Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 15(68): 12-20

# Pro-apoptotic effect of BIBR1532 on APL cell line: Induction of rapid cell death independent of progressive shortening of telomere length

Bashash D(PhD)[1], Ghaffari S.H(PhD)[2]*, Kazerani M(M.Sc)[2], Hezaveh K(M.Sc)[2], Alimoghaddam K(MD)[2], Ghavamzadeh A(MD)[2]

1- Department of Hematology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 6 Jun 2012, Accepted: 19 Sep 2012

**Abstract**

***Background:*** Since nearly 90% of patients with acute promyelocytic leukemia (APL) have high telomerase activity and significant shortened telomere length, these patients have, therefore, been suggested to be good candidates for the therapeutic intervention with telomerase inhibitors. This study was done to investigate the effects of BIBR1532, a non-nucleoside inhibitor of telomerase, on APL cells.

***Materials and Methods:*** In this experimental study, for investigating the effect of BIBR1532, NB4 leukemic cells were cultured in the presence of various concentrations of BIBR1532. Succeeding apoptosis assay, Caspase-3 activity assay, and quantitative real-time PCR were applied to examine the effect of this drug on apoptosis percenage, enzymatic activity of Caspase-3, and quantitative expression of genes mRNA involved in apoptosis.

***Results:*** The results showed that BIBR1532 induced apoptosis in NB4 cells in a dose-dependent maner. Moreover, real time PCR results showed that BIBR1532 led to a significant decrease in mRNA of Bcl-2 gene and signficant increases in transcription of Bax, PUMA, and Caspase-3.

***Conclusion:*** Since treatment with BIBR1532 could exert rapid apoptotic cell death in NB4 cells andactivate cellular apoptosis route, anti-telomerase-based therapy can regarded as a suitable strategy for APL treatment. Patients with progressive shortening of telomere length and high levels of telomerase activity are suitable candidates for treatment with telomerase inhibitors.

***Keywords:*** Acute promyelocytic leukemia, apoptosis, BIBR1532, telomerase inhibitors

*Corresponding author:
Address: Hematology, Oncology, and Stem Cell Transplantation Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Amirabad St., Tehran, Iran
Email: shghaffari200@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 9 (شماره پیاپی 68)، بهمن 1391، 20-12

# اثر پروآپوپتوتیک داروی BIBR1532 در رده سلولی APL: القاء مرگ سلولی سریع مستقل از کوتاه شدن تدریجی طول تلومر

**داود بشّاش[1]، سید حمید الله غفاری[2*]، مریم کازرانی[3]، کبریا هزاوه[3]، کامران علی مقدم[4]، اردشیر قوام زاده[4]**

1- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2- دانشیار، گروه خون و آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
3- کارشناسی ارشد، گروه خون و آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
4- استاد، گروه خون و آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/3/17 تاریخ پذیرش: 91/6/29

## چکیده

**زمینه و هدف:** با توجه به آن که حدود 90 درصد بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد دارای تلومرهای با طول کوتاه و فعالیت تلومراز بالا می‌باشند، لذا این بیماران کاندید مناسب برای درمان با مهارکنندگان تلومراز می‌باشند. برای بررسی کارآیی استفاده از استراتژی آنتی تلومراز در بیماری لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، سلول‌های رده NB4 با غلظت‌های متفاوت از داروی BIBR1532 که یک مهار کننده غیرنوکلئوزیدیکی تلومراز می‌باشد، تیمار شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی و به منظور بررسی اثر BIBR1532، سلول‌های NB4 در حضور غلظت‌های مختلف دارو کشت داده شد و آزمون‌های Flowcytometeric apoptosis assay، Caspase-3 activity assay و Quantitative real-time PCR جهت بررسی اثر دارو بر درصد آپوپتوز، فعالیت آنزیماتیک کاسپاز-3 و بیان کمی mRNA ژن‌های دخیل در آپوپتوز صورت گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که BIBR1532، موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های NB4 به طور وابسته به دوز می‌شود. علاوه بر این، نتایج به دست آمده از real-time PCR نشان داد که داروی BIBR1532 به طور قابل توجه سبب کاهش mRNA ژن Bcl-2 و افزایش میزان رونویسی از ژن‌های Bax، PUMA و Caspase 3 می‌گردد.

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که تیمار با داروی BIBR1532 می‌تواند در رده سلولی NB4 سبب القاء مرگ سلولی شده و مسیر آپوپتوز سلولی را فعال کند، لذا می‌توان به افزوده شدن درمان‌های مبتنی بر استراتژی آنتی تلومرازی به عنوان راه‌کار درمانی مناسب در بیماران لوسمی پرومیلوسیتیک حاد امیدوار بود؛ بیمارانی که به دلیل طول کوتاه تلومر و فعالیت بالای تلومراز کاندید مناسب برای درمان با مهارکنندگان تلومراز می‌باشند.

**واژگان کلیدی:** لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آپوپتوز، BIBR1532، مهار کنندگان تلومراز

***نویسنده مسئول:** تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و خیابان کارگر شمالی بیمارستان دکتر شریعتی، مرکز تحقیقات بخش خون و آنکولوژی

Email: shghaffari200@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

**مقدمه**

سلول‌های کشت شده طبیعی توانایی تکثیر محدود دارند، بدان معنا که بعد از تعداد مشخصی تقسیم دچار توقف رشد شده و وارد مرحله پیری می‌شوند، مرحله‌ای که به آن مرحله مرگ 1 (M1) می‌گویند(1). مشخص شده است که در فیبروبلاست‌های انسانی ورود به مرحله پیری در اثر غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌گر تومور به تعویق می‌افتد؛ این سلول‌های تغییر شکل یافته 30-20 تقسیم را قبل از ورود به مرحله بحران (M2) خواهند داشت. سلول‌هایی که از بحران فرار می‌کنند، توانایی تکثیر نامحدود (Immortalization) را کسب می‌کنند(1). طی دهه گذشته، شواهد نشان می‌دهد که انتهای کروموزوم‌ها (تلومرها) تنظیم کننده‌های اصلی مدت زمان زندگی هستند. تلومرهای انسانی که از چندین هزار توالی هگزانوکلئوتیدی TTAGGG تشکیل شده است، طی تکثیر سلول‌های طبیعی به طور پیشرونده کوتاه می‌شوند(2، 3)؛ این در حالی است که سلول‌های نامیرا هم‌چون اغلب انواع سلول‌های توموری، طول تلومر خود را به طور ثابت حفظ می‌کنند. بنابراین با توجه به این مطالب، تلومرها را می‌توان به عنوان ساختارهای مولکولی در نظر گرفت که تعداد تقسیم سلولی را شمرده و دوره زندگی را محدود می‌کنند(4).

در اغلب بدخیمی‌ها (90-85 درصد)، حفظ تلومر وابسته به افزایش بیان آنزیم تلومراز می‌باشد که توالی‌های هگزانوکلئوتیدی را به انتهای تلومرها اضافه می‌کند(5). با توجه به این امر، تلومراز به عنوان هدف درمانی بسیار امیدوار کننده جهت درمان سرطان‌ها معرفی شده و اخیرا مهارکنندگان تلومراز به عنوان راهکارهای درمانی جدید مورد توجه شایان قرار گرفته‌اند. در میان این دسته از داروها، BIBR1532 طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آنتی تلومراز BIBR1532 (2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoic acid) یکی از ترکیبات بسیار موفقی است که توسط شرکت دارویی آلمانی (Boehringer Ingelheim) در سال 2001 طراحی شد(6). این ترکیب جزو مهارکننده‌های غیرپپتیدیک و غیر نوکلئوزیدیک آنزیم تلومراز انسانی می‌باشد که می‌تواند به طور اختصاصی آنزیم تلومراز را به صورت وابسته به دوز مهار کند(7).

مشخص شده است که این دارو در دوزهای مختلف دارای اثرات متفاوت می‌باشد. تیمار بلند مدت سلول‌های سرطانی با غلظت‌های پایین BIBR1532 از طریق کوتاه شدن طول تلومر و فقدان عملکرد آن منجر به القاء اثرات آنتی پرولیفراتیو می‌شود(6). اخیرا اثری متفاوت از این ترکیب در غلظت‌های بالا مشاهده شده است که هنوز مکانیسم آن به خوبی مشخص نشده است. در این راستا، ال دالی و همکاران نشان دادند که این دارو در غلظت‌های بالا دارای یک اثر سایتوتوکسیک انتخابی کوتاه مدت بر روی سلول‌های بدخیم لوسمی میلوئید حاد (Acute myeloid Leukemia-AML) و لوسمی لنفوسیتیک مزمن (Chronic Lymphocytic leukemia-CLL) می‌باشد(8). برای بررسی اثر کوتاه مدت داروی آنتی تلومراز BIBR1532 در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic Leukemia-APL)، سرطانی که دارای تلومرهای با طول کوتاه و فعالیت تلومراز بالا می‌باشند، سلول‌های رده NB4 (رده سلولی انسانی APL) با غلظت‌های متفاوت از داروی BIBR1532 تیمار شد و مکانیسم القاء مرگ سلولی کوتاه مدت مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلولی و تیمار دارویی

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (رده سلولی انسانی APL) به صورت سوسپانسیون در محیط کشت RPMI 1640 حاوی 2 میلی مولار از ال-گلوتامین، 10 درصد FBS، پنی سیلین به میزان 100 واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین به میزان 100 میکروگرم بر میلی لیتر در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و فشار 5 درصد از $CO_2$ کشت داده شدند. سلول‌های NB4 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد و برای بررسی حضورt (15، 17) با روش استاندارد کاریوتایپینگ شد. هم‌چنین این رده سلولی برای حضور mRNA ژن ترکیبی PML/RARα نیز مورد مطالعه قرار گرفت. برای تیمار دارویی، سلول‌های سرطانی NB4 با

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

غلظت‌های 10، 30، 60 و 90 میکرومولار از داروی BIBR1532 (Tocris, Biosciences, USA) تیمار شدند. به منظور افزایش بهره وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایشات به صورت دو بار تکرار انجام شد.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز 3**

برای ارزیابی اثر داروی BIBR1532 در القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4، روش رنگ سنجی فعالیت آنزیم کاسپاز 3 بر اساس پروتکل کارخانه سازنده (سیگما) انجام گرفت. اساس آزمایش، اندازه‌گیری اسپکتروفتومتریک رنگی بوده که در اثر آزاد شدن مولکول pNA (متصل به سوبسترا) تحت تاثیر فعالیت آنزیم کاسپاز 3 ایجاد می‌شود. پس از تیمار 48 ساعته، سلول‌های NB4 را با دور 600 به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ کرده، رسوب سلولی را لیز کرده و لیزات سلولی با دور 20000 به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. در حجم نهایی 100 میکرولیتر، مقدار 5 میکروگرم از مایع رویی با 85 میکرولیتر بافر آزمایش و 10 میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز 3 (Ac-DEVD-pNA) به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از طی زمان مورد نظر، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 405 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد.

**بررسی کمی آپوپتوز با استفاده از فلوسیتومتری**

آپوپتوز با استفاده از Hoechst 33342 و Propidium Iodide (Invitrogen) از طریق فلوسیتومتری، طی مراحل زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها با PBS سرد شستشو شدند، سپس تعداد آنها در حدود $1\times10^6$ سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. در مرحله بعد 1 میکرولیتر از محلول Hoechst (دارای غلظت 5 میلی‌گرم در هر میلی لیتر آب) و 1 میکرولیتر از محلول PI (دارای غلظت 1 میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر آب) به هر میلی‌لیتر از سلول‌ها اضافه شد. بعد از 20 دقیقه انکوباسیون روی یخ سلول‌ها به سرعت با فلوسیتومتری (Partec PasIII, Germany) به ترتیب با انگیزش/ تشعشع ~ 350/461 و ~ 535/617 نانومتر برای Hoechst و PI ارزیابی شدند. در نهایت داده‌ها با نرم افزار FlowMax آنالیز شدند.

**استخراج RNA و سنتز cDNA**

برای استخراج RNA از سلول‌های مورد مطالعه، از کیت High Pure RNA Isolation (Roche) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های NB4 با داروی BIBR1532 و متعاقب گذشت زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت، RNA سلول‌ها استخراج شده و کمیت آنها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از Revert Aid First Strand (Takara BIO) cDNA Synthesis Kit استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش 20 میکرولیتر بود و محتویات آن شامل 4 میکرولیتر بافر PCR 5X، 2 میکرولیتر از dNTP، 1 میکرولیتر راندم هگزامر، 1 میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC، 1 میکرولیتر مهار کننده RNase (20 u/µl)، 1 میکرولیتر ترانس کریپتاز معکوس M-MULV (200u/µl) و 1 میکروگرم از RNA مورد آزمایش به ازاء هر واکنش می‌باشد. محتوی مذکور به مدت 5 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد، 5 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و 1 ساعت در دمای 42 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت، واکنش سنتز cDNA به واسطه انکوباسیون 5 دقیقه‌ای در دمای 70 درجه سانتی‌گراد پایان پذیرفت. cDNA سنتز شده در دمای 20- درجه نگهداری شد.

**ارزیابی کمّی بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز ( Bcl-2، Bax، PUMA و Caspase 3 )**

آزمون Real-time PCR در دستگاه light cycler (Roche) و در حجم 20 میکرو لیتر انجام شد. به ازاء هر واکنش، 10 میکرولیتر از SYBR Premix Ex Taq (Takara BIO)، 2 میکرولیتر از محصول cDNA، 0/5 میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10 پیکومول) و 7 میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در دمای 95 درجه به مدت 30 ثانیه و در ادامه، 45 سیکل برای مرحله واسرشت(5 ثانیه در 95 درجه) و مرحله اتصال و باز آرایی توأم (20 ثانیه در 60 درجه) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرارگرفت. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون real-time PCR در جدول1 آورده شده است.

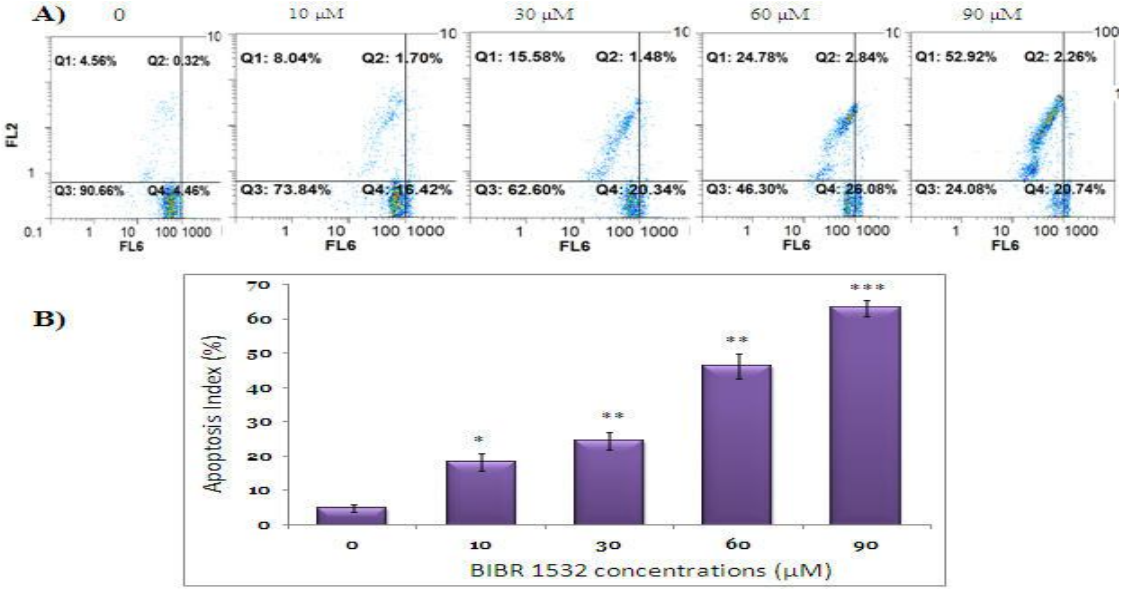
**جدول1. توالی پرایمر های مورد استفاده جهت انجام آزمون real-time PCR**

| ژن | شماره بازیی | پرایمر رفت ('3-5') | پرایمر برگشت ('3-5') | اندازه (bp) |
|---|---|---|---|---|
| HPRT | NM_000194 | TGGACAGGACTGAACGTCTTG | CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA | 111 |
| Bax | NM_138761 | CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG | GTGGGCGTCCCAAAGTAGG | 242 |
| Bcl-2 | NM_000633 | CGGTGGGGTCATGTGTGTG | CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC | 90 |
| PUMA | NM_014417 | GACCTCAACGCACAGTACGAG | AGGAGTCCCATGATGAGATTGT | 98 |
| Caspase-3 | NM_032991 | ATGGAAGCGAATCAATGGACTC | CTGTACCAGACCGAGATGTCA | 138 |

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه 18 استفاده شد. اختلاف معنی‌دار بین متغیرهای آزمایش با استفاده از آزمون تی دو دامنه تعیین شد. هم‌چنین به منظور مقایسه بین گروه کنترل و نمونه‌های آزمایش شده از آزمون دانت استفاده گردید. $p<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

فلوسیتومتری با استفاده از دو رنگ Hoechst 33342 و PI آزمایشی آسان و سریع برای ارزیابی آپوپتوز بر پایه میزان فلورسانس حالت جمع شده هسته سلول‌های آپوپتوز شده می‌باشد. پس از تیمار سلول‌های NB4 به مدت 48 ساعت با غلظت‌های مورد نظر از داروی BIBR1532، شاخص آپوپتوز سلولی با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد و نتایج به دست آمده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که BIBR1532، موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های NB4 به طور وابسته به دوز می‌شود؛ به طوری که در شکل 1 (A و B) نشان داده شده است، کمترین و بیشترین میزان آپوپتوز سلولی به ترتیب در تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های 10 و 90 میکرومولار از داروی BIBR1532 به دست آمده است.

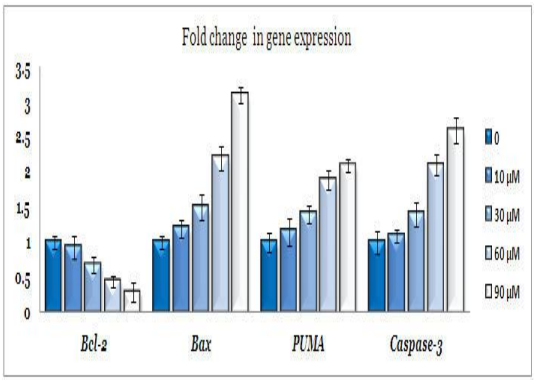



**شکل1. تاثیر داروی BIBR1532 بر روی درصد آپوپتوز سلول های NB4 طی تیمار 48 ساعته**

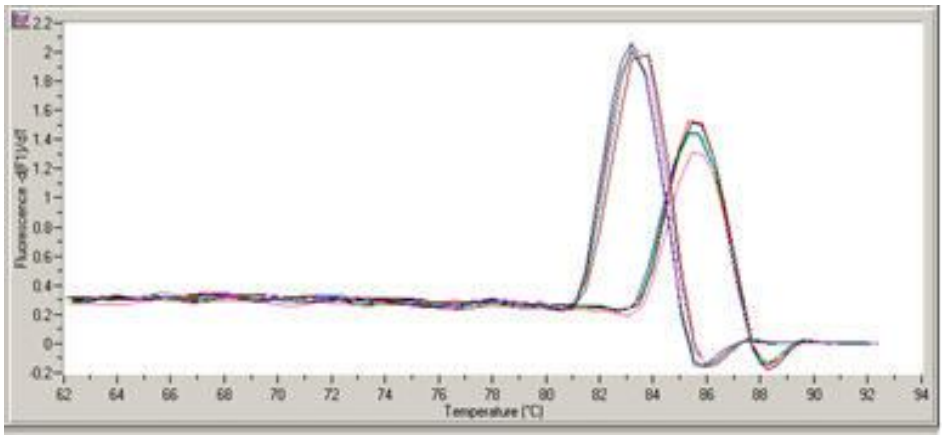
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

## کاهش رونویسی ژن Bcl-2 و افزایش رونویسی ژن‌های Bax و PUMA طی تیمار با داروی BIBR1532

آپوپتوز فرآیندی بسیار تنظیم شده است که نقش بسیار مهمی در حفظ هموستاز در ارگانیسم‌های چند سلولی دارد(9). مشخص شده است که آپوپتوز به واسطه بسیاری از عوامل برون سلولی و درون سلولی کنترل می‌شود. از میان عوامل درون سلولی، تعادل بین Bcl-2 (مهارکننده آپوپتوز) و Bax (معادل پروآپوپتوتیک Bcl-2) به عنوان مهم‌ترین پارامتر تعیین کننده سرنوشت سلول در پاسخ به محرک خارج سلول معرفی شده است. به همین دلیل و برای بررسی اثر BIBR1532 بر روی القاء مرگ سلولی در سلول‌های NB4، بیان mRNA ژن‌های Bax و Bc1-2 متعاقب تیمار سلولی به طور کمّی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل، از افزایش وابسته به دوز در نسبت mRNA ژن Bax به Bc1-2 و در نتیجه خاصیت پرو آپوپتوتیک داروی BIBR1532 علیه رده سلولی NB4 حکایت داشت. همان‌طور که در شکل 2 آمده است، پس از تیمار سلول‌های NB4به مدت 48 ساعت با غلظت‌های مورد نظر از داروی BIBR1532، رونویسی از ژن‌های Bcl-2 و Bax به ترتیب کاهش و افزایش وابسته به دوز را ایجاد کرده‌اند. هم‌چنین در بررسی کمّی میزان mRNA ژن PUMA (پروتئینی پروآپوپتوتیک دخیل در مسیر القاء آپوپتوز سلولی)، نتایج حاکی از بر هم خوردن موازنه بین پروتئین‌های پرو- و آنتی آپوپتوتیک به نفع پروتئین‌های پیش برنده آپوپتوز در سلول‌های NB4 تیمار شده می‌باشد(شکل 2). شایان ذکر است، از آنجایی که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد، با استفاده از منحنی ذوب اختصاصیت محصولات در فرایند PCR مشخص گشت؛ همان‌طور که در شکل 3 آمده است، آنالیز منحنی ذوب نشان می‌دهد که هیچ گونه پرایمر-دایمر و یا تکثیر DNA های اضافی وجود نداشته و رشته DNA تکثیر شده به طور اختصاصی رشته DNA ژن هدف می‌باشد.




**شکل2. اثر داروی BIBR1532 بر روی سطح رونویسی ژن‌های Bcl-2، Bax، PUMA و Caspase 3**

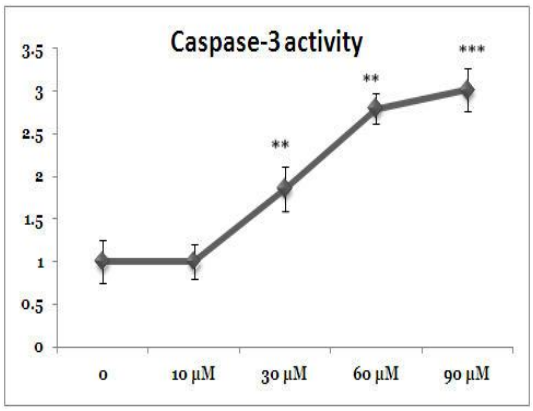



**شکل3. منحنی ذوب. همین طور که مشاهده می‌شود در نمودارها پس از مشتق گیری، منحنی درجه دومی به دست می‌آید که وجود پیک‌های ذوب با نقاط ماکزیمم واحد بر این موضوع دلالت دارد که رشته DNAی تکثیر شده، به طور اختصاصی رشته DNA ژن هدف و ژن مرجع می‌باشد**

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

## داروی BIBR1532 سبب افزایش میزان رونویسی و فعالیت آنزیماتیک کاسپاز-3 در سلول‌های NB4 می‌شود

جهت بررسی اثر داروی BIBR1532 بر روی القاء آپوپتوز در رده سلولی NB4 از طریق فعالیت آنزیم کاسپاز-3 ، فعالیت آنزیماتیک این آنزیم اندازه‌گیری شد. بدین منظور، سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از دارو به مدت 48 ساعت تیمار شده و میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز-3 با اندازه‌گیری غلظت p-NA آزاد شده اندازه‌گیری شد. طی 48 ساعت از تیمار دارویی سلول‌ها، BIBR1532 به صورت وابسته به دوز و به ترتیب در دوزهای 30، 60 و90 میکرومولار موجب القاء فعال شدن آنزیم کاسپاز به میزان 18/5، 27/9 و 30/1 درصد می‌گردد (شکل 4)؛ این در حالی است که دوز 10 میکرومولار دارو هیچ‌گونه تاثیری در القاء فعالیت آنزیم کاسپاز-3 در سلول‌های NB4 ندارد. همان طور که قابل انتظار بود، در بررسی کمّی میزان mRNA نیز شاهد افزایش رونویسی از روی ژن کاسپاز-3 به طور وابسته به دوز بودیم (شکل 2).




**شکل4. اثر داروی BIBR1532 بر میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز-3**

## بحث

کوتاه‌تر بودن طول تلومر در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی، افزایش بیان تلومراز در حدود 90 درصد از بدخیمی‌ها و شناسایی نقش کلیدی تلومراز در ایجاد توانایی تکثیر نامحدود سلول‌های سرطانی موجب شده است که طی دهه گذشته توجه بسیار ویژه به مهار کنندگان تلومراز در حیطه راهکارهای درمانی علیه سرطان شود(9،10). داروهای ضد تلومراز خود به 2 گروه تقسیم می‌شوند؛ دسته اول داروهایی که hTERT (جزء کاتالیتیک تلومراز) و دسته دوم آنهایی که hTR (جزءRNA تلومراز) را هدف قرار می‌دهند(11). از میان مهار کنندگان hTERT، داروی BIBR1532 بیش از سایر مهار کنندگان مورد توجه قرار گرفته و مشخص شده است که این مهار کننده غیر نوکلئوزیدی – غیر پپتیدی به طور اختصاصی موجب مهار آنزیم تلومراز می‌شود(6). هم‌چنین مشخص شده است که این دارو دارای اثرات وابسته به دوز بوده و سرعت و اثر آن به طول اولیه تلومر بستگی دارد. در سال‌های اخیر مطالعاتی جهت بررسی اثر این دارو بر روی سرطان‌های مختلف انجام گرفته است. تیمار سلول‌های سرطانی ریه، پروستات، پستان و فیبروسارکوما با BIB1532 منجر به کاهش پیشرونده طول تلومر و القاء پیری و مرگ سلولی شده است(12). هم‌چنین نشان داده شده است که داروی BIBR1532 دارای اثرات سایتوتوکسیک مستقیم بر روی سلول‌های بیماران مبتلا به T-PLL می‌باشد(13).

با توجه به آن که تقریباً 90 درصد بیماران مبتلا به APL دارای تلومرهای با طول کوتاه و فعالیت تلومراز بالا می‌باشند(14)، لذا به نظر می‌رسد این بیماران کاندید مناسب برای درمان با مهارکنندگان تلومراز باشند. به این منظور و برای بررسی کارآیی استفاده از استراتژی آنتی تلومراز در بیماری APL و هم‌چنین برای مطالعه مکانیسم‌های احتمالی پروآپوپتوتیک دارو، سلول‌های رده NB4 با غلظت‌های متفاوت از داروی BIBR1532 تیمار شد و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت. ما در این مطالعه نشان دادیم که داروی BIBR1532 در دوزهای بالا (30≥µM) و در مدت زمان کوتاه بر روی سلول‌های NB4 دارای اثر سایتوتوکسیک می‌باشد که در نهایت منجر به القاء مرگ سلولی و آپوپتوز می‌شود. در همین راستا، ال دالی و همکاران نشان دادند که این دارو دارای یک اثر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

سایتوتوکسیک انتخابی علیه سلول‌های بدخیم AML و CLL می‌باشد(8).

به منظور بررسی مکانیسم‌های احتمالی پروآپوپتوتیک دارو، بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز هم‌چون Bcl-2، Bax و PUMA مورد ارزیابی کمّی قرار گرفت. جنانچه انتظار می‌رفت تیمار سلول‌های NB4 به طور وابسته به دوز با کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و افزایش بیان ژن‌های پرو آپوپتوتیک Bax و PUMA همراه بود. هم‌چنین نتایج این تحقیق نشان داد که BIBR1532 هم سبب افزایش بیان ژن و هم سبب افزایش فعالیت آنزیماتیک کاسپاز 3 می‌شود. در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bax منجر به بر هم خوردن موازنه بین پروتئین‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک به نفع پروتئین‌های پروآپپتوتیک و شروع مسیر آپوپتوز در سلول می‌شود. هسته مرکزی تشکیلات تخصصی آپوپتوز در سلول، یک سیستم پروتئولیتیک شامل خانواده‌ای از پروتئازها به نام کاسپازها می‌باشد. در این میان کاسپاز-3، کاسپاز مهمی است که نقشی محوری در فاز اجرایی آپوپتوز سلولی دارد. با مهار Bcl-2 و به دنبال آن اولیگومریزاسیون Bax در غشاء میتوکندری، سیتوکروم c آزاد شده و به دنبال آن کاسپاز 3 فعال گشته و در نهایت مرگ سلولی القاء می‌گردد.

## نتیجه گیری

با انجام این مطالعه مشخص شد که داروی BIBR1532 سبب افزایش نسبت Bax به Bcl-2، القاء آپوپتوز و هم‌چنین کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به طور وابسته به دوز می‌شود. از آنجایی که تیمار کوتاه مدت با داروی BIBR1532 می‌تواند در رده سلولی NB4 سبب القاء مرگ سلولی شده و مسیر آپوپتوز سلولی را فعال کند، لذا در آینده نه چندان دور می‌توان به افزوده شدن درمان‌های مبتنی بر استراتژی آنتی تلومرازی به عنوان راهکار درمانی مناسب در بیماران APL امیدوار بود؛ بیمارانی که به دلیل طول کوتاه تلومر و فعالیت بالای تلومراز کاندید مناسب برای درمان با مهارکنندگان تلومراز می‌باشند.

## تشکر و قدردانی

از مدیریت وکارکنان محترم مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند و اجازه کار در این مرکز را دادند سپاسگزاری به عمل می‌آید.

## منابع

1. Wright WE, Pereira-Smith O, Shay J. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. Molecular and cellular biology. 1989; 9(7):3088-92.
2. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992;89(21):10114-8.
3. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. 1990;345(6274):458-60.
4. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. The EMBO journal. 1992;11(5):1921-9.
5. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. Nature medicine. 2006;12(10):1133-8.
6. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N, Kauffmann I, Priepke H, et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. The EMBO journal. 2001;20(24):6958-68.
7. 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. Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(18): 15566-72.
8. 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.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:46 +0430 on Wednesday September 20th 2017

9. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. Nature Reviews Cancer. 2008; 8(3): 167-79.
10. Fauce SR, Jamieson BD, Chin AC, Mitsuyasu RT, Parish ST, Ng HL, et al. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes. The Journal of Immunology. 2008;181(10):7400-6.
11. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition. Molecular biotechnology. 2009;41(2):194-9.
12. Kelland LR. Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics–current status and future prospects. European Journal of Cancer. 2005; 41(7): 971-9.
13. Röth A, Dürig J, Himmelreich H, Bug S, Siebert R, Dührsen U, et al. Short telomeres and high telomerase activity in T-cell prolymphocytic leukemia. Leukemia. 2007; 21(12): 2456-62.
14. Ghaffari S, Shayan-Asl N, Jamialahmadi A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Annals of oncology. 2008;19(11):1927-34.