

بررسی اثر ترکیبی داروی دفروکسامین و دوز پایین آرسنیک تری اکساید بر میزان زنده‌مانی و مهار پرولیفراسیون رده‌ی سلولی NB۴

کاظم غفاری^۱، دکتر احمد کاظمی^۲، دکتر شعبان علیزاده^۳، علی قاسمی^۱، ندا مینایی^۱، عباس قوطاسلو^۱، بهنوش طیبی^۴، دکتر محمدرضا رضوانی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد یکی از لوسمی‌های شایع رده‌ی میلوئیدی است. تدابیر درمانی مهم، استفاده از ترانس رتینوئیک اسید و در سال‌های اخیر آرسنیک تری اکساید می‌باشد. ترانس رتینوئیک اسید در برخی موارد باعث مقاومت به درمان و آرسنیک نیز در دوز بالا، سمی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر دفروکسامین، بر رده‌ی سلولی پرومیلوسیتیک حاد NB۴ جهت کاستن اثرات سمی دوز بالای آرسنیک می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه بعد از کشت و تکثیر رده‌ی سلولی NB۴، سلول‌ها با دوزهای مختلف دفروکسامین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) و دوز پایین آرسنیک (۰/۵ میکرومول) در ترکیب با دوزهای مختلف دفروکسامین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) تیمار شدند. پس از شمارش سلول‌ها، فعالیت متابولیک با روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و درصد زنده‌مانی با روش تریپان بلو تعیین گردید. از آزمون t و نرم‌افزار Excel برای بررسی داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: سلول‌های تیمار شده با دوزهای مختلف دفروکسامین به تنهایی و در ترکیب با آرسنیک، کاهش درصد زنده‌مانی و کاهش فعالیت سلولی وابسته به دوز و زمان را نشان دادند. دوز ترکیبی آرسنیک ۰/۵ میکرومول و دفروکسامین ۲۰۰ میکرومول بیشترین اثر را در کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی و دوز ۵۰ میکرومول دفروکسامین کمترین اثر را در زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که دفروکسامین اثربخشی قابل توجهی بر زنده‌مانی رده‌ی سلولی NB۴ دارد و همچنین باعث کاهش فعالیت سلولی می‌شود.

واژگان کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آرسنیک تری اکساید، دفروکسامین

ارجاع: غفاری کاظم، کاظمی احمد، علیزاده شعبان، قاسمی علی، مینایی ندا، قوطاسلو عباس، طیبی بهنوش، رضوانی محمدرضا. بررسی اثر ترکیبی داروی دفروکسامین و دوز پایین آرسنیک تری اکساید بر میزان زنده‌مانی و مهار پرولیفراسیون رده‌ی سلولی NB۴. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ۸۱۸-۸۲۷

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- استاد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL) یا Acute promyelocytic leukemia (AML-M۳) یا Acute myeloid leukaemia-M۳ یکی از انواع لوسمی‌های حاد میلوئیدی است که حدود ۱۰ درصد از مبتلایان به سرطان حاد میلوبلاستی را در بر می‌گیرد (۱). در این بیماری، تجمع سلول‌های غیر طبیعی خون‌ساز با ویژگی پرومیلوسیتی در مغز استخوان، غالب است. این بیماری به طور معمول با ناهنجاری کروموزومی (q۲۱;q۲۲) (۱۷؛۱۵) شناخته می‌شود، که در بیش از ۹۸ درصد بیماران مشاهده می‌گردد (۲).

این جابه‌جایی، ژن‌های گیرنده‌ی α اسید رتینوئیک (RAR α) و (Promyelocytic leukemia) PML را که به ترتیب روی کروموزم‌های ۱۷q و ۱۵q قرار گرفته‌اند، متصل می‌کند. پروتئین الحاقی ایجاد شده، نقش مهمی در لوکوموژنی APL ایفا می‌کند که پدیده‌ی تمایز در آن متوقف شده است (۳).

از طرف دیگر، این پروتئین الحاقی به عنوان گیرنده برای داروی ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) یا All trans retinoic acid (RAR α) پروتئین الحاقی و آزادسازی (Retinoic acid receptor alpha) می‌شود که نتیجه‌ی آن تمایز میلوئیدی است (۴). در بین لوسمی‌های میلوئیدی، APL به ATRA حساسیت بالایی نشان داده است که در ترکیب با شیمی درمانی موجب بهبودی بالینی موقت می‌شود، اما بیمار با دریافت ATRA بیشتر به آن مقاوم می‌شود و موجب عود (Relapse) بیماری می‌گردد (۵).

در مواردی که عود بیماری وجود دارد، داروی

آرسنیک تری اکساید (ATO یا Arsenic trioxide) داروی مناسبی می‌باشد. آرسنیک در دوزهای پایین به تنهایی نمی‌تواند باعث آپوپتوز شود و در دوزهای بالا نیز اثر سمی روی بافت‌های سالم دارد (۶).

زمانی که ATO به تنهایی به بیمار APL تجویز می‌شود، باعث بهبود در ۷۰ درصد بیماران می‌گردد؛ در حالی که در صورت ترکیب با ATRA، باعث بهبود در ۹۰ درصد بیماران می‌شود. اگر چه نتیجه‌ی درمان APL با ATRA و یا ATO در ترکیب با داروهای شیمی درمانی باعث بهبود بیماری می‌شود، اما عود و مقاومت دارویی به ATRA و یا ATO در برخی بیماران یکی از مشکلات حیاتی می‌باشد (۷).

دفروکسامین (DFO یا Deferoxamine) دارای وزن مولکولی ۶۵۶/۷۹، نیمه‌ی عمر ۶ ساعت، به صورت داخل جلدی، داخل وریدی، داخل ماهیچه‌ای و دهانی تجویز می‌شود. به صورت پودری سفید رنگ و دارای ساختار شیمیایی $C_{25}H_{48}N_6O_8CH_2O_3S$ می‌باشد (۸). DFO به عنوان یک داروی درمانی و شلاته کننده‌ی آهن در درمان گرانباری آهن استفاده می‌شود (۹). DFO به عنوان یک داروی ضد توموری نیز مطرح می‌باشد. آهن در شروع تومور (Tumor initiator) و تحریک ایجاد تومور (Tumor promotor) نقش دارد. خطر نسبی تومور در افراد با افزایش اشباع ترانسفرین و رژیم غذایی غنی از آهن افزایش می‌یابد (۱۰).

مطالعات نشان داده است که سلول‌های رده‌ی نوروبلاستوم حساس به DFO می‌باشند. DFO در ارتباط با دوز و زمان، سبب کاهش زنده‌مانی (Viability) سلول‌های رده‌ی نوروبلاستوم می‌شود. حدود ۹۰ درصد کاهش در زنده‌مانی این سلول‌ها

شود و همچنین در صورت دارا بودن اثر تقویتی معنی‌دار روی کاهش فعالیت متابولیکی سلول و زنده‌مانی آن، بتوان در آینده و پس از انجام مطالعات تکمیلی از ترکیب این دو دارو در درمان APL بهره‌مند شد.

روش‌ها

کشت سلول

در این مطالعه رده‌ی سلولی NB۴ (سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد، مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌ها در محیط RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute ۱۶۴۰) (Gibco)، که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco)، بیکربنات سدیم (Invitrogen) و ۱۰۰ μ l پنی سیلین-۱۰۰ μ g استرپتومایسین (Bioidea) می‌باشد، کشت داده شدند.

محیط کشت بعد از تهیه در دمای 4°C نگهداری شد و قبل از استفاده به دمای محیط (24°C) رسانده شد. سلول‌های کشت داده شده در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای 37°C نگهداری شدند.

تیمار کردن سلول‌ها با دارو

سلول‌ها در مرحله‌ی رشد لگاریتمی که در بهترین وضعیت خود به سر می‌برند و ممکن است بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها در حال تقسیم باشند، با دوزهای مختلف DFO (50 ، 100 و 200) به تنهایی و ترکیبی با ATO ($0/5$ μ l) تیمار شدند. بنابراین در این مرحله می‌توان زمان دو برابر شدن (Doubligation time) سلول‌ها را نیز محاسبه کرد.

در مورد سلول‌های NB۴ زمان دو برابر شدن ۲۴ ساعت محاسبه شد. داروی دفروکسامین و آرسنیک

۹۶ ساعت بعد از تیمار با DFO دیده شده است (۱۱). یک کاهش ۸۰-۵۰ درصدی زنده‌مانی هپاتوماسل‌ها در تیمار با DFO نیز نشان داده شده است (۱۲).

مکانیسم‌های مهار رشد سلول‌های توموری توسط DFO پیچیده و اغلب ناشناخته می‌باشد. مشخص شده است که آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز، یک آنزیم وابسته به آهن که سبب تبدیل ریبونوکلئوتیدها به داکسی ریبونوکلئوتیدها می‌شود، یکی از اهداف DFO می‌باشد؛ از این رو از این طریق DFO یک اختلال در سنتز DNA ایجاد می‌کند (۱۳). DFO از طریق مکانیسم‌های دیگری نیز سبب القای آپوپتوز می‌شود. اگر چه این مکانیسم‌ها به طور دقیق مشخص نیست، اما بعضی مکانیسم‌های آن شناخته شده است که از جمله‌ی آن‌ها فعال کردن کاسپازها و آنزیم‌های پروتئولیتیک که واسطه‌ی القای آپوپتوز هستند، می‌باشد. DFO قادر است کاسپازهای ۸ و ۹ و کاسپاز ۳ را فعال کند (۱۴).

احتمال می‌رود DFO از طریق تخلیه‌ی آهن (Iron depletion) موجب آپوپتوز شود. از این رو، افزایش وابستگی سلول‌های توموری به آهن این مطلب را پیشنهاد می‌کند که تخلیه‌ی آهن به عنوان یک استراتژی درمانی در محدود کردن رشد تومور مطرح باشد، که این تخلیه‌ی آهن توسط شلاته‌کننده‌های آهن از جمله DFO امکان پذیر است.

با توجه به مطالبی که ذکر شد، در این مطالعه سعی گردید اثر دوز پایین آرسنیک در ترکیب با DFO روی رده‌ی سلولی NB۴ بررسی شود تا از اثرات مضر دوز بالای آرسنیک و سایر مشکلات آن مثل عدم خاصیت آپوپتوتیک در دوز پایین کاسته

بررسی فعالیت متابولیکی سلول‌ها با MTT assay

۱۰۰ μl از سوسپانسیون سلولی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و سپس داروی DFO (Sigma) و ATO به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، آزمون MTT (Sigma) مورد مطالعه قرار گرفت.

پودر MTT (Microculture tetrazolium test) با غلظت ۵ mg در ۱۰ ml محیط RPMI فاقد FBS یا توسط بافر PBS حل شد و معرف MTT تهیه گردید. سپس ۱۰۰ μl از معرف MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، پلیت با دور ۵۲۰ g به مدت ۷ دقیقه با سانتریفیوژ پللیت خور، سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ μl از محلول رویی خالی شد و به آن ۱۰۰ μl محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma) اضافه گردید و پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه داخل انکوباتور انکوبه گردید. سپس توسط دستگاه ELISA reader (Dynex technologies) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

محاسبه‌ی مقدار P برای شمارش سلول‌ها، فعالیت متابولیکی و درصد زنده‌مانی با آزمون t و نرم‌افزار Excel انجام گردید.

یافته‌ها

کاهش شمارش سلول‌های NB۴ به دنبال مواجهه با داروی DFO و ترکیب DFO با ATO در سه فاصله‌ی زمانی

کاهش شمارش سلول‌ها وابسته به دوز و زمان بود و

در محیط RPMI ۱۶۴۰ بدون FBS (Fetal bovine serum) رقیق شدند. بدین منظور، استوک داروی دفروکسامین با غلظت ۱۰۰۰۰ μM در نظر گرفته شد. هر ۱ M دفروکسامین برابر ۶۵۶/۷۹ g/l می‌باشد. DFO ۱۰۰ μM برابر ۰/۰۶۵۶۷۹ در ۱ l می‌باشد و در ۵۰۰ CC برابر ۰/۰۳۲ می‌شود. ۱ M آرسنیک تری اکساید حدود ۲۰۰ g/l می‌باشد. ۱ M آرسنیک برابر ۲ g در ۱۰ ml می‌باشد. ۲ g آرسنیک معادل ۲۰۰۰ mg است. برای این کار از آمپول‌های ۱۰ mg در ۱۰ ml ATO (۱۰mg/۱۰ml) استفاده شد.

ATO در آمپول‌ها دارای غلظت ۵۰۰۰ μM است. برای دقت بیشتر در این مطالعه، ATO رقیق شد و از غلظت ۵۰ μM استفاده گردید. بنابراین، ۱۰ μl از دارو در ۹۹۰ μL محیط بدون FBS حل شد تا غلظت ۰/۵ μM آرسنیک تهیه شود.

برای تیمار اولیه از پللیت‌های ۱۲ خانه‌ای و حجم نهایی ۱۰۰۰ μl در هر چاهک استفاده شد. پس از تیمار درصد سلول‌های زنده با فاصله‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به وسیله‌ی تریپان بلو محاسبه شد.

بررسی زنده‌مانی سلول‌ها با تریپان بلو: برای

بررسی زنده‌مانی، ۵۰ μl از سوسپانسیون سلولی داخل میکروتیوب ریخته شد و به همان میزان تریپان بلو (Sigma) به آن اضافه گردید و به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱۰ μl از سلول با لام نتوبار سلول‌های زنده و مرده شمارش گردید. سلول‌های زنده نسبت به رنگ تریپان بلو نفوذ ناپذیر و بی‌رنگ دیده می‌شوند. در سلول‌های مرده رنگ وارد سیتوپلاسم می‌شود و سلول‌ها به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند.

کمی روی زنده‌مانی داشت، اما دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ DFO در ترکیب با ATO باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان زنده‌مانی شد. کمترین زنده‌مانی سلول در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO طی ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده گردید (شکل ۱).

با استفاده از فرمول زیر درصد زنده بودن سلول‌ها محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{میانگین سلول‌های زنده}}{\text{میانگین مجموع سلول‌های زنده و مرده}} = \text{درصد زنده ماندن}$$

بر طبق شکل ۱ داروی دفروکسامین به تنهایی بر زنده‌مانی سلول اثر می‌گذارد؛ اما در ترکیب با آرسنیک، اثربخشی آن بسیار مشهود است که می‌توان نتیجه گرفت که این دو دارو اثر هم‌افزایی و سینرژیک در ترکیب با هم دارند.

مقدار P دوزهای مختلف DFO و ترکیب دوزهای DFO با دوز ۰/۵ آرسنیک تری اکساید برای زنده‌مانی سلول‌ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به میزان $P < 0/050$ به دست آمد.

کمترین تعداد سلول در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO طی ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده گردید و بیشترین تعداد سلول در گروه شاهد و ۵۰ DFO طی ۲۴ ساعت مواجهه با دارو مشاهده شد (جدول ۱).

بررسی مقایسه‌ای تیمار دارویی در سه فاصله‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌ها در ۷۲ ساعت بعد از تیمار دارویی وجود داشت. بیشترین کاهش تعداد سلول مربوط به دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO در سه فاصله‌ی زمانی بود.

برای دوزهای مختلف DFO و ترکیب دوزهای DFO با دوز ۰/۵ آرسنیک تری اکساید با شمارش سلول‌ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت $P < 0/050$ به دست آمد.

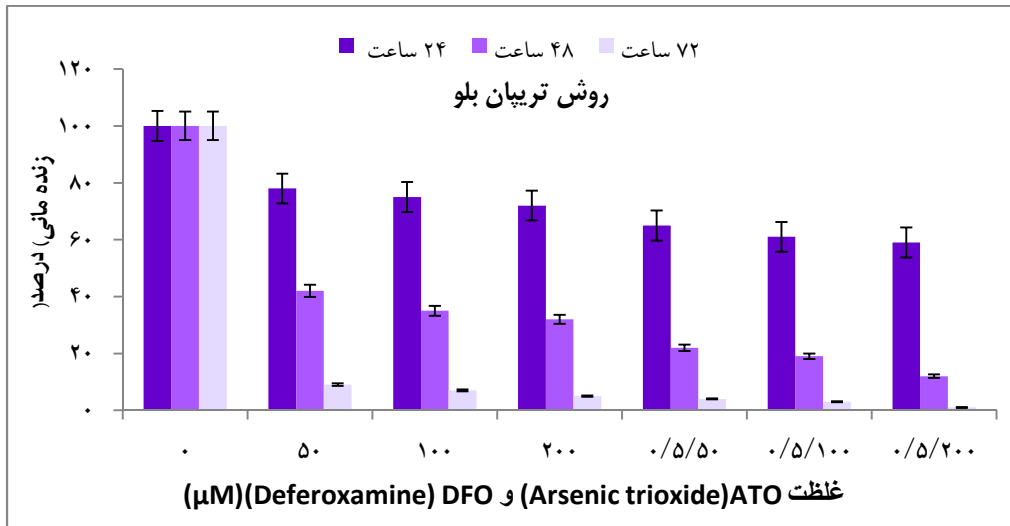
کاهش زنده‌مانی در مواجهه با DFO و ترکیب DFO با ATO در سه دوز درمانی

دوز ۵۰ μM DFO به تنهایی و در ترکیب با دوز ۰/۵ μM ATO در یک حالت وابسته به زمان اثر

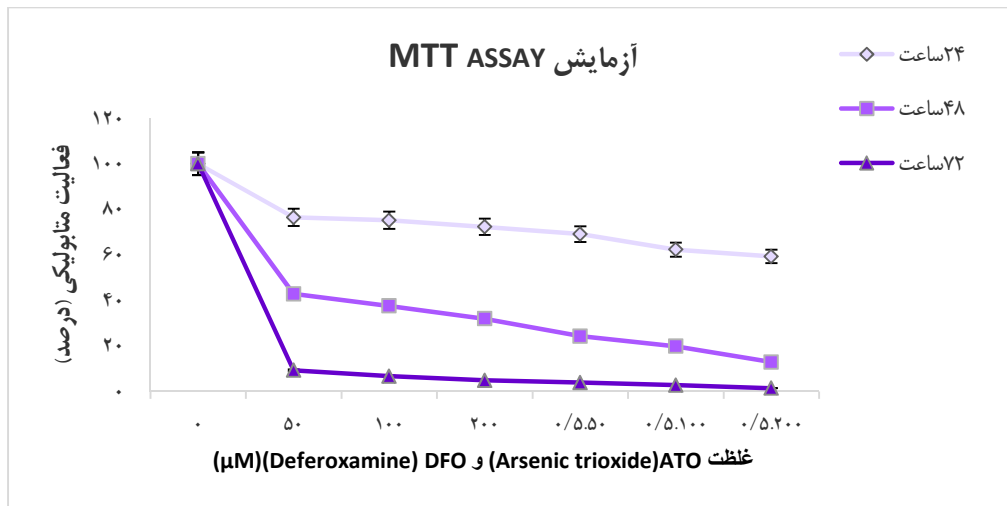
جدول ۱. شمارش سلولی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با دارو

ترکیب دارو	تعداد سلول		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۵۰ DFO	۳۴۵۰۰۰	۱۶۸۰۰۰	۱۰۳۰۰۰
۱۰۰ DFO	۳۲۹۰۰۰	۱۴۰۰۰۰	۹۱۰۰۰
۲۰۰ DFO	۲۸۳۰۰۰	۱۱۱۰۰۰	۷۹۰۰۰
۰/۵ ATO/۵۰ DFO	۲۶۷۰۰۰	۹۵۰۰۰	۶۶۰۰۰
۰/۵ ATO/۱۰۰ DFO	۲۵۶۰۰۰	۸۰۰۰۰	۵۴۰۰۰
۰/۵ ATO/۲۰۰ DFO	۲۴۸۰۰۰	۷۲۰۰۰	۳۸۰۰۰
شاهد	۴۶۴۰۰۰	۳۰۲۰۰۰	۲۰۰۰۰۰

DFO: Deferoxamine; ATO: Arsenic trioxide



شکل ۱. بررسی مقایسه‌ای زنده‌مانی سلول‌ها با تریپان بلو پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با دارو



شکل ۲. بررسی مقایسه‌ای فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت با دارو

گردید. کمترین فعالیت متابولیکی در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO طی ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده گردید و بیشترین فعالیت متابولیکی در دوز ۵۰ DFO پس از ۲۴ ساعت مجاورت مشاهده شد (شکل ۲).

هر چه غلظت DFO بیشتر باشد، اثر مهار کنندگی بر فعالیت متابولیکی سلول بیشتر است. DFO در ترکیب با آرسنیک تری اکساید بیشترین اثر مهار

کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های NB4 به دنبال مواجهه با داروی DFO و ترکیب DFO با ATO در سه فاصله‌ی زمانی

برای بررسی فعالیت متابولیک سلولی، از آزمایش رنگ‌سنجی MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. جذب نوری دوزهای مختلف با جذب نوری شاهد مقایسه شد و درصد فعالیت متابولیکی هر دوز طی سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه

درمان APL باعث کاهش سمیت و عوارض جانبی ATO گردد.

Zhang و همکاران، با مطالعه روی رده‌ی سلولی HL-۶۰ نشان دادند که آرسنیک در دوز کم، اثر قابل توجهی در القای آپوپتوز روی این سلول‌ها ندارد (۱۶). آرسنیک به طور مستقیم باعث ساموئیلینه (Sumoylation) و یوبیکیتویناسیون (Ubiquitination) موتیف (Motif) غنی از سیستئین پروتئین PML می‌شود و در نتیجه باعث تجزیه‌ی پروتئوزومال آن می‌شود (۶). همچنین آرسنیک در دوز کم به تنهایی اثری روی تکثیر و زنده‌مانی سلول‌ها ندارد. ترکیب ATRA و ATO باعث کاهش پروتئین الحاقی PML-RAR α و بقای بیشتر بیماران با APL می‌شود (۱۷).

در مطالعات Ex vivo نشان داده شد که DFO به عنوان یک داروی ضد توموری مفید مطرح می‌باشد. همچنین تیمار سلول‌های نوروبلاستوما با DFO سبب کاهش زنده‌مانی ۹۰ درصدی این سلول‌ها بعد از ۹۶ ساعت شد. در مطالعه‌ی حاضر بر روی سلول NB۴ نیز کاهش زنده‌مانی در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO پس از ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده شد که یکدیگر را تأیید می‌کند.

Tanaka و همکاران نشان دادند که DFO سبب مهار رشد سلول‌های بدخیم F9 embryonal carcinoma cells از طریق القای تمایزشان می‌شود (۱۸). همچنین القای آپوپتوز در سلول‌های رده‌ی ML-۱ (Myeloblastic leukemia) و Raji (Burkitts lymphoma) در تیمار با DFO نشان داده شده است. توقف رشد سلول‌های لوکمیک به دنبال درمان با DFO در یک نوزاد

کنندگی بر فعالیت متابولیک را دارد که نشان از تقویت اثر آرسنیک توسط DFO می‌باشد.

مقدار P دوزهای مختلف DFO و ترکیب دوزهای DFO با دوز ۰/۵ μM آرسنیک تری اکساید برای فعالیت متابولیکی بعد از ۲۴ ساعت $P < ۰/۰۵۰$ ، بعد از ۴۸ ساعت معادل $P < ۰/۰۰۳$ و بعد از ۷۲ ساعت $P < ۰/۰۰۸$ محاسبه شد که معنی‌دار بودند.

بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که DFO می‌تواند باعث کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی سلول NB۴ شود و همچنین در دوز ترکیبی با آرسنیک تری اکساید، اثربخشی آرسنیک را تقویت کند. بر اساس یافته‌های این مطالعه، بهترین دوز درمانی ترکیب ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO پس از ۷۲ ساعت مجاورت با دارو بود که بیشترین اثرگذاری را نشان داد. همچنین دوز درمانی ترکیب ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO پس از ۲۴ ساعت مجاورت با دارو، بهترین اثرگذاری را در زمان کوتاه ۲۴ ساعت داشت.

در دوز ۲۰۰ DFO کاهش تعداد سلول، کاهش زنده‌مانی و کاهش فعالیت متابولیکی بسیار واضح بود. اختلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۵۰$). احتمال می‌رود DFO به مانند ATO دارای مکانیسم‌های مولکولی مشابهی باشد که باعث کاهش فعالیت سلولی و زنده‌مانی سلول می‌شود. توصیه می‌گردد مطالعات تکمیلی و مولکولی در مورد مکانیسم اثر DFO انجام شود. بنابراین مطالعه‌ی حاضر نشان داد که DFO در ترکیب با ATO در مقایسه با ATO به تنهایی بسیار مؤثرتر است و می‌توان نتیجه گرفت که DFO می‌تواند در

بهبودی بیشتر بیماران مقاوم به درمان و بیماران عود یافته، علاوه بر بیماری اولیه APL شد. بدین صورت که داروی آرسنیک باعث القای آپوپتوز در سلول‌های NB۴ می‌شود (۱۵).

از آن جایی که مسیرهای آپوپتوتیک مشترکی بین DFO و ATO وجود دارد، ممکن است به کار بردن DFO در ترکیب با دوز پایین و غیر آپوپتوتیک آرسنیک باعث تقویت اثر دوز پایین آرسنیک در القای آپوپتوز و کاهش فعالیت متابولیکی شود. در این مطالعه، مشاهده شد که DFO باعث کاهش رشد و فعالیت متابولیکی سلول می‌گردد. از آن جا که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثرات DFO بر روی بیان ژن‌ها، چرخه‌ی سلولی و مسیرهای انتقال پیام صورت نگرفته است؛ بنابراین توصیه می‌شود تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد تا مکانیسم اثرات DFO به تنهایی و همچنین اثرات ترکیبی DFO با ATO به طور کامل مشخص شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت مالی این طرح به شماره‌ی ۲۲۳۳۱-۳۱-۰۲-۹۲ و همچنین از مسئولین و پرسنل آزمایشگاه هماتولوژی و آزمایشگاه تحقیقات مرکزی دانشکده‌ی پیرا پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام این مطالعه با ما همکاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Neonatal acute leukemia مشاهده گردید (۱۹).

Hann و همکاران، یک کاهش ۵۰-۸۰ درصدی زنده‌مانی هیپاتوماسل‌ها را در تیمار با DFO نشان دادند (۲۰).

در نهایت، در یک مطالعه DFO در ترکیب با داروهای دیگر (Combination therapy)، شامل Thiotepeا، Cyclophosphamide، Etoposide، Carboplatin و بر روی ۵۴ بیمار با نوروبلاستومای پیشرفته استفاده شد که سبب بهبودی کامل ۲۷ نفر و بهبود نسبی در ۲۶ نفر و بهبود خفیفی در ۳ نفر گردید (۲۱). نتایج ما با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد و یکدیگر را نقض نمی‌کنند.

مکانسیم‌های مولکولی اثر این دو دارو به طور کامل مشخص نیست. بسیاری از اثرات دفروکسامین و آرسنیک روی رده‌های سلولی و القای آپوپتوز مشابه است. علت اصلی انتخاب داروی دفروکسامین به این دلیل بود که این دارو مراحل کارآزمایی بالینی خود را در بسیاری از بیماری‌ها از جمله هموکروماتوز و تالاسمی ماژور سپری کرده است و یکی از اهداف درمانی این بیماری‌ها محسوب می‌گردد.

برداشت پایانی این که ATRA در سال ۱۹۸۵ به عنوان درمان جدید APL معرفی شد. اما بیمار با دریافت ATRA بیشتر به آن مقاومت نشان می‌دهد و موجب عود می‌گردد. اما ترکیب ATRA و شیمی درمانی باعث بهبودی کامل در ۹۵-۹۰ درصد بیماران می‌شود. به کار بردن آرسنیک تری اکساید باعث

References

1. Rego EM, De Santis GC. Differentiation syndrome in promyelocytic leukemia: clinical presentation, pathogenesis and treatment. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3(1): e2011048.
2. Jovanovic JV, Rennie K, Culligan D, Peniket A, Lennard A, Harrison J, et al. Development of real-time quantitative polymerase chain reaction assays to track treatment response in retinoid

- resistant acute promyelocytic leukemia. *Front Oncol* 2011; 1: 35.
3. Grimwade D, Mrozek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25(6): 1135-61, vii.
 4. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 111-21.
 5. Park JH, Tallman MS. Treatment of acute promyelocytic leukemia without cytotoxic chemotherapy. *Oncology (Williston Park)* 2011; 25(8): 733-41.
 6. Lang E, Grudic A, Pankiv S, Bruserud O, Simonsen A, Bjerkgvig R, et al. The arsenic-based cure of acute promyelocytic leukemia promotes cytoplasmic sequestration of PML and PML/RARA through inhibition of PML body recycling. *Blood* 2012; 120(4): 847-57.
 7. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol* 2013; 97(6): 717-25.
 8. Bergeron RJ, Wiegand J, Brittenham GM. HBED ligand: preclinical studies of a potential alternative to deferoxamine for treatment of chronic iron overload and acute iron poisoning. *Blood* 2002; 99(8): 3019-26.
 9. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med Res Rev* 2002; 22(1): 26-64.
 10. Stevens RG, Graubard BI, Micozzi MS, Neriishi K, Blumberg BS. Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 1994; 56(3): 364-9.
 11. Blatt J, Stitely S. Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Res* 1987; 47(7): 1749-50.
 12. Deugnier Y, Turlin B. Iron and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(5): 491-4.
 13. Lederman HM, Cohen A, Lee JW, Freedman MH, Gelfand EW. Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood* 1984; 64(3): 748-53.
 14. Renton FJ, Jeitner TM. Cell cycle-dependent inhibition of the proliferation of human neural tumor cell lines by iron chelators. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(11): 1553-61.
 15. Li J, Chen P, Sinogeeva N, Gorospe M, Wersto RP, Chrest FJ, et al. Arsenic trioxide promotes histone H3 phosphoacetylation at the chromatin of CASPASE-10 in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49504-10.
 16. Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. *Carcinogenesis* 2003; 24(11): 1811-7.
 17. Sanz MA, Fenaux P, Lo CF. Arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. A review of current evidence. *Haematologica* 2005; 90(9): 1231-5.
 18. Tanaka T, Muto N, Ido Y, Itoh N, Tanaka K. Induction of embryonal carcinoma cell differentiation by deferoxamine, a potent therapeutic iron chelator. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1357(1): 91-7.
 19. Fukuchi K, Tomoyasu S, Watanabe H, Tsuruoka N, Gomi K. G1 accumulation caused by iron deprivation with deferoxamine does not accompany change of pRB status in ML-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1357(3): 297-305.
 20. Hann HW, Stahlhut MW, Hann CL. Effect of iron and desferoxamine on cell growth and in vitro ferritin synthesis in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 1990; 11(4): 566-9.
 21. Donfrancesco A, Deb G, Angioni A, Maurizio C, Cozza R, Jenkner A, et al. D-CECaT: a breakthrough for patients with neuroblastoma. *Anticancer Drugs* 1993; 4(3): 317-21.

The Combination Effect of Low-Dose Arsenic Trioxide plus Deferoxamine on Viability and Inhibiting the Proliferation of NB4 Cell Line

Kazem Ghaffari MSc¹, Ahmad Kazemi PhD², Shaban Alizadeh PhD³, Ali Ghasemi MSc¹, Neda Minayi MSc¹, Abbas Ghotaslou MSc¹, Behnoush Tayebi MSc⁴, Mohammad Reza Rezvani PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Acute promyelocytic leukemia (APL) is one of the most prevalent myeloid lineage leukemia. Currently-available treatment options for these patients are using all trans-retinoic acid (ATRA) and, recently, arsenic trioxide (ATO). All trans-retinoic acid may cause treatment resistance in some cases; and arsenic trioxide, in high doses, has cytotoxic effects. In our study, we determined the ability of deferoxamine (DFO) in reducing the cytotoxic effects of high doses of arsenic on NB4 cell line in the acute promyelocytic leukemia.

Methods: The NB4 cell line cultured, expanded and then treated with different doses of deferoxamine (50, 100, and 200 μ M) alone, and low dose of arsenic trioxide (0.5 μ M) in combination with different doses of deferoxamine (50, 100, 200 μ M). Proceeding cells were counted, metabolic activity was measured using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction assay and cell viability was determined via trypan blue exclusion assay. The data were analyzed using the Student's t-test method and the Excel software.

Findings: Cells treated with different doses of deferoxamine, alone and in combination with arsenic trioxide, showed decrease in viability and cell activity in a dose- and time-dependent manner. Treatments with combination of 0.5 μ M arsenic trioxide and 200 μ M deferoxamine showed the maximum effect in decreasing viability and metabolic activity of NB4 cells; and treatments with deferoxamine alone showed the minimum effect in declining viability and metabolic activity.

Conclusion: This study shows that deferoxamine has a significant effect on viability of NB4 cell line and also causes decrease in cell activity. It seems that deferoxamine is an appropriate agent for inhibition of tumor cells.

Keywords: Acute promyelocytic leukemia, Arsenic trioxide, Deferoxamine

Citation: Ghaffari K, Kazemi A, Alizadeh Sh, Ghasemi A, Minayi N, Ghotaslou A, et al. **he Combination Effect of Low-Dose Arsenic Trioxide plus Deferoxamine on Viability and Inhibiting the Proliferation of NB4 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 818-27

1- Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Hematology, Allied Medical School, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Ahmad Kazemi PhD, Email: a.kazemi@iums.ac.ir