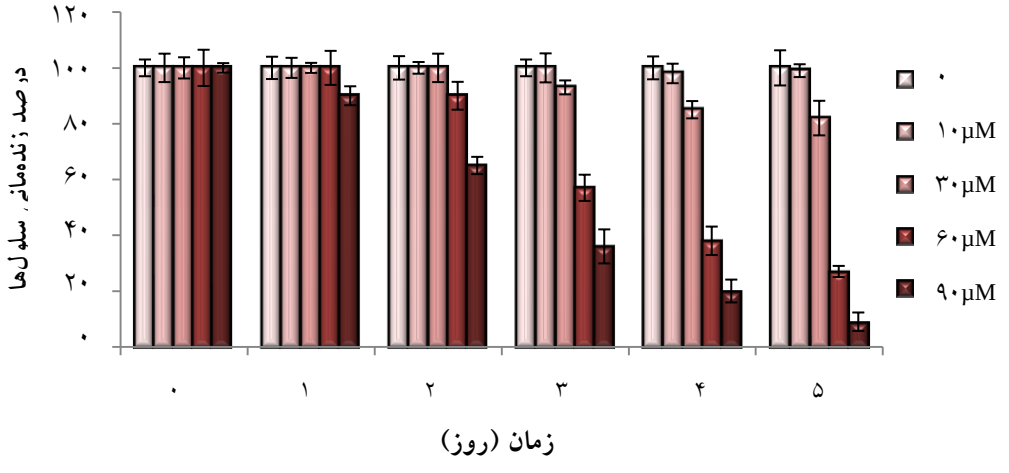
در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشخص گردید که داروی BIBR1532 قادر به مهار فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 می‌باشد. همان گونه که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، غلظت ۱۰ µM دارو هیچ گونه اثری در مهار فعالیت متابولیک سلول‌ها ندارد؛ در حالی که در غلظت ۳۰ µM دارو، فعالیت متابولیک سلول‌ها در زمان‌های ذکر شده به ترتیب به ۹۵/۶٪، ۸۸٪ و ۷۹٪ رسید. هم چنین تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۶۰ µM و ۹۰ µM دارو طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب سبب کسب فعالیت متابولیک ۸۹٪، ۷۵٪، ۵۱٪ و ۸۳٪، ۵۴٪ و ۲۷٪ گشت. نتایج حاصل از آزمایش MTT مؤید آن است که داروی BIBR1532 به طور وابسته به دوز و زمان باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 می‌شود.

کاهش رونویسی ژن hTERT به طور وابسته به دوز و زمان طی تیمار سلول‌های NB4 با داروی BIBR1532:

مشخص شده است که فعالیت تلومراز طی روند بلوغ و تکامل عمدتاً از طریق رونویسی ژن hTERT تنظیم

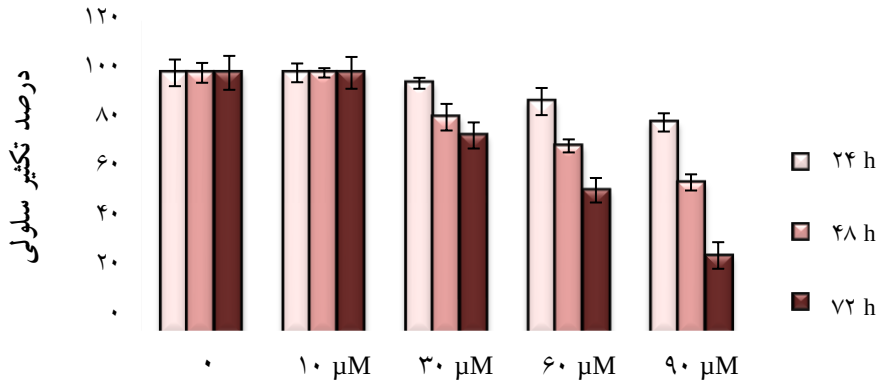
جدول ۲: نتایج درصد زنده مانی سلول‌ها بر حسب روز

دوز(µM) / زمان(روزها)	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
BIBR ۱۵۳۲ ۱۰ µM	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸	۹۹	۹۸	۹۹	۹۷	۹۹	۹۷
BIBR ۱۵۳۲ ۳۰ µM	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳	۸۵	۸۲	۷۴	۷۱	۶۵	۵۵	۴۳
BIBR ۱۵۳۲ ۶۰ µM	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۵۷	۳۸	۲۷	۱۷	۱۰	۰		
BIBR ۱۵۳۲ ۹۰ µM	۱۰۰	۹۰	۶۵	۳۶	۲۰	۹	۵	۰			

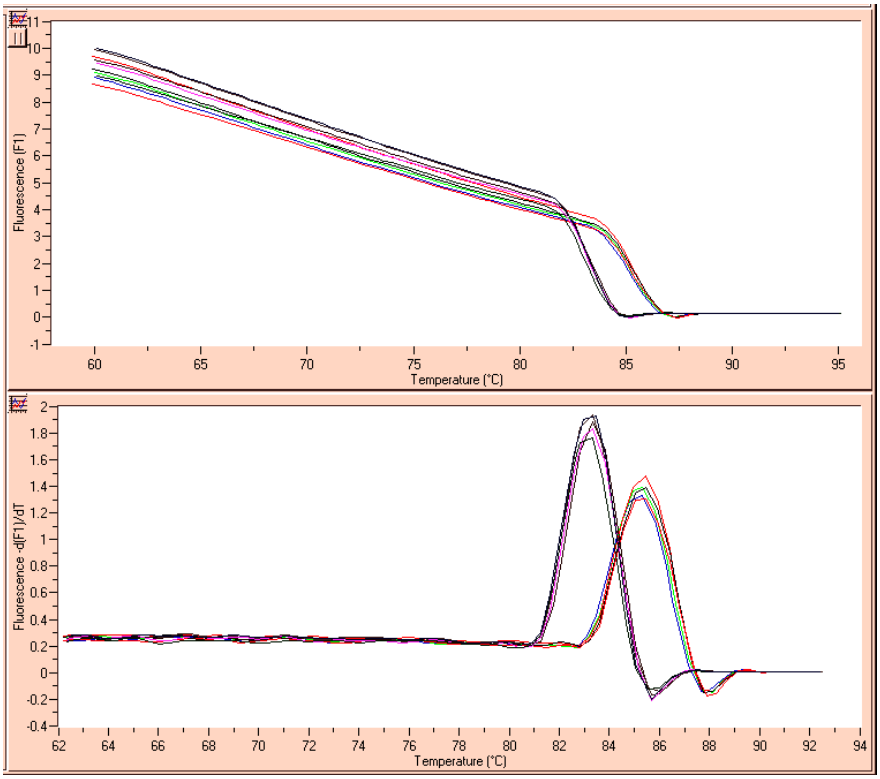


نمودار ۱: تاثیر داروی BIBR1532 بر روی درصد زنده‌مانی سلول‌های NB4 طی ۵ روز ابتدایی تیمار. کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از تیمار با دوز ۹۰ میکرومولار آغاز شده و تمامی سلول‌های تیمار شده با این غلظت دارویی در روز هفتم مرده بودند. با افزایش غلظت دارو شاهد افزایش تاثیر آنتی پرولیفراتیو BIBR1532 علیه رده سلولی NB4 می‌باشیم؛ در این خصوص دوزهای ۶۰ و ۹۰ میکرومولار در روز پنجم به ترتیب ۷۳٪ و ۹۱٪ زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش دادند، این در حالی است که تاثیر دوز ۳۰ میکرومولار کمتر بوده و با کاهش ۱۸ درصدی در این روز همراه بود. بررسی سلول‌ها نشان می‌دهد که تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار بر روی زنده‌مانی سلول‌های NB4 تاثیر نداشته است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

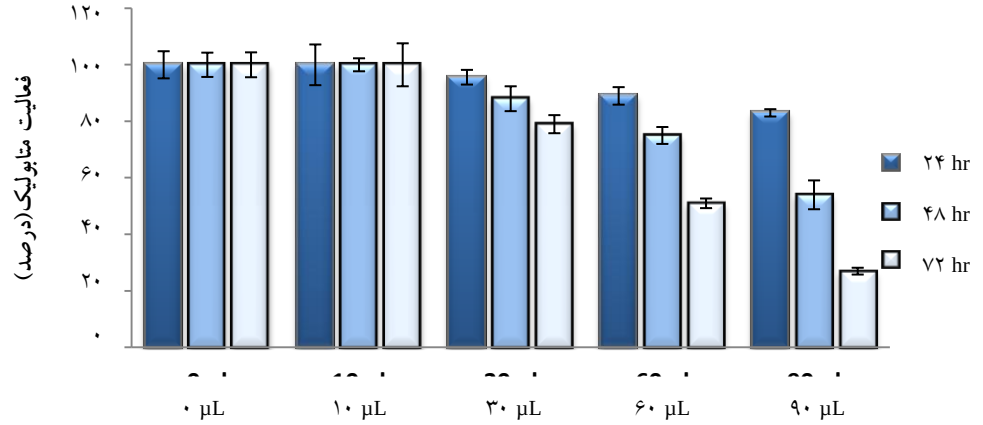


نمودار ۲: اثر داروی BIBR1532 بر میزان تکثیر سلول‌های NB4 به طور وابسته به دوز و زمان. غلظت µM ۱۰ دارو هیچ‌گونه اثری در مهار میزان ساخت DNA سلول‌ها ندارد، در حالی که در غلظت µM۳۰ ، فعالیت تکثیر سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به ۹۶٪، ۸۳٪ و ۷۶٪ کاهش یافت. با افزایش غلظت دارو و مطالعه نتایج به دست آمده مشخص شد که کاهش تکثیر و مهار ساخت DNA در غلظت‌های ۶۰ و ۹۰ میکرومولار بیشتر از غلظت ۳۰ میکرومولار بوده است؛ به گونه‌ای که میزان تکثیر سلول‌های NB4 تیمار شده به مدت ۷۲ ساعت با دوزهای ۶۰ و ۹۰ میکرومولار به ترتیب به ۵۵٪ و ۳۰٪ کاهش پیدا کرد.

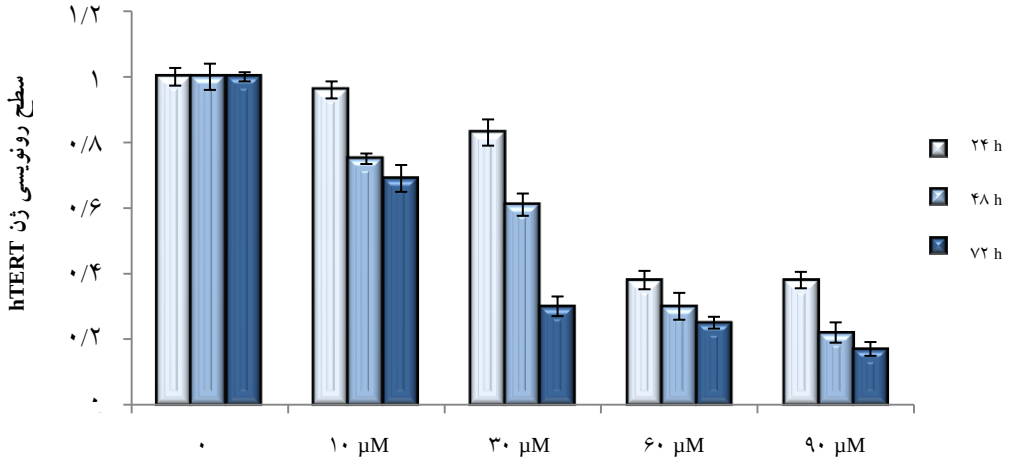


شکل ۱: منحنی ذوب ژن hTERT و HPRT . همین طور که مشاهده می‌شود در نمودارها پس از مشتق‌گیری منحنی درجه دومی به دست می‌آید که وجود پیک‌های ذوب با نقاط ماکزیمم واحد بر این موضوع دلالت دارد که رشته DNA تکثیر شده، به طور اختصاصی رشتهDNA ژن هدف hTERT و ژن مرجع HPRT می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]



نمودار ۴: اثر داروی BIBR1532 بر میزان فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به طور وابسته به دوز و زمان. غلظت µM ۱۰ دارو هیچ‌گونه اثری در مهار فعالیت متابولیک سلول‌ها ندارد؛ در حالی که در غلظت µM ۳۰ دارو، فعالیت متابولیک سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به ۹۵/۶٪، ۸۸٪ و ۷۹٪ رسید. هم چنین تیمار سلول‌ها با غلظت‌های µM ۶۰ و µM ۹۰ دارو طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب سبب کسب فعالیت متابولیک ۸۹٪، ۷۵٪، ۵۱٪ و ۸۳٪، ۵۴٪ و ۲۷٪ گشت.



نمودار ۴: اثر داروی BIBR1532 بر سطح رونویسی ژن hTERT به طور وابسته به دوز و زمان. نتایج به دست آمده از بررسی بیان ژن hTERT مبین این موضوع است که داروی BIBR1532 به طور وابسته به دوز در غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میکرومولار موجب کاهش رونویسی ژن hTERT شده است؛ همان طور که در این شکل آورده شده است، بیشترین کاهش در میان غلظت‌های متفاوت مربوط به تیمار سلولی با دوز ۹۰ میکرومولار می‌باشد. هم چنین، نتایج به دست آمده از آزمایش‌های وابسته به زمان بیانگر تاثیر گذشت زمان در تشدید کاهش میزان نسخه‌برداری از ژن hTERT می‌باشد؛ بدین ترتیب که حداکثر میزان کاهش در رونویسی زیر واحد کاتالیتیک تلومراز طی تیمار ۷۲ ساعته با دوز ۹۰ میکرومولار به دست آمد که با کاهش ۸۳ درصدی بیان ژن hTERT همراه بود.

می‌شود(۱۴). در این راستا و جهت بررسی اثر BIBR1532 بر رونویسی ژن hTERT (که مهم‌ترین عامل تنظیم‌کننده فعالیت تلومراز می‌باشد)، میزان بیان mRNA ژن hTERT در سلول‌های NB4 تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل به روش Real-Time RT-PCR ارزیابی گردید. بدین منظور، RNA مربوط به سلول‌های تحت تیمار با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

BIBR5132 و سلول‌های کنترل استخراج شد، cDNA های مربوطه ساخته و سپس تغییر در بیان ژن hTERT بررسی شد(از ژن HPRT به عنوان ژن مرجع استفاده گردید). از آن جایی که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد، با استفاده از منحنی ذوب اختصاصیت محصولات در فرآیند PCR مشخص گشت. آنالیز منحنی ذوب نشان می‌دهد که هیچ‌گونه آغازگر ـ دایمر و یا تکثیر DNA های اضافی وجود نداشته و رشته DNA تکثیر شده، به طور اختصاصی رشته DNA ژن هدف (hTERT) می‌باشد(شکل ۱). نتایج به دست آمده از بررسی بیان ژن hTERT مبین این موضوع است که داروی BIBR1532 به طور وابسته به دوز در غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میکرومولار به ترتیب موجب کاهش رونویسی ژن hTERT شده است(نمودار ۴). همانطور که در این شکل آورده شده است، بیشترین کاهش در میان غلظت‌های متفاوت مربوط به تیمار سلولی با دوز ۹۰ میکرومولار می‌باشد. هم چنین، نتایج به دست آمده از آزمایش‌های وابسته به زمان بیانگر تاثیر گذشت زمان در تشدید کاهش میزان نسخه‌برداری از ژن hTERT می‌باشد؛ بدین ترتیب حداکثر میزان کاهش در رونویسی زیر واحد کاتالیتیک تلومراز طی تیمار ۷۲ ساعته با دوز ۹۰ میکرومولار به دست آمد که با کاهش ۸۳ درصدی بیان ژن hTERT همراه بود.

بحث

سلول‌های توموری جهت حفظ طول تلومر و به دنبال آن حفظ توانایی تکثیر نامحدود خود، مکانیزم‌های مختلفی را در پیش می‌گیرند. یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌ها در این رابطه و به منظور غلبه بر ساعت تلومریک، فعال شدن مجدد و افزایش بیان آنزیم تلومراز است(۱۶، ۱۵). آنزیم تلومراز در اصل یک آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی است که در انسان از یک زیر واحد RNA به نام hTERC و یک زیر واحد پروتئینی تحت عنوان hTERT تشکیل شده است(۱۷). در بسیاری از سلول‌های سوماتیک فعالیت تلومرازی وجود ندارد و توالی‌های تلومری طی تقسیمات سلولی از بین می‌روند؛ این در حالی است که در حدود ۹۰٪ از سلول‌های سرطانی، فعالیت بالای تلومراز قابل شناسایی است و همین فعالیت بالا خود منجر به پایداری تلومرها و به دنبال آن توانایی تکثیر نامحدود و نامیرایی سلول‌های سرطانی می‌گردد(۱۸). با توجه به این که سلول‌های سرطانی جهت بقای خود وابسته به آنزیم تلومراز بوده و از سوی دیگر، hTERT به عنوان یک بخش کاتالیتیک کلیدی در تنظیم فعالیت تلومراز محسوب می‌شود، به همین دلیل در بسیاری از روش‌های درمانی ضد سرطان مبتنی بر تلومراز، زیر واحد hTERT مورد هدف قرار می‌گیرد(۱۹). در سال ۲۰۰۱ یک کلاس جدید از مهارکننده‌های غیرپپتیدیک – غیرنوکلئوزیدیک تلومراز توسط کمپانی Boehring Ingelheim معرفی شد که مهم‌ترین عضو این خانواده، داروی BIBR1532 می‌باشد(۱۰).

امروزه برای درمان APL از ATRA و به تازگی از آرسنیک استفاده می‌شود، اما با توجه به عود بیماران درمان شده با این راه‌کار درمانی، سعی بر آن است تا روش‌های درمانی جدیدی در مورد این بیماری مورد بررسی قرار گیرد(۲۰). همان گونه که پیشتر بیان شد، یکی از روش‌های درمانی مفید، هدف قرار دادن آنزیم تلومراز با استفاده از داروهای آنتی‌تلومراز است. اکثر داروهای آنتی‌تلومراز از جمله BIBR1532 دارای فاز تاخیری هستند. این خاصیت در مورد BIBR1532 زمانی مشخص شد که برای اولین بار سلول‌های تومورال رده سلولی زایا (GCT) تحت تاثیر BIBR1532 به همراه داروی ضد سرطان سیس پلاتین قرار گرفتند؛ نتایج این آزمایش‌ها نشان دادند که برای کوتاه شدن طول تلومر به ۳۰۰ روز زمان نیاز می‌باشد(۲۱). به همین دلیل به نظر می‌رسد که داروهای آنتی‌تلومرازی به دلیل دارا بودن فاز تاخیری و رابطه این فاز با طول اولیه تلومر و کوتاه شدن تدریجی آن در هر تقسیم سلولی (حدود ۲۰۰–۵۰bp در هر تقسیم سلولی)، بر روی سلول‌هایی که طول تلومر کوتاه‌تری دارند می‌توانند مؤثرتر عمل کنند. طی مطالعه‌ای که اخیراً در آزمایشگاه ما انجام شد، مشخص گشت که کوتاهی طول تلومر و بالا بودن فعالیت تلومراز، دو مشخصه مهم سلول‌های سرطانی APL می‌باشد(۱۳). هم چنین نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر ارتباط بین این دو ویژگی با میزان پیشرفت و عود بیماری

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

نیز بود. در این راستا و با توجه به نقش مهم آنزیم تلومراز در پیشرفت و عود این بیماری و هم چنین کوتاهی طول تلومر این بیماران، هدف قرار دادن آنزیم تلومراز با داروهای آنتی تلومراز هم چون BIBR1532 می‌تواند روشی مفید و مؤثر در درمان این بیماران باشد.

برای بررسی اثر بخشی درمان آنتی تلومراز در APL، سلول‌هایNB4 در مجاورت دوزهای مختلف BIBR1532 تیمار شدند. پس از انجام آزمایش‌ها، مشخص گردید که دوزهای بالای دارو(≤۳۰ میکرومولار) طی مدت کوتاه قادرند بر روی درصد زنده‌مانی و هم چنین قدرت تکثیر سلول‌ها تاثیر مهاری قابل ملاحظه‌ای بگذارند؛ این در حالی است که دوز پایین دارو(۱۰μM) طی گذشت مدت زمان کوتاه قادر به مهار رشد و کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های NB4 نمی‌باشد. در مطالعه ال- دالی و همکارانش نیز نتایج به همین ترتیب بود، به طوری که آن‌ها به بررسی اثر BIBR1532 بر روی رده‌های AML و CLL پرداختند و نشان دادند که BIBR1532 در غلظت‌های ۳۰-۸۰μM دارای اثر سایتوتوکسیک مستقیم و کوتاه مدت می‌باشد(۲۲). هم چنین مشخص شده است که بیماران مبتلا به AML با سطح بالای بیان hTERT در زمان تشخیص، دوره بهبودی پایین‌تر، دوره بقای کوتاه‌تر و هم چنین افزایش احتمال عود بیماری داشته‌اند(۲۳). با در نظر گرفتن این مطلب به نظر می‌رسد که بررسی کمی mRNA ژن hTERT می‌تواند در بررسی پیش آگهی و کنترل بیماری مؤثر باشد. هم چنین هدف قرار دادن بیان hTERT می‌تواند راهی مؤثر در زمینه درمان بیماران مبتلا باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که BIBR1532 به طور وابسته به دوز و زمان قادر به کاهش رونویسی ژن hTERT است.

در نتیجه، با مطالعه انجام شده مشخص شد که تیمار سلول‌های NB4 با داروی BIBR1523 به طور وابسته به دوز و زمان با سرکوب رونویسی از ژن hTERT ، مهار تکثیر و ساخت DNA و هم چنین کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها همراه است. با توجه به طول تلومر کوتاه و فعالیت بالای آنزیم تلومراز در بیماران APL و هم چنین اثربخشی داروی BIBR1532 در القای اثر آنتی پرولیفراتیو در رده سلولی NB4 ، می‌توان درمان‌های مبتنی بر استراتژی آنتی‌تلومرازی را به عنوان راه‌کار درمانی مناسب در بیماران APL مد نظر قرار داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به طول تلومر کوتاه و فعالیت بالای آنزیم تلومراز در بیماران APL و هم چنین اثر بخشی داروی BIBR1532 در القای اثر آنتی پرولیفراتیو در رده سلولی NB4 ، می‌توان درمان‌های مبتنی بر استراتژی آنتی‌تلومرازی را به عنوان راه‌کار درمانی مناسب در بیماران APL ، مد نظر قرار داد.

References:

1- Mantadakis E, Samonis G, Kalmanti M. A comprehensive review of acute promyelocytic leukemia in children. Acta Haematol 2008; 119(2): 73-82.
2- Martens JH, Brinkman AB, Simmer F, Francoijs KJ, Nebbioso A, Ferrara F, *et al*. PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. Cancer Cell 2010; 17(2): 173-85.
3- de Thé H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. Nat Rev Cancer 2010; 10(11): 775-83.
4- Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, *et al*. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. Science 2010; 328(5975): 240-3.
5- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1): 57-70.
6- Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. Clin Cancer Res 2007; 13(17): 4960-3.
7- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. Nat Med 2006; 12(10): 1133-8.
8- Mason M, Schuller A, Skordalakes E. Telomerase structure function. Curr Opin Struct Biol 2011; 21(1): 92-100.
9- Wojtyla A, Gladych M, Rubis B. Human telomerase activity regulation. Mol Biol Rep 2011; 38(5): 3339-49.
10- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N,

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

Kauffmann I, Priepke H, *et al*. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. EMBO J 2001; 20(24): 6958-68.
11- Pascolo E, Wenz C, Lingner J, Hauel N, Priepke H, Kauffmann I, *et al*. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. J Biol Chem 2002; 277(18): 15566-72.
12- Shay JW, Keith WN. Targeting telomerase for cancer therapeutics. Br J Cancer 2008; 98(4): 677-83.
13- Ghaffari SH, Shayan-Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Ann Oncol 2008; 19(11): 1927-34.
14- Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. Carcinogenesis 2003; 24(7): 1167-76.
15- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266(5193): 2011-5.
16- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer 1997; 33(5): 787-91.
17- Zeng Z, Min B, Huang J, Hong K, Yang Y, Collins K, *et al*. Structural basis for Tetrahymena telomerase processivity factor Teb1 binding to single-stranded telomeric-repeat DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108(51): 20357-61.
18- Ouellette MM, Wright WE, Shay JW. Targeting telomerase-expressing cancer cells. J Cell Mol Med 2011; 15(7): 1433-42.
19- Deville L, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. Telomerase regulation in hematological cancers: a matter of stemness? Biochim Biophys Acta 2009; 1792(4): 229-39.
20- Lengfelder E, Hofmann WK, Nowak D. Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Leukemia 2012; 26(3): 433-42.
21- Mueller S, Hartmann U, Mayer F, Balabanov S, Hartmann JT, Brummendorf TH, *et al*. Targeting telomerase activity by BIBR1532 as a therapeutic approach in germ cell tumors. Invest New Drugs 2007; 25(6): 519-24.
22- 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.
23- Huh HJ, Huh JW, Yoo ES, Seong CM, Lee M, Hong KS, *et al*. hTERT mRNA levels by real-time RT-PCR in acute myelogenous leukemia. Am J Hematol 2005; 79(4): 267-73.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 10(4): 335-346

Original Article

Time-Dependent Inhibitory Effect of Non-Nucleosidic Telomerase Inhibitor on NB4 Cell Proliferation through Transcriptional Suppression of Catalytic Subunit

Bashash D.[1], Ghaffari S.H.[2], Kazerani M.[2], HezavehK.[2], Alimoghaddam K.[2], Ghavamzadeh A.[2]

[1]Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Since stimulated telomerase activity provides nearly all of human malignancies including acute promyelocytic leukemia (APL) with unlimited proliferative potential, targeting telomerase seems to be an effective approach in cancer treatment. In this regard, BIBR1532, a small-molecule inhibitor of telomerase, has been shown to increase the therapeutic window of current chemotherapeutic regimens. This study was aimed to investigate the effects of BIBR1532 on cell proliferation as well as transcriptional alteration of hTERT (the catalytic subunit of telomerase).

Materials and Methods

NB4 leukemic cells were treated with various concentrations of BIBR1532 and succeeding trypan blue exclusion assay, BrdU cell proliferation assay, and quantitative real-time PCR were applied to investigate cell viability index, cell proliferation and time-dependent alteration of hTERT mRNA levels.

Results

BIBR1532 decreased cell viability index and exerted an antiproliferative effect against NB4 leukemic cells; we found that exposing cells with BIBR1532 at 30, 60 and 90 μM for 72 h inhibited DNA synthesis rate by 24, 45 and 70%, respectively. Furthermore, transcriptional suppression of hTERT was found upon NB4 treatment by BIBR1532 in a time- and dose-dependent manner.

Conclusions

Based on the short telomere length and high terlomerase activity in APL as well as antiproliferative effect of BIBR1532 against NB4 cells, anti-telomerase-based therapy might be regarded as a successful strategy in APL therapy.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, BIBR1532, Telomerase

Received: 25 Aug 2012
Accepted: 20 Nov 2012

Correspondence: Ghaffari SH., PhD of Molecular Genetics. Associate Professor of Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Street.
Postal code: 14111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902665; Fax: (+9821) 88004140
E-mail: *shghaffari@tums.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-31]