

## **The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line**

Ahmadi AH(BSc)<sup>1</sup>, Moosavi MA(PhD)<sup>1\*</sup>, Hosseinpour Feizi MA(PhD)<sup>1</sup>

1- Department of Zoology, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received 12 Jan 2010 Accepted 17 March 2010

---

### **Abstract**

**Background:** Recently, reports have been made of the effects of boric acid (BA) on cancer prevention and inhibition of cancer cell proliferation. This study was designed to investigate the effects of this compound on K562 cell line as a model of chronic myeloid leukemia (CML).

**Materials and Methods:** In this experimental trial, K562 cell line was cultured in the presence of 0.75 to 12 mmol concentrations of boric acid for 24, 48, 72, and 96 hour intervals. Anti-proliferative and cytotoxic effects of BA were measured by trypan blue exclusion test and MTT assay, respectively. Flow-cytometry was utilized for evaluating the effects of BA on cell cycle. Wright-giemsa staining was used for determining the effects of BA, and latex phagocytic assay was used for evaluating the phagocytic potential of the differentiated cells.

**Results:** BA induced growth inhibition of K562 cells in a dose and time dependent manner; after 96 hours of treatment with 12 mmol BA, cell proliferation of K562 cells was inhibited to about 83% ( $p < 0.001$ ). In addition, BA induced G<sub>1</sub> cell cycle arrest in a way that for instance, after 6 days of treatment with 9 mmol BA, 98% of cell populations were at G<sub>1</sub> level. Wright-giemsa staining and latex phagocytic assay results confirmed that K562 cells differentiated toward monocyte-macrophage lineage.

**Conclusion:** Noticing the anti-proliferative and differentiating effects of BA, and no evidence of its adverse effects, this compound can be used as alone or in combination with other drugs in CML differentiation therapy.

**Keywords:** Boric acid, Cell cycle, Cell differentiation, Leukemia

\*Corresponding author:

Email: moosav\_m@tabrizu.ac.ir

Address: Department of Zoology, Faculty of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

## اثر القایی اسید بوریک در مهار رشد و تغییرات تمایزی رده سلولی K562 لوسمی میلوئید مزمن انسان

امیر حسین احمدی<sup>1</sup>، دکتر سید محمد امین موسوی<sup>2\*</sup>، دکتر محمد علی حسین پور فیضی<sup>3</sup>

1- دانشجوی کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

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

3- استاد، دکترای تخصصی رادیوبیولوژی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت 88/10/22، تاریخ پذیرش 88/12/26

### چکیده

**زمینه و هدف:** به تازگی اثرات اسید بوریک در پیشگیری از سرطان و مهار رشد سلول‌های سرطانی گزارش شده است. این مطالعه به منظور تعیین اثرات این ترکیب بر روی سلول‌های K562 به عنوان مدلی از لوسمی میلوئید مزمن طراحی گردید.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی رده سلولی K562 تحت تاثیر غلظت‌های 0/75 تا 12 میلی مولار اسید بوریک برای فاصله‌های زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت کشت گردید. اثرات مهار رشدی و کشندگی اسید بوریک با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و احیای نمک تترازولیوم ارزیابی شد. از فلوسایتومتری برای بررسی اثرات این ماده بر چرخه سلولی استفاده گردید. برای تعیین اثرات اسید بوریک از رنگ آمیزی رایت-گیمسا و آزمون بلع ذرات لاتکس برای تعیین توانایی بیگانه خواری سلول‌های تمایز یافته استفاده شد.

**یافته‌ها:** اسید بوریک سبب مهار رشد سلول‌های K562 به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌شود، بعد از 96 ساعت تیمار با اسید بوریک در غلظت 12 میلی مولار، رشد سلول‌های K562 به میزان 83 درصد مهار شد ( $p < 0/001$ )؛ همچنین اسید بوریک سبب توقف چرخه سلولی در مرحله  $G_1$  گردید به طوری که مثلاً در غلظت 9 میلی مولار بعد از 6 روز، 98 درصد از جمعیت سلولی در مرحله  $G_1$  قرار داشتند. رنگ آمیزی رایت-گیمسا و داده‌های حاصل از تست بلع ذرات لاتکس تأیید کننده تمایز سلولی به سمت رده مونوئستی-ماکروفاژی می‌باشد.

**نتیجه گیری:** با توجه به خاصیت مهارکنندگی و تمایز دهندگی اسید بوریک و فقدان اثرات جانبی می‌توان این ترکیب را به صورت یک دارو به تنهایی یا در کنار داروهای دیگر در تمایز درمانی لوسمی پیشنهاد نمود.

**واژگان کلیدی:** اسید بوریک، چرخه سلولی، تمایز سلولی، لوسمی

\* نویسنده مسئول: آذربایجان شرقی، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری

Email: moosav\_m@tabrizu.ac.ir

## مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (Chronic Myeloid Leukemia- CML) نوعی سرطان خون است که به دلیل وقوع یک جابه جایی دو طرفه بین ژن *abl* بر روی کروموزوم 9 و ژن *bcr* بر روی کروموزوم 22 در سلول‌های بنیادی خونی چند توان ایجاد می‌شود (1، 2). انکوژن *Bcr-Abl* حاصل از این جابه جایی، پروتئین  $p210^{Bcr-Abl}$  را کد می‌کند که فعالیت تیروزین کینازی پیوسته و مداوم آن سبب تکثیر بی رویه و اختلال در مرگ برنامه‌ریزی شده (آپتوز) سلول‌های پیش ساز میلوئید می‌شود (1، 2). تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، درمان با اینترفرون آلفا و پیوند مغز استخوان اشاره کرد (1، 3). در کنار این راهکارها استفاده از مهارکننده تیروزین کینازی ایماتینب مسیلات (Imatinib mesylate) که به طور اختصاصی *Bcr-Abl* را مهار می‌کند خط اول درمانی محسوب می‌شود (4)؛ به هر حال استفاده از این مهارکننده‌ها نیز با برخی اثرات جانبی از جمله مقاومت دارویی همراه بوده است و هنوز درمانی قطعی برای CML گزارش نشده است (5، 6). برای حل این مشکلات تاکنون راهکارهای درمانی جایگزین مختلفی پیشنهاد شده است که تمایز درمانی یکی از آنهاست. در حقیقت با تمایز درمانی سلول‌های بنیادی سرطانی به طرف تمایز نهایی سوق داده می‌شوند و بنابر این با القاء مرگ خود به خودی سلول‌ها، احتمال عود سرطان کاهش می‌یابد (7، 8)؛ همچنین به کار بردن تمایز درمانی در کنار روش‌های شیمی درمانی سبب حساس شدن اکثر سلول‌های سرطانی و سلول‌های بنیادی لوسمی به دارو می‌گردد (9).

رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی فاز حاد CML انسانی در نظر گرفته می‌شود (10). این رده سلولی مدل مناسبی برای بررسی توان تمایز دهی ترکیبات مختلف به شمار می‌آید (10، 11) به طوری که مثلاً نشان داده شده است که ترکیبات مختلفی مانند همین (Hemin) و آنتراسیکلین (Anthracycline) قادر به القاء تمایز

اریتروئیدی در سلول‌های K562 می‌باشند (12) و یا ترکیبی به نام فوربال 12-مریستات-13-استات باعث القاء تمایز مگاکاریوسیتی و ماکروفازی در سلول‌های K562 می‌شود (13)؛ با این حال بسیاری از این ترکیبات به خاطر اثرات جانبی یا خاصیت تمایز دهندگی ضعیف قابلیت استفاده در بدن انسان را ندارند؛ به همین دلیل تلاش برای یافتن ترکیبات جدید با پتانسیل القاء تمایز در سلول‌های K562 یکی از اولویت‌های مهم تحقیقاتی در سطح جهان محسوب می‌شود.

بورون عنصری کمیاب محسوب می‌شود که در بدن جانداران عملکردهای مختلفی دارد؛ به عنوان مثال دارای خاصیت آنتی اکسیدانت است و در جلوگیری از تصلب شرایین نقش ایفا می‌کند (14، 15). در حالت طبیعی این عنصر از مواد غذایی مختلف در طول معده و روده جذب شده و به حالت اسید بوریک در خون به گردش در می‌آید (16). به تازگی اثرات پیش‌گیری کننده و ضد سرطانی نیز برای این ترکیب گزارش شده است. یک مطالعه اپیدمیولوژیک نشان داده است که خطر ابتلاء مردان آمریکایی به سرطان پروستات ارتباط عکس با میزان دریافت بورون در رژیم غذایی دارد (17)؛ همچنین با بررسی‌های صورت گرفته بر روی زنان ساکن مناطقی که میزان بورون در رژیم غذایی آنها بالاست، مشاهده شده است که هضم مقادیر بالایی از بورون در آب شرب سبب کاهش خطر یافته‌های پاتولوژیکی مرتبط با سرطان رحم می‌شود (18). در کنار این موارد مطالعات صورت گرفته بر روی موش‌های دارای سرطان پروستات نشان داده است که اسید بوریک سبب کاهش رشد تومور همراه با کاهش سطح آنتی ژن اختصاصی پروستات در خون می‌شود (19). مطالعات جامع دیگری بر روی مدل‌های آزمایشگاهی سلول‌های سرطانی پروستات و رده‌های سلولی مرتبط با سرطان سینه حاکی از آنست که این اسید سبب مهار رشد این سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت می‌شود و تغییرات ریخت‌شناسی شبیه تمایز نهایی و پیری را القاء می‌کند (20-22). با توجه به این که تاکنون مطالعه جامعی در زمینه اثرات اسید بوریک بر

مدل‌های لوسمی صورت نگرفته همچنین درمانی قطعی برای CML ارایه نشده است هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات احتمالی مهار رشدی یا تمایزی اسید بوریک بر رده سلولی K562 به عنوان مدلی از CML می‌باشد تا اثر بخشی آن در درمان این نوع لوسمی به طور مقدماتی مورد ارزیابی قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

به منظور انجام تحقیق تجربی آزمایشگاهی حاضر رده سلولی K562 در فروردین 1388 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه تبریز انتقال یافت. برای رشد این رده سلولی از محیط کشت RPMI 1640 (Biosera انگلستان) که غنی شده با سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) 10 درصد (Biosera انگلستان) و آنتی بیوتیک‌های استروپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی لیتر) و پنی سیلین (100 واحد بر میلی لیتر، سیناژن تهران) بود استفاده شد. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در انکوباتور Memmert آلمان با شرایط  $CO_2$  5 درصد، رطوبت 95 درصد و دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

به منظور بررسی اثرات اسید بوریک (sigma- آمریکا) بر ظاهر سلول‌های K562، تعداد  $10^5$  سلول در ظروف 24 چاهکی (SPL life science کره جنوبی) قرار داده شد. بعد از 24 ساعت سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت اسید بوریک (0/75، 1/5، 3، 6، 9 و 12 میلی مولار) برای فواصل زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus ژاپن) در قیاس با نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مورد ارزیابی قرار گرفت.

همچنین برای بررسی اثر اسید بوریک بر رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و هموسایتومتر استفاده شد. برای این منظور تعداد  $2 \times 10^4$  سلول در هر چاهک در ظروف 96 چاهکی قرار داده شد.

بعد از 24 ساعت غلظت‌های مختلف از اسید بوریک (0/75 تا 12 میلی مولار) به هر چاهک برای زمان‌های 24 تا 96 ساعت اضافه شد. در هر بازه زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (sigma آمریکا) مورد شمارش قرار گرفت. این آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه به طور مستقل انجام شد. در ادامه جهت بررسی اثر کشندگی اسید بوریک بر سلول‌های K562 از آزمون احیای نمک تترازولیوم (Methyl Thiazol Tetrazolium - MTT) استفاده شد. نمک تترازولیوم به واسطه فعالیت میتوکندریایی سلول‌های زنده به بلورهای فورمازان که جذب متفاوتی دارند احیا می‌شود؛ به این منظور  $10^4$  سلول در هر چاهک بارگذاری شد، پس از 24 ساعت غلظت‌های متفاوت اسید بوریک اضافه شد و با فرا رسیدن هر یک از فواصل زمانی میزان 10 میکرو لیتر از نمک تترازولیوم (Merck آلمان) اضافه گردید. پس از گذشت 24 ساعت میزان جذب نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از دستگاه جذب اسپکتروفتومتر (Bio-rad) اندازه گیری شد.

برای مطالعه اثر تمایزی منوسیتی - ماکروفاژی اسید بوریک از رنگ آمیزی رایت-گیمسا و آزمایش بیگانه خواری ذرات لاتکس استفاده شد. برای انجام آزمون بیگانه خواری، سوسپانسیون ذرات لاتکس (Gravindex انگلستان) به میزان 1:10 با بافر فسفات رقیق شد و 0/1 میلی‌لیتر از آن به سلول‌های K562 کنترل و تیمار شده اضافه گردید. مخلوط به میزان 60 دقیقه در انکوباتور حاوی گاز  $CO_2$  و دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از دو بار شستشو با بافر فسفات، از میکروسکوپ نوری برای مطالعه فعالیت بیگانه خواری ذرات لاتکس استفاده گردید. سلول‌هایی که بیش از 10 ذره‌ی لاتکس را بلعیده بودند به عنوان سلول‌های دارای توانایی بیگانه خواری در نظر گرفته شدند.

جهت بررسی چرخه سلولی از دستگاه فلوسایتومتر (Partec آلمان) استفاده شد. به این منظور سلول‌ها در ظروف 24 خانه‌ای کشت شده و با غلظت‌های متفاوت دارو

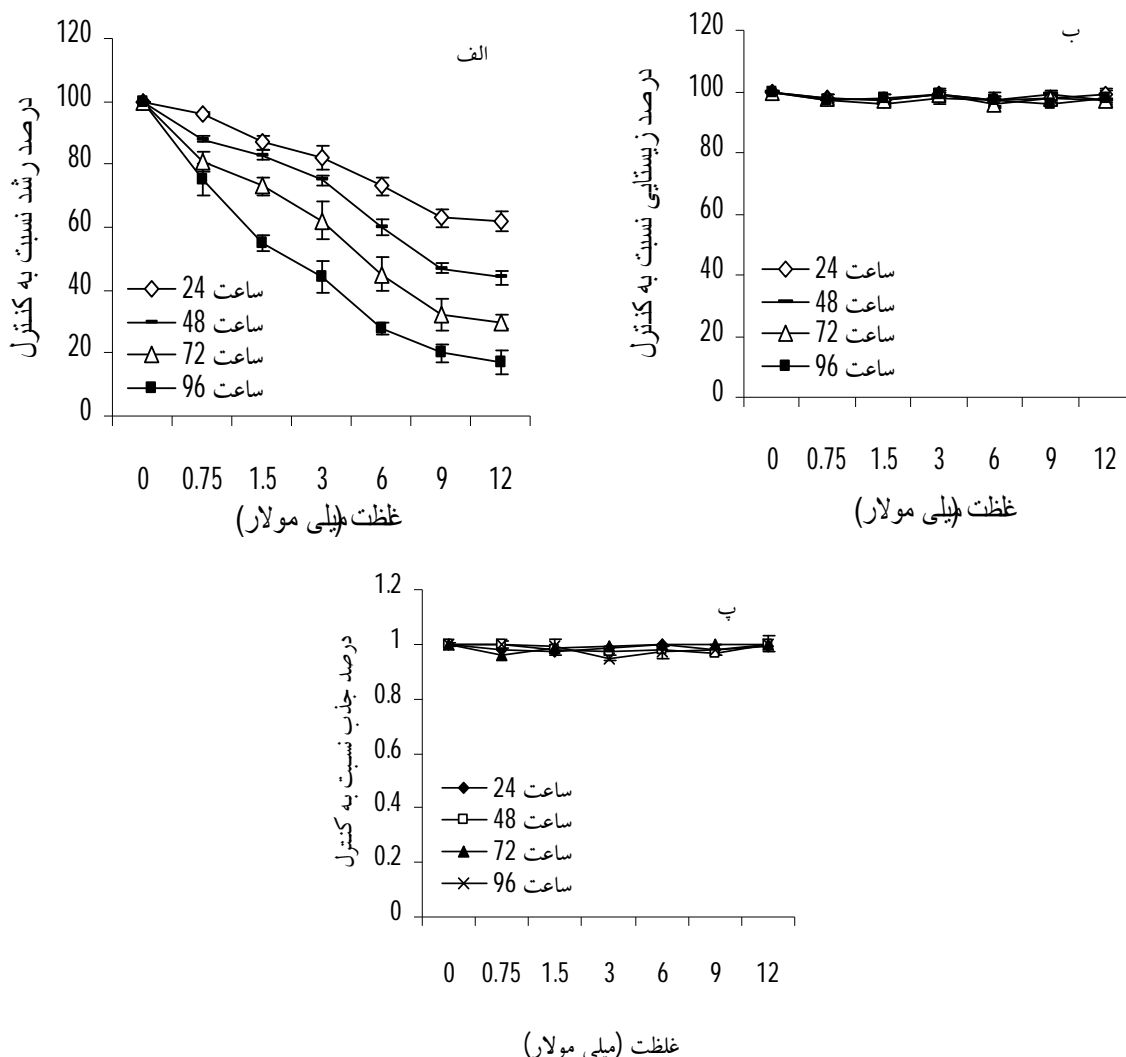
می‌شود اثرات مهار رشدی اسید بوریک بر روی سلول‌های K562 بعد از 24 ساعت مشاهده گردیده و به صورت وابسته به زمان افزایش یافت به طوری که در 96 ساعت به بیشترین میزان خود رسید؛ به عنوان مثال در غلظت 3 میلی مولار و بعد از 24، 48، 72 و 96 ساعت رشد سلول‌ها به ترتیب به میزان تقریباً 18، 25، 38 و 56 درصد کاهش یافت. این داده‌ها در جدول 1 به صورت درصد رشد نسبت به کنترل به ترتیب برابر 82، 75، 62 و 44 درصد نشان داده شده‌اند. این اثرات همچنین به صورت وابسته به غلظت می‌باشد به طوری که به عنوان نمونه بعد از 96 ساعت تیمار با اسید بوریک در غلظت‌های 0/75، 1/5، 3، 6، 9، 12 میلی مولار، رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان 25، 45، 56، 72، 80 و 83 درصد مهار شد (شکل 1- الف). آنالیز آماری مربوط به نتایج به طور کامل و براساس درصد رشد به نسبت کنترل در جدول 1 نمایش داده شده است؛ همچنین میزان زیستایی این سلول‌ها با استفاده از تست دفع تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل 1- ب). نتایج نشان می‌دهد که در طول 4 روز، میزان زیستایی در سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک در مقایسه با سلول‌های کنترل تفاوت چندانی نشان نداد. همچنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه داده‌ها  $p < 0/08$  را نشان می‌دهد که سطح معنی‌داری در نظر گرفته نمی‌شود؛ به عبارت دیگر اسید بوریک سبب القاء مرگ در سلول‌های K562 نمی‌شود. آزمون MTT هم که برای بررسی سمیت ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرد نشان دهنده هیچگونه سمیتی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف آزمایش نبود (شکل 1- پ).

و برای زمان‌های مختلف تیمار گردیدند. بعد از جمع‌آوری و سانتیفیوژ در دور 800g، سلول‌ها با (Phosphate buffered Saline) PBS سرد شستشو و توسط اتانول 70 درصد تثبیت گردید. برای بررسی مراحل (فازهای) چرخه سلولی، نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه با 20 میلی گرم پروپیدیوم ایوید (Propidium Iodate-PI) و 20 میلی گرم RNase (حل شده در 1 میلی لیتر PBS) مخلوط و توسط دستگاه فلوسایتمتری بررسی گردیدند (23). با استفاده از نرم افزار خاص دستگاه، درصد جمعیت سلولی در مراحل  $G_1$ ، S و  $G_2$  مشخص شد.

در تحقیق حاضر کلیه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار  $\pm$  خطای استاندارد نمایش داده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون تی استفاده و داده‌های با ارزش  $p < 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

اثرات غلظت‌های متفاوت اسید بوریک بر روی رشد سلول‌های K562 با فاصله‌های زمانی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. لازم به توضیح است بازه انتخابی غلظت اسید بوریک بر مبنای اثرات ضد سرطانی آن در مقالات مختلف و همچنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. شکل 1- الف بیان‌گر مهار رشد سلول‌های K562 بعد از یک بار تیمار با اسید بوریک با غلظت‌های متفاوت (0/75 تا 12 میلی مولار) برای زمان‌های مختلف می‌باشد. همان طور که در این شکل مشاهده



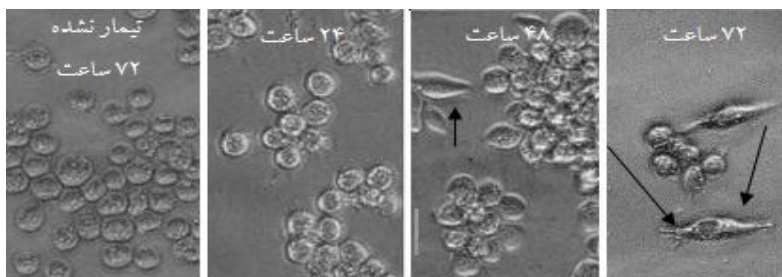
شکل 1. اثرات اسید بوریک بر روی رشد و زیستایی سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از اسید بوریک با فاصله‌های زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت تیمار و مهار رشد (الف)، زیستایی (ب) و مرگ (پ) سلول‌ها (نتایج آزمون MTT) به ترتیب با استفاده از شمارش سلولی و آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل  $\pm$  خطای استاندارد نمایش داده شده است.

جدول 1. مقایسه درصد رشد سلول‌های K562 در حضور غلظت‌های مختلف اسید بوریک

درصد رشد نسبت به کنترل				غلظت (میلی مولار)
96 ساعت	72 ساعت	48 ساعت	24 ساعت	
100	100	100	100	0 (کنترل)
75	81	88	96	0/75
$p < 0/0001$	$p < 0/001$	$p < 0/001$	$p < 0/08$	
55	73	83	87	1/5
$p < 0/0001$	$p < 0/0001$	$p < 0/001$	$p < 0/001$	
44	62	75	82	3
$p < 0/0001$	$p < 0/0001$	$p < 0/0001$	$p < 0/001$	
28	45	60	73	6
$p < 0/0001$	$p < 0/0001$	$p < 0/0001$	$p < 0/001$	
20	32	47	63	9
$p < 0/00001$	$p < 0/0001$	$p < 0/001$	$p < 0/001$	
17	30	44	62	12
$p < 0/00001$	$p < 0/00001$	$p < 0/0001$	$p < 0/0001$	

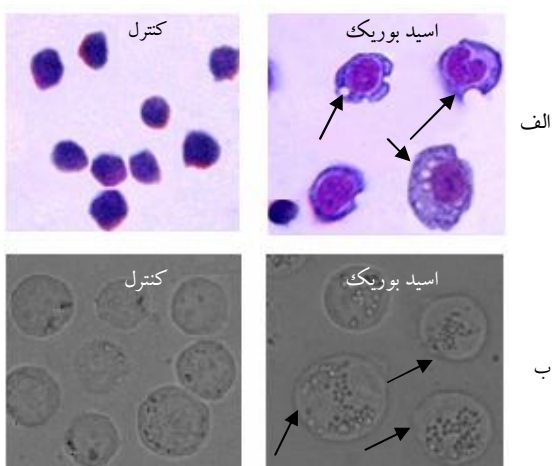
محکم به کف ظروف کشت چسبیدند که در زمان‌های 72 و 96 ساعت به طور واضح مشاهده است. همه این مشخصات از نظر ظاهری بسیار شبیه سلول‌های خونی ماکروفاژی می‌باشند؛ بنابراین این گونه استنباط می‌گردد که اسید بوریک القاء یک سری تغییرات ظاهری شبیه تمایز مرحله به مرحله از منوسیت به ماکروفاژ را نشان می‌دهد.

بررسی تغییرات ظاهری بر روی سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک نشان دهنده تغییرات ریخت شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود. به طوری که برخی سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل بزرگ تر شده و به شکل دوکی همراه با زوئندی شبیه پای کاذب در آمدند (شکل 2). از طرفی این سلول‌های دوکی به طور



شکل 2. تغییرات ظاهری ایجاد شده در سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک. سلول‌ها با غلظت 9 میلی مولار اسید بوریک در زمان‌های مختلف تیمار و تغییرات ظاهری در آنها با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. به ایجاد پاهای کاذب (فلش بزرگ) و دوکی شدن (فلش کوچک) که از 72 ساعت به بعد آغاز می‌شود توجه گردد (درشت نمایی  $\times 400$ ).

به منظور بررسی بیشتر اثرات تمایزی اسید بوریک از رنگ آمیزی رایت - گیمسا استفاده شد. سلول‌های K562 سلول‌هایی با ظاهر کروی و نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا می‌باشد، در حالی که بعد از تیمار با اسید بوریک سلول‌های بزرگ با نسبت هسته به سیتوپلاسم کمتر و حاوی گرانول‌های متعدد مشاهده گردید (شکل 3- الف). این موارد از شاخصه‌های سلول‌های رده منوسیتی و ماکروفاژی می‌باشند. به منظور تأیید بیشتر این امر از یک شاخص زیست رفتاری یعنی توانایی بیگانه خواری ذرات لاتکس نیز استفاده شد. در واقع اگر سلول K562 به منوسیت‌ها و مخصوصاً ماکروفاژها تمایز یافته باشند می‌بایست نسبت به ذرات خارجی از خود توانایی بیگانه خواری نشان دهند. داده‌های به دست آمده از تست بلع ذرات لاتکس (شکل 3- ب) نشان دهنده توانایی این سلول‌ها در بیگانه خواری ذرات بیگانه می‌باشد که از خصوصیات منوسیت‌ها و ماکروفاژها به شمار می‌رود. بنابراین به نظر می‌رسد که اسید بوریک سبب القاء تمایز منوسیتی - ماکروفاژی می‌شود.



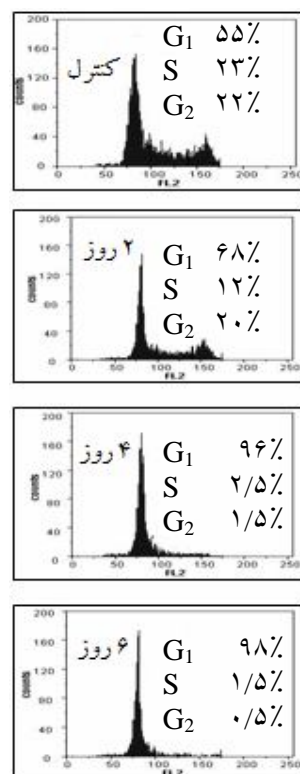
شکل 3. اثرات تمایزی اسید بوریک در سلول‌های K562. الف: سلول‌های K562 به مدت 96 ساعت با غلظت 9 میلی مولار اسید بوریک تیمار شدند و سپس به کمک رنگ آمیزی رایت-گیمسا مشخصات ظاهری تمایز مورد بررسی قرار گرفتند. به بزرگ شدن سلول‌ها، لوبیایی شدن هسته و کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم (فلش‌های بزرگ) و واکونول دار شدن (فلش‌های کوچک) توجه شود. ب: سلول‌های K562 با غلظت 9 میلی مولار و به مدت 96 ساعت تیمار و از نظر توانایی بلع ذرات بیگانه لاتکس مورد ارزیابی قرار گرفتند. سلول‌هایی که بیش از 10 ذره لاتکس را بلعیده باشند دارای توانایی بیگانه خواری در نظر گرفته شد. به فلش‌ها توجه گردد (بزرگنمایی  $\times 400$ ).

## بحث

رژیم‌های غذایی سرشار از میوه و صیفی جات و فاقد چربی در پیش‌گیری از سرطان نقش به‌سزایی دارند. صیفی جات، بادام و سایر مغزها، میوه‌ها و نوشابه‌های آنها از منابع اولیه تأمین‌کننده بورون بدن انسان محسوب می‌شوند (24). شکل رایج انتقال بورون در خون انسان به صورت اسید بوریک می‌باشد (16). در مطالعه حاضر ما برای اولین بار نشان دادیم که اسید بوریک به‌طور وابسته به غلظت و زمان سبب مهار رشد سلول‌های K562 می‌شود که این فرایند همراه با توقف چرخه سلولی در فاز  $G_1$  و مستقل از مرگ سلولی می‌باشد. اثر اسید بوریک در مهار رشد مستقل از مرگ سلولی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. بارانکو و اکخورت با مطالعه بر روی سه رده سلولی سرطانی و دو رده غیر توموری پروستات نشان دادند که اسید بوریک سبب القاء مهار رشد در رده‌های سلولی LNCaP، DU-145 و PC-3 سرطان پروستات به‌صورت وابسته به غلظت می‌شود؛ در حالی که غلظت مورد نیاز برای مهار رشد پنجاه درصدی رده‌های سلولی غیر توموری RWPE-1 و PWR-1E، چهار برابر بیشتر از غلظت مورد نیاز برای رده‌های سلولی LNCaP و DU-145 می‌باشد؛ بر این اساس به نظر می‌رسد حساسیت به اسید بوریک به مکانیسم یا مکانیسم‌هایی وابسته است که در سلول‌های توموری نسبت به غیر توموری بیشتر بیان می‌شود. اسید بوریک در این رده‌های سلولی سبب القاء آپوپتوز نمی‌شود و مکانیسم مهار رشد وابسته به مرگ سلولی نیست بلکه وابسته به مهار تکثیر سلولی می‌باشد (20). اسکوری و همکاران نیز نشان داده‌اند که اسید بوریک سبب مهار رشد رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه انسانی می‌شود ولی باعث القاء آپوپتوز نمی‌گردد (22)؛ بنابراین نتایج به دست آمده در تحقیق انطباق بسیار نزدیکی با نتایج به دست آمده از دیگر سلول‌ها در بعد مهار چشم‌گیر رشد و فقدان آپوپتوز نشان می‌دهد.

نتایج ما حاکی از این بود که غلظت  $1/5$  میلی مولار سبب مهار رشد تقریباً 50 درصدی سلول‌های

چون تغییر و مهار چرخه سلول عموماً پیش‌مقدمه اکثر فرایندهای تمایز است لذا اثرات اسید بوریک بر چرخه سلولی سلول‌های تیمار شده نیز بررسی گردید. نتایج نشان داد که سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک در غلظت 9 میلی مولار با گذشت زمان، در مقایسه با سلول‌های کنترل، توقف چشمگیر چرخه سلولی در مرحله  $G_1$  را نشان می‌دهد (شکل 4)؛ به عنوان مثال در میان سلول‌های کنترل، سلول‌های موجود در مراحل  $G_1$ ، S و  $G_2$  به ترتیب 55، 23 و 22 درصد از جمعیت کل سلولی را تشکیل می‌دادند در حالی که این مقادیر برای سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک به مدت 2 روز به ترتیب 68، 12 و 20 درصد ( $p < 0/008$ )، در 4 روز معادل 96، 2/5 و 1/5 درصد ( $p < 0/0001$ ) و در 6 روز معادل 98، 1/5 و 0/5 درصد ( $p < 0/0001$ ) بود. این داده‌ها حاکی از آن است که اسید بوریک سبب توقف کامل چرخه سلولی در مرحله  $G_1$  به خصوص در زمان‌های 4 روز و بعد از آن می‌شود.



شکل 4. اثرات اسید بوریک بر چرخه‌ی سلولی K562. سلول‌های K562 به مدت 2، 4 و 6 روز با غلظت 9 میلی مولار بوریک اسید تیمار شد و درصد سلول‌ها در هر مرحله‌ی چرخه‌ی سلولی به کمک دستگاه فلوسایتمتر مطابق مواد و روش‌ها محاسبه شد.



القاء تمایز مونوسیتی - ماکروفاژی علاوه بر جنبه‌ی درمانی از دیدگاه زیست‌شناسی به عنوان مدل جدی برای بررسی این نوع تمایز نیز قابل پیشنهاد است.

از نقطه نظر مکانیسمی و با توجه به اطلاعات موجود یکی از شناخته شده‌ترین برهم‌کنش‌های اسید بوریک با محتویات سلولی بر هم‌کنش آن با نوکلئوتیدها می‌باشد. به نظر می‌رسد تشکیل کمپلکس‌های نوکلئوتید-بورات سبب تغییر عملکرد نوکلئوتیدها شود که به نوبه خود می‌تواند مکانیسم احتمالی اثر اسید بوریک در مهار رشد سلول‌های سرطانی محسوب گردد (28)؛ از طرف دیگر نشان داده شده است که اسید بوریک به عنوان یک آنتاگونیست برای گیرنده‌ی ریانودین که در رها سازی کلسیم از شبکه آندوپلاسمی نقش دارد نیز عمل می‌کند. این مطالعه که توسط هندرسون و اکخرت صورت گرفته تعدیل پیام‌رسانی کانال کلسیم ریانودین و اختلال در پیام‌رسانی کلسیم را علت اثر اسید بوریک در پیش‌گیری از سرطان پروستات پیشنهاد کرده است (29). گرچه در این مطالعه مکانیسم اثر اسید بوریک در سلول‌های K562 مورد مطالعه قرار نگرفته است ولی با توجه به این که ریانودین در سلول‌های K562 بیان نمی‌شود (30) به نظر می‌رسد مکانیسم عمل اسید بوریک در مهار رشد این سلول‌ها متفاوت از مکانیسم پیشنهادی در رده‌های سلولی سرطانی پروستات باشد و بیشتر به برهم‌کنش آن با نوکلئوتیدها مربوط گردد. بررسی این مسئله نیازمند آزمایشات بیشتر است.

### نتیجه‌گیری

اهمیت مطالعه حاضر بر این واقعیت استوار است که تمایز درمانی می‌تواند به عنوان یک راهکار مهم در CML مطرح گردد و در این میان یافتن ترکیبات مناسب تمایز دهنده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مقاله حاضر ما برای اولین بار نشان دادیم که اسید بوریک توانایی القاء مهار تکثیر سلولی و تمایز در سلول‌های K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی CML را دارا بوده و می‌تواند به

لوسمیک در روز چهارم می‌شود و این غلظت گرچه نسبت به غلظت‌های دارویی ضد سرطان به بالاتر می‌باشد ولی با توجه به این که در نواحی از ترکیه آب آشامیدنی حاوی اسید بوریک با غلظت تقریبی 3 میلی‌مولار می‌باشد و عوارضی در طول سالیان متمادی و در نسل‌های مختلف در این مناطق مشاهده نشده است به نظر می‌رسد عوارض جانبی برای بدن انسان نداشته باشد (25)؛ همچنین بازه غلظتی اثرات اسید بوریک در سلول‌های K562 هم‌خوانی با اثرات این ترکیب در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه دارد. به علاوه به عنوان یک اثر جدید اسید بوریک ما نشان دادیم که این ترکیب سبب القاء تغییرات ریخت‌شناسی مرتبط با تمایز می‌شود. در واقع توقف چرخه سلولی در فاز G<sub>1</sub> که بر طبق گزارشات متعدد پیش شرط وقوع تمایز سلولی می‌باشد (26) به همراه توانایی بیگانه‌خواری سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک تأیید کننده وقوع تمایز مونوسیتی - ماکروفاژی می‌باشد. بارانکو و اکخرت نیز گزارش کرده‌اند که اسید بوریک سبب تغییر در ظاهر رده‌ی سلولی DU-145 سرطان پروستات می‌شود به طوری که سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک در مقایسه با سلول‌های کنترل دچار کاهش حجم شده و به شدت گرانول دار می‌شوند؛ همچنین مشاهدات آنها حاکی از آنست که اسید بوریک سبب پیری سلول‌های DU-145 می‌شود (16)؛ به این ترتیب به نظر می‌رسد القاء پیری همراه با تغییرات ظاهری نشانه‌ای از تمایز نهایی باشد (27). صرف نظر از این موارد القاء تمایز مونوسیتی - ماکروفاژی در سلول‌های K562 یک نکته جالب دیگر را نیز نشان می‌دهد، در واقع اکثر داروهایی که تاکنون توانایی تمایز داشته‌اند باعث القاء تمایز اریترئوئیدی و در مواردی مگاکاریوسیتی این سلول‌ها گردیده‌اند (12) و تاکنون گزارش‌های معدودی از تمایز سلول‌های K562 به سمت رده‌ی مونوسیتی - ماکروفاژی وجود دارد؛ به عنوان مثال به تترا دکانوئیل فوربال استات (Tetradecanoyl phorbol acetate) به عنوان مهمترین دارویی که توانایی القاء تمایز ماکروفاژی در سلول‌های K562 دارد می‌توان اشاره کرد (13)؛ لذا اثر اسید بوریک در

9. Moosavi M, Yazdanparast R. Differentiation therapy as an effective strategy for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Med Hypotheses*. 2006;67(6):1470-1.
10. Lozzio B, Lozzio C. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1977 Jan; 19(1): 136.
11. Law J, Ritke M, Yalowich J, Leder G, Ferrell R. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res*. 1993 Dec;17(12):1045-50.
12. Iwasaki K, Mackenzie E, Hailemariam K, Sakamoto K, Tsuji Y. Hemin-mediated regulation of an antioxidant-responsive element of the human ferritin H gene and role of Ref-1 during erythroid differentiation of K562 cells. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr; 26(7): 2845-56.
13. Limb J, Yoon S, Lee K, Kim B, Lee S, Bae Y, et al. Regulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells by FosB, a member of the Fos family of AP-1 transcription factors. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jun; 66(11-12): 1962-73.
14. Hunt C. Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biol Trace Elem Res*. 1998; 66(1-3): 205-25.
15. Devirian T, Volpe S. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):219-31.
16. Barranco W, Eckhart C. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2006 Mar;94(6):884-90.
17. Cui Y, Winton M, Zhang Z, Rainey C, Marshall J, De Kernion J, et al. Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep*. 2004 Apr; 11(4):887-92.
18. Korkmaz M, Uzgören E, Bakirdere S, Aydin F, Ataman O. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environ Toxicol*. 2007 Feb; 22(1): 17-25.
19. Gallardo-Williams M, Chapin R, King P, Moser G, Goldsworthy T, Morrison J, et al. Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol*. 2004 Jan-Feb;32(1):73-8.

عنوان یک داروی جدید جهت تمایز درمانی در درمان مبتلایان به CML مورد آزمایشات بیشتر قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

حمایت مالی این کار از محل طرح پژوهشی و پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت گرفته و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند بدین وسیله مراتب تشکر خود را از جناب آقای دکتر رستمی، دکتر حقیقت و دیگر همکاران ابراز نمایند.

### منابع

1. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, LeukemiaNet E. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007 Jul; 370(9584): 342-50.
2. Goldman J. Treatment strategies for CML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Sep; 22(3): 303-13.
3. Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Witte O. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. *Blood*. 2003 May;101(10):4088-97.
4. Goldman J. Initial treatment for patients with CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:453-60.
5. Thiesing J, Ohno-Jones S, Kolibaba K, Druker B. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood*. 2000 Nov;96(9):3195-9.
6. Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Furukawa Y, Kano Y, Yamada H. Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. *Mol Cell Biochem*. 2004 Mar;258(1-2): 25-33.
7. Ikeda A, Shankar D, Watanabe M, Tamanoi F, Moore T, Sakamoto K. Molecular targets and the treatment of myeloid leukemia. *Mol Genet Metab*. 2006 Jul;88(3):216-24.
8. Cao T, Heng B. Differentiation therapy of cancer. Potential advantages over conventional therapeutic approaches targeting death of cancer/tumor cells. *Med Hypotheses*. 2005; 65(6): 1202-3.

20. Barranco W, Eckhert C. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* 2004 Dec;216(1):21-9.
21. Wang Y, Zhao Y, Chen X. Experimental study on the estrogen-like effect of boric Acid. *Biol Trace Elem Res.* 2008 Feb;121(2):160-70.
22. Scorei R, Ciubar R, Ciofrangeanu C, Mitran V, Cimpean A, Iordachescu D. Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biol Trace Elem Res.* 2008 Jun;122(3):197-205.
23. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991 Jun;139(2):271-9.
24. Cohen J, Kristal A, Stanford J. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jan;92(1):61-8.
25. Sayli B, Tüccar E, Elhan A. An assessment of fertility in boron-exposed Turkish subpopulations. *Reprod Toxicol.* 1998 May-Jun; 12(3): 297-304.
26. Yan J, Luo D, Luo Y, Gao X, Zhang G. Induction of G1 arrest and differentiation in MDA-MB-231 breast cancer cell by boehmeriasin A, a novel compound from plant. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16(1):165-70.
27. Wier M, Scott R. Regulation of the terminal event in cellular differentiation: biological mechanisms of the loss of proliferative potential. *J Cell Biol.* 1986 May;102(5): 1955-64.
28. Kim D, Faull K, Norris A, Eckhert C. Borate-nucleotide complex formation depends on charge and phosphorylation state. *J Mass Spectrom.* 2004 Jul;39(7):743-51.
29. Henderson K, Eckhert C. Boric acid is a modulator of stored calcium release in DU-145 prostate cancer cells. *The FASEB Journal.* 2008;22(1\_MeetingAbstracts):1181.16.
30. Bennett D, Cheek T, Berridge M, De Smedt H, Parys J, Missiaen L, et al. Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J Biol Chem.* 1996 Mar;271(11):6356-62.