

پاسخ وابسته به دوز و زمان رده سلولی لوکمیایی NB4 به تیمار با داروی آرسنیک تری اکسید

نویسندگان: مائده شریفی زاده^{۱*}، مهرداد هاشمی^۲، علی ناظمی^۳

۱- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۲- استادیار- گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، ایران

۳- استادیار- گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران

* نویسنده مسئول: مائده شریفی زاده Email: maedeh.sharifizadeh@gmail.com

چکیده

مقدمه و هدف: آرسنیک تری اکسید (ATO) در مقام دارویی توانمند برای درمان سرطان پرومیلوسیتیکی خون (APL) محسوب می‌شود، به‌ویژه در بیماران که به عود سرطان دچار شده‌اند. با وجود این، ساختار عمل آن، هنوز به‌طور کامل مشخص نیست. در این تحقیق، اثرهای سایتوتوکسیک این دارو روی سلول‌های سرطانی APL بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پژوهشی تحلیلی، رده سلولی NB4 در جایگاه مدلی برای ارزیابی اثرهای سایتوتوکسیک آرسنیک تری اکسید در سلول‌های APL به‌کاررفته است. سلول‌های NB4 در حضور غلظت‌های مختلف $0.5 \mu\text{M}$ ، $1 \mu\text{M}$ و $2 \mu\text{M}$ آرسنیک تری اکسید در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و تست MTT (دی متیل تiazول-دی فنیل تترازولیوم بروماید) روی آنها انجام شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از این آزمون نشان داد که آرسنیک تری اکسید به صورت وابسته به دوز و زمان، کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های NB4 و مهار رشد سلولی را باعث می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های لوکمیایی به‌شدت تحت تأثیر اثرهای سایتوتوکسیک آرسنیک تری اکسید قرار می‌گیرند که تأکیدی است بر نقش آن به عنوان یک عامل درمانی مؤثر در کنترل لوکمیای پرومیلوسیتیک حاد.

واژگان کلیدی: لوکمیای پرومیلوسیتیکی حاد، سلول‌های NB4، آرسنیک تری اکسید، سایتوتوکسیک

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم- شماره ۹۰
دی ۱۳۸۹

وصول: ۸۹/۶/۲۷
آخرین اصلاحات: ۸۹/۱۰/۲۵
پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۶

مقدمه

لوکمی پرومیلوسیتیک حاد یا (Acute APL promyelocytic Leukemia) اولین بار در دهه ۱۹۵۰ در مقام زیرمجموعه‌ای مجزا از لوکمی میلوئیدی حاد AML شناسایی شده که در نظام طبق بندی FAB ، AML-M₃ نامگذاری شده است. APL حدود ده تا پانزده درصد انواع AML را شامل می‌شود و اغلب در سنین چهل تا پنجاه سالگی رخ می‌دهد (۱). در سال ۱۳۸۳ در ایران بین تعداد کل سرطان‌های دستگاه خون‌ساز ثبت شده، فراوانی APL در بین زنان ، ۲/۲۲٪ و در بین مردان ۱/۳۶٪ ذکر شده بود (۲).

علت شایع ALP، (بیش از ۹۵٪ موارد) ترانس‌لوکاسیونی است که بین کروموزوم پانزده و هفده اتفاق می‌افتد. شکستگی در کروموزوم پانزده در ژن PML (Promyelocytic Leukemia) که یک عامل رونویسی سرکوب کننده رشد را کد می‌کند و در کروموزوم هفده در ژن Retinoic Acid RAR α (Receptor Alpha) که تمایز رده میلوئیدی را کنترل می‌کند، رخ می‌دهد (۳، ۴)؛ حاصل این ترانس‌لوکاسیون، ایجاد ژن فیوژن PML-RAR α است که یک پروتئین کایمیریک تولید می‌کند؛ این پروتئین مهار بلوغ سلول‌های میلوئیدی را در مرحله پرومیلوسیتی سبب می‌شود و تمایز نهایی سلول را مختل می‌کند (۵).

APL بدخیم ترین نوع لوکمیا حاد است که به علت خون‌ریزی شدید، فقط در عرض چند هفته به مرگ منجر می‌شود (۶) اما به دلیل درمان پذیر بودن آن به میزان بالا (بیش از ۸۰٪) در بین لوکمی‌های دیگر، منحصر به فرد است (۱). درمان بیماران APL با ATRA (All Trans Retinoic Acid) بهبود کلینیکی را در تقریباً ۹۰٪ افراد سبب می‌گردد. با وجود این در حال حاضر عود بیماری و مقاومت به درمان، بزرگ‌ترین مشکل در مورد APL است (۷). استفاده از آرسنیک تری اکسید از اوایل دهه ۱۹۹۰ توانست در درمان بیمارانی که به عود سرطان دچار شده بودند به خوبی مفید واقع شود (۸). امروزه آرسنیک در مقام درمان برگزیده برای APL شناخته شده-

است که می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی منفرد (بدون نیاز به ATRA و شیمی‌درمانی)، القای بهبودی کامل (CR) را در بیماران APL باعث شود (۹).

آرسنیک، یکی از عناصر طبیعی بوده و بیش از ۲۴۰۰ سال است که کاربرد دارویی دارد. آرسنیک در جایگاه قدیمی‌ترین دارو در جهان برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از سفلیس گرفته تا انواع سرطان استفاده می‌شود (۱۱، ۱۰). آرسنیک تری اکسید در غلظت‌های پایین از طریق تجزیه کردن پروتئین فیوژن PML-RAR α ، القای تمایز را در پرومیلوسیت‌های سرطانی سبب می‌شود؛ در حالی که در غلظت‌های بالا مهار رشد و القای آپوپتوز را در سلول‌های APL باعث می‌شود (۱۱). با وجود اثبات مؤثر بودن داروی آرسنیک در درمان بیمارانی که به عود سرطان دچار شده‌اند در دهه نود، به دلیل نامشخص بودن ماهیت سایتوتوکسیکی، حساسیت به میزان دوز دارو، میزان کارایی و تأثیر دارو روی بیماران APL که پیش از آن هیچ درمانی دریافت نکرده‌اند (در اولین مرحله درمان، نه در مرحله عود سرطان) هنوز داروی آرسنیک به طور متداول برای درمان بیماران استفاده نمی‌شود. علاوه بر این، نحوه اثر آن روی سلول‌های لوکمیا NB4 هنوز به خوبی مشخص نشده است (۸)؛ به همین دلیل، ما در این پژوهش، اثرهای مهار رشد و توکسیسیته ایجاد شده با دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید روی سلول‌های سرطانی NB4 را توسط تست MTT بررسی می‌کنیم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق پژوهشی تحلیلی، رده سلولی NB4 دارای ترانس‌لوکاسیون t(15,17) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال تهیه شد؛ این سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Gibco آمریکا) حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین (Biosera انگلستان) و در انکوباتور ۳۷ درجه و پنج درصد دی اکسید کربن رشد یافتند.

صورت کریستال‌های آبی فورمازون دیده می‌شود. تترازولیوم زرد توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز در سلول‌های زنده شکسته شده، فورمازون غیر محلول را در آب تولید می‌کند که جذب نوری آن با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. میزان تجمع فورمازون نشان‌دهنده میزان فعال بودن این آنزیم و در نتیجه میزان بقای سلول‌ها است.

برای تهیه محلول MTT با غلظت 0.5mg/ml، 50mg از پودر MTT در 10ml از 0.15 M PBS حل شد. صد میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که محتوی 5000 تا 10000 سلول است داخل هر ول از پلیت 96 خانه‌ای ریخته شد. سه نمونه به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند و به 3 خانه اول این پلیت، 100µl از سلول‌های تیمار نشده اضافه شد. در خانه‌های دیگر این پلیت، سلول‌ها با دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید و در زمان‌های متفاوت تیمار شدند. در تمامی موارد برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد و به صورت تریپلیکیت عمل شد؛ سپس 100 µl از معرف MTT 0.5mg/ml به هر ول افزوده شد. پس از 3 تا 4 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، 100 µl محلول DMSO به هر چاهک اضافه و خوب پی پتینگ شد. در پایان میزان ODهای این سلول‌ها در طول موج 570 نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت شد. میزان توکسیسیتی و درصد بقای سلول‌ها با توجه به مقادیر OD به دست آمده و با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

برای تیمار دارویی، تمام سلول‌ها می‌بایستی با یکدیگر انطباق زمانی داشته باشند یعنی، همه در یک فاز رشدی قرار گیرند؛ بدین منظور بعد از پاساژ دادن، به آنها محیط کشت بدون سرم اضافه شد که باعث می‌شود سلول‌ها زنده بمانند و عدم وجود FBS در آن موجب می‌شود سلول‌ها دیگر رشد نکرده، همه در یک فاز باقی بمانند.

برای تیمار دارویی سلول‌ها از آمپول‌های آرسنیک که غلظت آنها 5000Mµ است استفاده شد. به دلیل غلظت بالای آمپول‌های آرسنیک، ابتدا استوکی با غلظت 100 Mµ از آن در حجم 10ml یا 10000 µl ساخته شد و سپس محلول دارویی مورد نیاز، از این استوک همراه با محیط کشت سرم‌دار تهیه شد. به منظور تعیین اثرهای بهینه دارو، دو متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی با غلظت‌های 0.5Mµ، 1Mµ و 2Mµ آرسنیک تری اکسید و با رعایت فواصل زمانی 48، 72 و 96 ساعت مورد تیمار قرار گرفتند. بررسی‌های فارماکوکینتیکی نشان داده که این غلظت‌ها معادل وزن جرمی 0.15 mg kg^{-1} آرسنیک است که روزانه به بیمار تزریق می‌شود و بی‌درنگ، پس از تزریق، یک پیک 5.5-7.5 Mµ آرسنیک در پلاسما حاصل می‌کند که به سرعت به سطح پایدارتر 2-1 Mµ کاهش می‌یابد و محدوده درمانی آرسنیک تری اکسید است (12، 13). از تست MTT برای تعیین بقای سلول‌ها استفاده شد.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) یک روش سنجش کالریمتریک برای اندازه‌گیری توان حیاتی سلول و اثرهای سایتوتوکسیک آن است. اساس این روش بر پایه تغییر تترازولیوم زرد است که در آب غیر محلول بوده، به-

میانگین جذب نوری سلول‌ها در حضور ماده توکسیک

$$\text{میانگین جذب نوری سلول‌های کنترل} = \frac{1 - \text{درصد سایتوتوکسیسیتی}}{1}$$

درصد توکسیسیتی - 100 = درصد بقا

در این مطالعه، کلیه آزمایش‌ها چندبار تکرار شد که با گرفتن میانگین و تخمین انحراف معیار، میزان تغییرها محاسبه شد. آزمون T و آنالیز واریانس یک‌طرفه برای

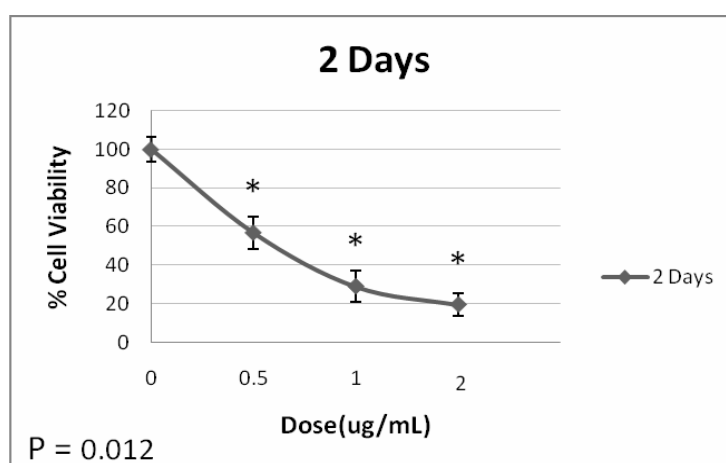
مقایسه داده‌ها و تحلیل آنها به کار رفتند. $p < 0.05$ معنی - دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با استفاده از تست MTT مشخص شد. (شکل‌های ۱، ۲ و ۳)

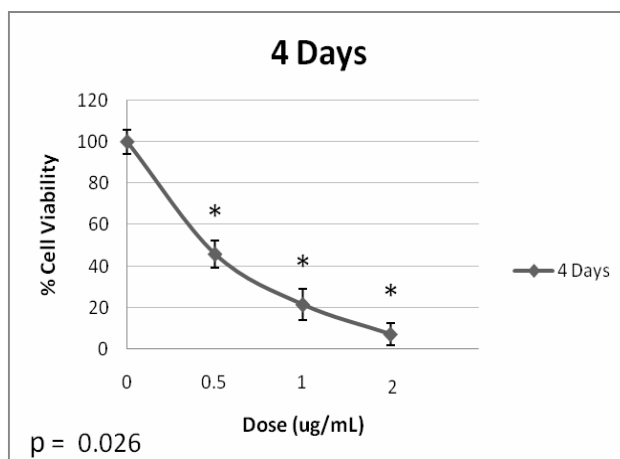
داده‌های نشان‌داده‌شده در این نمودارها مشخص می‌کند که آرسنیک تری اکسید اثر سایتوتوکسیک معناداری روی سلول‌های NB4 اعمال می‌کند و بقای این سلول‌ها با افزایش هر یک از دوز یا زمان تیمار با آرسنیک کاهش می‌یابد.

برای تعیین اثر مهارى آرسنیک تری اکسید روی رشد و تکثیر سلول‌های لوکمیایی APL، سلول‌های NB4 با غلظت‌های $0.5\mu\text{M}$ ، $1\mu\text{M}$ و $2\mu\text{M}$ آرسنیک به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و سپس میزان بقای سلولی



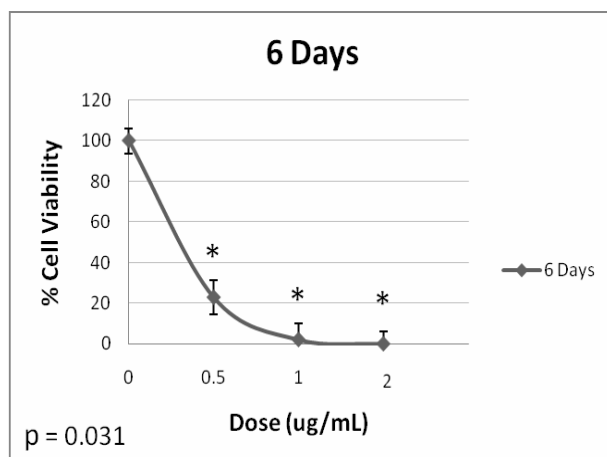
شکل ۱. درصد بقای سلول‌های NB4 که به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید قرار گرفته‌اند.

هر نقطه نمایانگر سه آزمایش و سه چاهک برای هر دوز بوده، P-value محاسبه شده کمتر از ۰/۰۵ است.

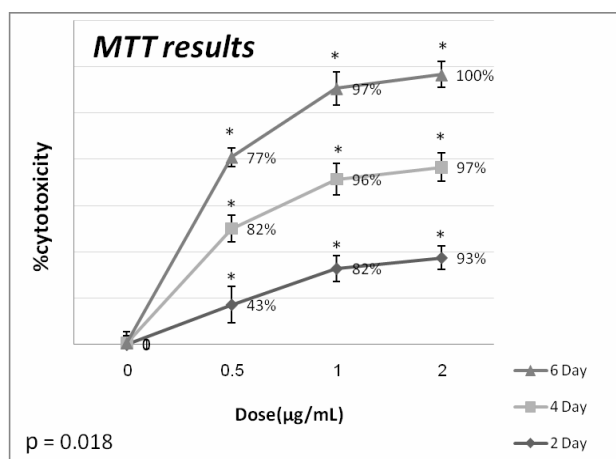


شکل ۲. درصد بقای سلول‌های NB4 بر اساس تست MTT

سلولهای سرطانی NB4 به مدت ۴۸ ساعت با آرسنیک تری اکسید تیمار شده‌اند.



شکل ۳. درصد بقای سلول‌های NB4 تیمار شده با دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید پس از مدت زمان ۷۲ ساعت



شکل ۴. میزان اثر سایتوتوکسیک آرسنیک تری اکسید روی سلول‌های سرطانی NB4. در این نمودار میزان مهار رشد سلولی بر اساس متغیرهای دوز و مدت زمان استفاده از دارو نشان داده شده است.

است که با افزایش دوز دارو در زمان ۲۴ ساعت، درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد.

همان‌گونه که نمودار شکل دو نشان می‌دهد با گذشت ۴۸ ساعت از مصرف دارو، آرسنیک تری اکسید اثر سایتوتوکسیک معناداری روی سلول‌های NB4 گذاشته است.

نتایج نمودار شکل سه به وضوح نشان می‌دهد که پس از ۷۲ ساعت تیمار با دوزهای مختلف آرسنیک تری اکسید، بقای سلول‌های NB4 به شدت کاهش یافته است و در دوز $2 \mu\text{g/mL}$ به صفر رسیده است که بیشترین میزان سایتوتوکسیسیته وجود دارد.

در شکل یک، سلول‌های سرطانی NB4 همان‌گونه که در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد با غلظت‌های مختلف آرسنیک تری اکسید به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و میزان بقای سلولی بر اساس تست MTT تعیین شد. با توجه به نمودار شکل ۱ مشخص است که با افزایش دوز دارو در زمان ۲۴ ساعت، درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد.

در شکل یک، سلول‌های سرطانی NB4 همان‌گونه که در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد با غلظت‌های مختلف آرسنیک تری اکسید به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و میزان بقای سلولی بر اساس تست MTT تعیین شد. با توجه به نمودار شکل ۱ مشخص

همان‌گونه که از منحنی شکل ۴ برمی‌آید هرچه سلول‌های سرطانی در زمانی طولانی‌تر با دارو تحت تیمار قرار گرفته‌اند، میزان رشدشان کمتر شده‌است؛ همچنین در دوزهای بالاتر ممانعت از رشد سلولی سریع‌تر و به میزان بیشتری صورت گرفته‌است. نتایج تست MTT این تحقیق به‌خوبی مؤثر بودن داروی آرسنیک تری اکسید در مهار رشد سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهد.

بحث

ما در این طرح تحقیقی با هدف تعیین اثرهای مهارتی آرسنیک تری اکسید روی رشد و تکثیر سلول‌های لوکمیایی APL نشان دادیم که تیمار سلول‌های سرطانی NB4 با آرسنیک تری اکسید ایجاد سایتوتوکسیسیته و مهار رشد سلول‌های سرطانی را هم به صورت وابسته به دوز و هم به صورت وابسته به زمان باعث می‌شود.

در ارتباط با بررسی اثرهای سایتوتوکسیک آرسنیک، Tchounwou و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که آرسنیک تری اکسید، مهار رشد سلول‌های HepG2 کارسینومای کبدی را باعث می‌شود و LD50 معادل 8.55 μg/mL را برای ۴۸ ساعت تیمار نتیجه گرفتند (۱۴). در سال ۲۰۰۳، Cai و همکارانش مشاهده کردند که ارتباط تنگاتنگی بین آپوپتوز القا می‌شود توسط آرسنیک و توقف میتوزی وجود دارد؛ این پژوهشگران گزارش کردند که آرسنیک ممکن است در قطع تقسیم میتوزی از سم‌های میکروتوبولی تقلید کند و توقف میتوزی می‌تواند یک روش مشترک در القای آپوپتوز آرسنیک در اغلب سلول‌های سرطانی باشد (۱۵). در سال ۲۰۰۶، Yedjou و همکارانش، اثرهای سایتوتوکسیک آرسنیک را روی سلول‌های (Human leukemia) HL60 با استفاده از تست MTT بررسی کردند و مشاهده کردند که آرسنیک به صورت وابسته به دوز و زمان رشد سلول‌های HL60 را مهار می‌کند (۱۶). در راستای ادامه این پژوهش‌ها ما اثرهای سایتوتوکسیک آرسنیک را روی سلول‌های

لوکمیایی NB4 نشان دادیم و مشاهده کردیم که دوزهای پایین آرسنیک تری اکسید کم‌ترین میزان توکسیسیته را در زمان ۲۴ ساعت در سلول‌های NB4 القای کنند و جالب اینکه این غلظت‌ها، همان دوزهای مؤثر درمانی آرسنیک‌اند که نشان داده شده در بیماران APL، القای بهبودی کامل (CR) را با کم‌ترین توکسیسیته باعث می‌شوند. از نظر کلینیکی، دوز استاندارد برای درمان بیماران APL، 0.15 mg/kg در روز است که نتیجه‌ای معادل دوز ۱-۲ μM در پلاسما می‌دهد (۱۷). غلظت‌های بالاتر آرسنیک تری اکسید (۵ μg/mL) به بالا در ۲۴ ساعت، القای بیش از ۵۰٪ مرگ‌ومیر سلولی را سبب می‌شود؛ چنین اثرهایی به‌خوبی در مطالعات کلینیکی با انواع آزمایش‌ها مشاهده شده‌است (۱۸).

آرسنیک روی سلول‌های سرطانی APL اثری وابسته به دوز اعمال می‌کند. آرسنیک تری اکسید در غلظت‌های پایین (۰/۵ - ۰/۱ μM) پروتئین فیوژن PML-RARα را تجزیه می‌کند (۱۹،۱۰) در نتیجه با غلبه بر اثر منفی فیوژن روی عملکرد طبیعی PML و RARα و تغییر در بیان ژن‌ها و مسیرهایی که این فاکتورهای رونویسی در آن نقش داشتند، القای تمایز در پرومیلوسیت‌های سرطانی را موجب می‌شود (۲۰). غلظت‌های بالای آرسنیک تری اکسید (۲-۰/۵ μM) مسیرهای آپوپتوز پرومیلوسیت‌ها و سایر سلول‌های سرطانی را از طریق شیوه‌های مختلف هدف قرار می‌دهد (۲۰، ۷).

آرسنیک در مقام قدیمی‌ترین داروی جهان، هم در طب سنتی چین و هم در پزشکی غرب کاربرد داشته‌است و تاریخچه استفاده از آن به ۳۷۰ سال قبل از میلاد برای درمان زخم‌های پوستی و ۲۶۳ سال قبل از میلاد در درمان تب مالاریا برمی‌گردد (۲۱). با وجود این کارسینوژنسیته آن نیز به‌خوبی اثبات و مشخص شده که تغییر در پیام‌رسانی سلولی شامل تولید ROS، فسفریلاسیون تیروزین، سیگنالینگ MAPK، فعال-سازی مسیر NF-κB، مهار چرخه سلولی و آپوپتوز به‌طور مستقیم با کارسینوژنسیته آرسنیک در ارتباط است (۲۲).

القاکنند (۲۹)؛ بنابراین توجه روزافزونی نسبت به آرسنیک تری اکسید به عنوان عامل درمانی بالقوه به‌ویژه در بدخیمی‌هایی که با درمان‌های قراردادی به عود سرطان دچار می‌شوند به‌وجود آمده‌است. شیوه‌های عمل متعددی که آرسنیک تری اکسید از طریق آنها، القای تمایز و آپوپتوز را سبب می‌شود، ظرفیت بالای آن را برای کاربردهای کلینیکی به‌ویژه در ترکیب با سایر عوامل برای کنترل طیف وسیعی از بدخیمی‌ها اثبات می‌کند. ترکیب آرسنیک تری اکسید با ATRA می‌تواند در بهبود اثرهای درمانی هر دو دارو مفید باشد و از دوز توکسیک آنها بکاهد. از آنجایی که در ایران، بر خلاف سایر کشورها، آرسنیک تری اکسید در اولین مرحله درمان بیماران APL استفاده می‌شود تحقیق‌های آتی روی این درمان‌های ترکیبی می‌تواند افقی جدید در درمان این بیماران در کشورمان بگشاید (۳۰، ۳۱).

از دیدگاه بیوشیمیایی به‌خوبی مستند شده‌است که آرسنیک می‌تواند با اتصال به گروه‌های سولفیدریل، بعضی آنزیم‌های مهم را غیر فعال کند. علاوه بر این، آرسنیک قادر است با جابه‌جایی گروه‌های فسفات در واکنش‌های بیوشیمیایی و فرآیندهای فسفریلاسیون - دفسفریلاسیون مداخله کند (۱۱)؛ همچنین نشان‌دهنده‌است که آرسنیک می‌تواند در پستانداران، ناهنجاری‌های کروموزومی، تعویض کروماتیدهای خواهری، اتصالات عرضی پروتئین - DNA و ایجاد شکست در رشته‌های DNA متصل به پروتئین را سبب شود (۲۳).

ROS می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ سلولی را که بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند، تحت تأثیر قرار دهد (۲۴). ROS، پراکسید هیدروژن، سوپر اکسید آنیون، رادیکال هیدروکسیل، پراکسیل و آلکوکسیل را شامل می‌شود. به‌تازگی ثابت شده که این مولکول‌ها در تنظیم بسیاری وقایع مهم سلولی از جمله فعال‌سازی عوامل رونویسی، تغییر در بیان ژن‌ها، تمایز و تکثیر سلولی نقش دارند (۲۵، ۲۶). تصور می‌شود که تولید ROS توسط آرسنیک، مهم‌ترین علت کارسینوژنسیستی آن است (۲۷). اگرچه سلول‌ها واجد ساختارهای آنتی‌اکسیدانتی برای کنترل وضعیت ردوکس خود هستند که برای حیات سلول ضروری است ولی گاهی ROS بیش از حد تولید می‌شود و فعال‌شدن پدیده‌هایی را سبب می‌گردد که به مرگ یا بقا در بعضی انواع سلولی منجر می‌شود (۲۵). افزایش استرس اکسیداتیو به‌طور مستقیم به القای آپوپتوز توسط آرسنیک مرتبط است (۲۸). تجمع ROS درون سلولی توسط آرسنیک تری اکسید به هدر رفتن پتانسیل غشایی میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم C، و در پی آن، فعال‌سازی کاسپازها و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی‌شده منجر می‌شود (۷).

مطالعات *in vitro* نشان‌دهنده که مشتقات آرسنیک به واقع، فعالیت آنتی‌نئوپلاستیک گسترده‌ای فراتر از APL دارند. آرسنیک می‌تواند در بدخیمی‌هایی از جمله میلومای چندگانه، لوکمای لنفوسیتی مزمن، لیمفومای non-Hodgkin's و انواع تومورهای سفت آپوپتوز را

منابع

1. Francesco Lo-Coco¹, Emanuele Ammatuna¹, Miguel A. Sanz. Current treatment of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2007; 92:289-91.
2. Ziaei JE. High frequency of acute promyelocytic leukemia in northwest Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5:188-89
3. Chomienne C, Lanotte M, degos L, dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nat* 1990; 347(6293): 558-61.
4. Paolo Salomoni, Pier Paolo Pandolfi. The Role of PML in Tumor Suppression, *Cell* 2002;108:165-70.
5. Sanz, Grimwade, Tallman. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2009; 113:1875-91.
6. Martin S. Tallman. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia . *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2007; 20:57-65.
7. Zhen-Yi Wang, Zhu Chen. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable *Blood* 2008; 111:2505-15.
8. Donna Amran, Yolanda Sanchez, Carlos Fernandez. Arsenic trioxide sensitizes promonocytic leukemia cells to TNF-induced apoptosis via p38-MAPK-regulated activation of both receptor-mediated and mitochondrial pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1773:1653-63.
9. Zuanel Diaz, Myrian Colombo, Koren K. Mann, Haixiang Su. Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines, *Blood* 2005; 105:1237-45.
10. Kim JH, Yu YS, Kim DH, Kim CJ, Kim KW. Antitumor activity of arsenic trioxide on retinoblastoma: cell differentiation and apoptosis depending on arsenic trioxide concentration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:1819-23.
11. Jun Zhu, Zhu Chen, Valérie Lallemand-Breitenbach. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Reviews* 2002; 2:1-9.
12. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997; 89:3354-60.
13. Momeny M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Ghaffari H. Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B mediated inhibition of p73 transcription and prevention of NF- κ B-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-XL and survivin, *Med Oncol* 2009.
14. Tchounwou, P.Wilson, B.Abdelgnani, A. Ishaque, A.Patlolla. Differential cytotoxicity and gene expression in human liver Carcinoma (HepG2) cells exposed to arsenic trioxide and monosodium acid methanearsonate (MSMA). *Int J Mol Sci* 2002; 3:1117-32.
15. X. Cai, Y. Yu, Y. Huang, L. Zhang, P.M. Jia, Q. Zhao. Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells, *Leukemia* 2003; 17:1333-37.
16. Clement Yedjou, Pamela Moore, Paul B. Tchounwou. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2006; 3:136-40.
17. Soignet, Frankel, Douer, Tallman, Kantarjian, Calleja. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Oncol* 2001; 19:3852-60.
18. Amadori, S. Fenaux, P. Ludwig. Use of arsenic trioxide in haematological malignancies: insight into the clinical development of a novel agent. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 403-11.
19. Pierre J. Dilda, Philip J. Hogg. Arsenical-based cancer drugs, *Cancer Treatment Reviews* 2007; 33:542:64.
20. James L.Slack, Samuel Waxman, Guido Tricot, Martin S.Tallman. Advances in the Management of Acute Promyelocytic Leukemia and Other Hematologic Malignancies with Arsenic Trioxide. *The Oncologist* 2002; 7:1-13.
21. Yong Qian, Vince Castranova, Xianglin Shi. New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction, *J of Inorganic Biochem* 2003; 96:271-78.
22. Steven L. Soignet, Peter Maslak, Zhu-Gang Wang, Suresh Jhanwar. Complete Remission after Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with Arsenic Trioxide. *N Engl J Med* 1998; 339:1341-48.
23. Kirk T. Kitchin, Kathleen Wallace. Evidence against the nuclear in situ binding of arsenicals-oxidative stress theory of arsenic carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 232:252-57.
24. Chuanshu Huang, Qingdong Ke, Max Costa, Xianglin Shi. Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol and Cell Biochem* 2004; 255:57-66.
25. Yong Hwan Hana, Sung Zoo Kima, Suhn Hee Kima, Woo Hyun Park. Arsenic trioxide inhibits the growth of Calu-6 cells via inducing a G2 arrest of the cell cycle and apoptosis accompanied with the depletion of GSH. *Cancer Lett* 2008; 270(1):40-55.
26. H.U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5:415-18.
27. Wen-Chien Chou, Chunfa Jie, Andrew A. Kenedy. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *PNAS* 2004; 101:4578-83.
28. Jie Wang 1, Lingna Li 1, Hui Cang, Guiying Shi, Jing Yi. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells, *Leukemia research* 2007;1-8
29. Mathews V, George B, Lakshmi KM. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood* 2006; 107: 2627-32.
30. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH. Treatment of acute promyelocytic leukemia without ATRA and/or chemotherapy. *Ann Oncol* 2006; 17:131-134.
31. Miguel A. Sanz, Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia, *Hematology* 2006: 147-155

Daneshvar

Medicine

Dose- and time-dependent response of human leukemia cell line NB4 to arsenic trioxide treatment

Maedeh Sharifzadeh¹, Mehrdad Hashemi², Ali Nazemi³

1. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor – School of Medicine, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor –Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon.

Email: maedeh.sharifzadeh@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Although arsenic trioxide has been shown to be a potential drug in treatment of APL, most notably in patients with relapsed APL, the underlying mechanisms remains unclear. In this study, the cytotoxic effect of ATO on APL cancer cells was evaluated.

Materials and Methods: In this basic-applied study, the human leukemia (NB4) cell line was used as a model to evaluate the cytotoxic effects of arsenic trioxide in APL cells. NB4 cells were exposed to different concentrations of ATO (0.5, 1, 2 μ M) for 2, 4 and 6 days and dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was applied to them.

Results: Data obtained from this assay indicated that arsenic trioxide significantly reduced the viability of NB4 cells and inhibited cell growth in a time and dose dependent manner.

Conclusion: Findings from the present study indicate that arsenic trioxide is highly cytotoxic to human leukemia cells, supporting its use as an effective therapeutic agent in the management of acute promyelocytic leukemia.

Key words: Arsenic trioxide, Acute promyelocytic leukemia, NB4 cells, cytotoxic

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Eighteenth Year,
No.90
December, January
2010-2011*

Received: 18/9/2010

Last revised: 15/1/2011

Accepted: 16/1/2011