مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره۶ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹۱، ۲۴۵-۲۳۶

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

بررسی اثر سیتوتوکسیک و آنتی پرولیفراتیو داروی حصا–آ بر روی سلولهای رده NB4(لوسمی پرومیلوسیتیک حاد)

سوده نامجو[۱]، دکتر فاطمه نادعلی[۲]، دکتر احمد کاظمی[۲]، دکتر حسین درگاهی[۳]
دکتر حسین رضایی زاده[۴]، دکتر شهربانو رستمی[۵]، دکتر سید ناصر استاد[۶]

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی‌های حاد یکی از دلایل عمده سرطان در جهان می‌باشند. امروزه می‌توان از مواد طبیعی بعنوان یک منبع برای درمان سرطان استفاده کرد. حصا–آ دارویی با منشا دریایی و ترکیبی از گونه‌های دریایی مثل شامیگو و گونه‌های گیاهی مثل کرفس و زیره می‌باشد. حصا–آ شامل اجزای معدنی(۵۰٪)، اجزای آلی(۴۵٪) و آب(۵٪) می‌باشد و دارای اثرات ضد سرطانی و سیتوتوکسیک است. در این مطالعه تاثیر این دارو بر روی رده سلولی NB4(لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) ارزیابی شده است.

روش بررسی: حصا–آ در نرمال سالین به عنوان محلول استوک تهیه شد(غلظت ۸۰ mg/ml و PH=۷/۴) و سپس استریلیزه گردید. بعد از کشت و تکثیر رده سلولی NB4، سلولها با دوزهای ۱ mg/ml، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم در دسی لیتر تیمار شدند. درصد سلولهای زنده و مرده با رنگ آمیزی تریپان بلو و توسط لام نئوبار شمارش گردید. بوسیله‌ی روش MTT درصد بقاء سلولها توسط الایزا ریدر در۵۷۰ نانومتر تعیین شد. توسط فلوسیتومتری تاثیر دارو بر روی آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که حصا–آ واجد اثر سیتوتوکسیک و آنتی پرولیفراتیو وابسته به دوز برعلیه رده سلولیNB4 می‌باشد و در دوز ۵ mg/ml قادر به آپوپتوز در۵۰٪ سلولها می‌باشد.

نتیجه‌گیری: اگر چه مکانیسم دقیق عملکرد سیتوتوکسیسیتی حصا–آ هنوز ناشناخته است، اما در این مطالعه مشخص شد که این دارو در سطح سلولی، سلولها را وادار به آپوپتوز سلولی در یک روش وابسته به دوز می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: لوسمی حاد، حصا–آ، رده سلولی NB4 ، آپوپتوز

* نویسنده مسئول :
دکتر سید ناصر استاد ؛
دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email :
Ostadnas@tums.ac.ir

- دریافت مقاله : فروردین ۱۳۹۰ - پذیرش مقاله : شهریور ۱۳۹۱

مقدمه

لوسمی، سرطان بافت‌های خونسار بدن، شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی می‌باشد. این بیماری در رشته هماتولوژی و انکولوژی از اهمیت بالایی برخوردار است بطوری که هنوز ابهامات فراوانی در زمینه‌های تشخیص و به خصوص درمان بیماری‌های مربوط به آن باقیمانده است(۱). لوسمی‌ها به طور کلی به دو دسته حاد و مزمن تقسیم می‌شوند، همچنین از نظر نوع سلول منشا به دو گروه بزرگ لوسمی حاد

[۱] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] دانشیار گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] دانشیار گروه مدیریت خدمات بهداشتی درمانی، عضو مرکز تحقیقات مدیریت اطلاعات سلامت، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] دانشجوی دکترای تخصصی طب سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۵] دکترای هماتولوژی، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۶] استاد سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

میلوبلاستیک(AML) و لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL) تقسیم می‌شوند(۲).

لوسمی میلوبلاستیک حاد(AML) یک بیماری هتروژن است که بصورت نامیرا سلولهای پیش ساز میلوئید نابالغ را درگیر می‌کند. AML شایع‌ترین لوسمی حاد در چند ماه اول زندگی است، در طول دوران کودکی و نوجوانی حدود یک سوم لوسمی‌های حاد را تشکیل می‌دهد(٤و٣).

لوسمی پرومیلوستیک حاد(APL) در واقع یکی از زیرگروههای AML است، این نوع از AML معمولاً در سنین ٤٠-٥٠ سالگی رخ می‌دهند که حدود ١٠-١٥٪ انواع AML را به خود اختصاص می‌دهند و به طور معمول در اثر نقص در بلوغ گلبولهای سفید در رده میلوئیدی به وجود می‌آید که منجر به تجمع سلولهای نابالغی به نام پرومیلوسیت می‌شود(٤).

حصا-آ یک ترکیب بیولوژیک طبیعی با منشاء دریایی گیاهی است که به علت ویژگی‌های بیولوژیک خود در ایران اختراع شده و اجازه‌ی تولید انبوه آن توسط وزارت بهداشت و آموزش پزشکی داده شده است (شماره‌ی ثبت D-5-6638 در تاریخ سال ١٣٨٤)(٥). این دارو ترکیبی از گونه‌های دریایی مثل شامیگو و گونه‌های گیاهی مثل کرفس و زیره می‌باشد(٦). حصا-آ شامل اجزای معدنی(٥٠٪) اجزای آلی(٤٥٪) و آب(٥٪) می‌باشد. اجزای معدنی آن شامل ترکیبی از کربنات کلسیم، سولفات منیزیم، سولفات پتاسیم، سولفات سدیم، فسفات سدیم، فسفات پتاسیم، فسفات منیزیم می‌باشد. درصد کمی از دیگر فلزات مثل Tm، W،Zn، Cu، Ag، As، Ni،Mn،Ti،Sr،Br، ، Ba، Cs، Va، Er،Ti،Lu وTe، در فرم کمپلکس یا نمک در داروی حصا-آ یافت می‌شود(٧و٦). Moallem و همکاران(٢٠٠٩) طی مطالعه‌ای بر روی داروی حصاـآ اثرات ضد توموری و سیتوتوکسیک آن را نشان دادند و نیز اثرات ضد سرطانی حصا ـ آ را هم در invivo و هم در invitro بررسی کردند و نشان دادند حصاـ آ رشد سلولهای سرطانی را در یک مسیر وابسته به دوز مهار می‌کند(٦). مطالعات انجام شده بر روی انسان و حیوان نشان دادند که داروی حصاـ آ ویژگیهای ضد سرطانی قوی دارد و تاثیر کمی را بر روی سلولهای طبیعی اعمال می‌کند(٧و٥). این دارو با میزان مصرف روزانه ٥٠ mg/kg منقسم دوبار به شکل خوراکی در بیماران مبتلا به سرطانهای متاستاتیک مجرای صفراوی و کبدی، هماتوما، سرطانهای روده‌ای و کولون، سینه، اروژنیتال، سارکوماها و کارسینوماها مصرف می‌شود و طول دوره مصرف دارو با دوز درمانی ذکر شده از ١ تا ٣ ماه مداوم، طبق نظر پزشک معالج متغیر می‌باشد(٧).

با توجه به مروری بر مطالعات مشابه، به نظر می‌رسد تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای بر روی تاثیر داروی مزبور بر سلولهای خونی سرطانی انجام نشده است و چون دیگر پروتکلهای مختلف شیمی درمانی دارای عوارض شدیدی بر روی بیمار می‌باشند، لذا هدف این مطالعه بررسی اثر داروی حصا-آ بر روی سلولهای NB4(سلولهای لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) می‌باشد.

روش بررسی

کشت سلول

در این مطالعه رده سلولی NB4(سلولهای لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) از انستیتو پاستور(تهران، ایران) خریداری و مورد مطالعه قرار گرفت.

سلولها در محیط RPMI1640 (PAA اتریش) که حاویFBS ١٠٪(PAA اتریش)، ١٪ L-گلوتامین، ١٪ پیروات سدیم و ١٪ پنی سیلین/ استرپتومایسین می‌باشد کشت داده شدند. محیط کشت پس از تهیه در دمای ٤°سانتیگراد نگهداری شده و قبل از استفاده به دمای ٣٧° سانتیگراد رسانده شد. سلولهای کشت داده

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

شده در انکوباتور با CO2٪۵ ودمای ۳۷° سانتیگراد نگهداری شدند و زمان دو برابر شدن سلولها محاسبه گردید.

تهیه استوک دارو

داروی حصا-آ به صورت پودری نرم می‌باشد. این پودر در نرمال سالین ریخته شد و سپس pH آن با(HCl) ۱ مولار در ۱/۵ تنظیم گردید و به مدت نیم ساعت با ورتکس تکان داده شد. بعد از گذشت ۲٤ ساعت، pH محلول با قطراتی از سود غلیظ ۱ مولار به ۷/٤ رسانده شد. این سوسپانسیون ابتدا با کاغذ صافی صاف شد و سپس مایع صاف شده را با فیلتر ۰/۲۲ میکروبیولوژیک استریل در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. از این محلول ذخیره که غلظت حصا-آ در آن برابر ۸۰mg/ml است، رقتهای ۸،٤،۲،۱ تهیه شده و در بررسی‌های بعدی از آن استفاده گردید.

تیمار کردن سلولها با دارو

برای تیمار دارویی از پلیتهای ۲٤ چاهکی استفاده کرده و از هر رقت دارویی ٤ تکرار انجام شد. دو ردیف آخر پلیت به کنترل‌ها اختصاص داده شد. در این مطالعه از دو نوع کنترل استفاده شد: ۱) محیط کشت + سلول(بدون دارو) ۲) محیط کشت + سلول + نرمال سالین اسیدی خنثی شده(بدون دارو). هدف از کنترل دوم این است که بررسی شود آیا نرمال سالین اسیدی خنثی شده که در تهیه محلول ذخیره دارو از آن استفاده شد، بر روی حیات و بقاء سلولها اثر دارد یا خیر. سپس این پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مرطوب که واجد ۵٪ CO2 است انکوبه شد. چون قرار بود بطور همزمان حیات سلولی و اثر سیتوتوکسیک دارو بررسی شود دو پلیت با همین شرایط آماده گردید.

بررسی زنده مانی سلولها با تریپان بلو

پس از گذشت ۷۲ ساعت از یکی از پلیتها برای بررسی حیات سلولی استفاده شد. محتویات هر چاهک را به خوبی مخلوط کرده و سپس ۵۰ میکرولیتر از محتویات یک چاهک با ۵۰ میکرولیتر از تریپان بلو(MERCK آلمان) مخلوط شد و با لام نئوبار سلولهای زنده و مرده شمارش گردید که طی این رنگ آمیزی، رنگ تریپان بلو به داخل سلولهای مرده نفوذ کرده و این سلول‌ها به رنگ آبی درآمدند. درصد زنده ماندن سلولها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

۱۰۰ X ((تعداد کل سلولها(زنده + مرده)/ میانگین تعداد سلولهای زنده))

هر غلظت از این دارو در این پلیت ٤ مرتبه تکرار شد و این بررسی سه بار تکرار گردید.

بررسی فعالیت متابولیک سلولها با روش MTT

پس از گذشت ۷۲ ساعت، از پلیت دیگر برای بررسی MTT استفاده شد. پودر MTT(SIGMA ALDRICH آلمان) با غلظت ۱۰ mg/ml PBS تهیه شده و سپس به هر چاهک ۱۰۰µl از محلول MTT اضافه گردید و دور پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده شد. بعد از ٤ ساعت انکوباسیون، محتوای هر چاهک را در میکروتیوپ ریخته و با دور ٤۰۰۰g به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی بیرون ریخته شد و به رسوب آن ۳۰۰ µl DMSO MERCK(آلمان) اضافه گردید و کاملاً با هم مخلوط کرده تا کریستال‌های فورمازان به خوبی حل شوند. سپس ۱۰۰µl از هر چاهک به میکروپلیت ۹٦ چاهکی منتقل شد و سپس جذب نوری آن با اسپکترو فتومتر در ۵۷۰ nm اندازه گیری گردید. دوزی از دارو توانایی سیتوتوکسیسیتی دارد که قادر به از بین بردن ۵۰٪ سلولها باشد که آن به عنوان دوز IC50 محسوب می‌شود. این بررسی ۳ بار تکرار شد.

بررسی آپوپتوز با استفاده از آنکسین V-FITC و پروپیدیوم آیدید (PI)

آنکسین V یک نشانگر حساس برای سطح سلولهای

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

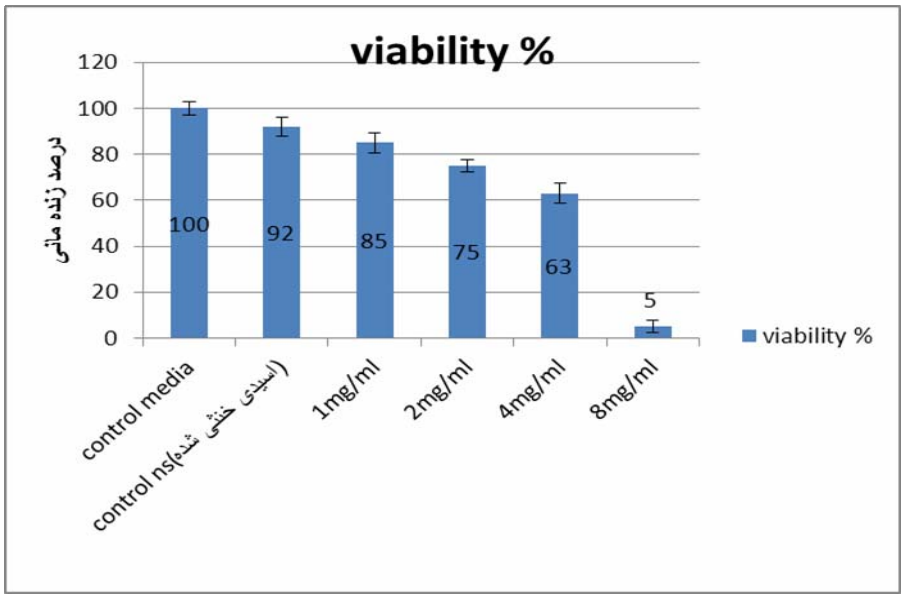
آپوتپوتیک است که فسفاتیدیل سرین را در سطح خود بیان می‌کنند. PI یک نشانگر برای افتراق بین سلولهای نکروزی از آپوپتوتیک می‌باشد که هسته سلولها را رنگ می‌کند.

ادامه مراحل طرح را فقط با ۲ نمونه یکی سلولهایی که با دوز IC50 تیمار شده‌اند و دیگری سلولهای کنترل که در محیط آنها نرمال سالین اسیدی خنثی شده است، انجام شد.

ابتدا 1×10^{6} سلول را در لوله‌هایی که واجد ۱ میلی لیترPBS(با ۱۰٪FBS) است ریخته شد. این سلولها ۷۲ ساعت قبل با دارو در دوز IC50 تیمار شده بودند. سلولهای کنترل نیز از ۷۲ ساعت قبل در محیطی بدون دارو ولی واجد نرمال سالین اسیدی خنثی شده قرار گرفته بودند. سپس طبق دستورالعمل کیت، ۵ میکرولیتر از آنکسینV(SIGMA ALDRICH آلمان) و ۱۰ میکرو لیتر از PI(SIGMA ALDRICH آلمان) به هر لوله فالکون اضافه گردید و سپس توسط فلوسیتومتری سلولها مورد مطالعه قرار داده شد.

روش مطالعه از نوع تجربی و جامعه مورد بررسی رده سلولی NB4(رده مربوط به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) بود و آزمایشات نیز سه بار تکرار شدند. آنالیز آماری با استفاده از student-t test و نرم افزارEXCEL انجام شد.

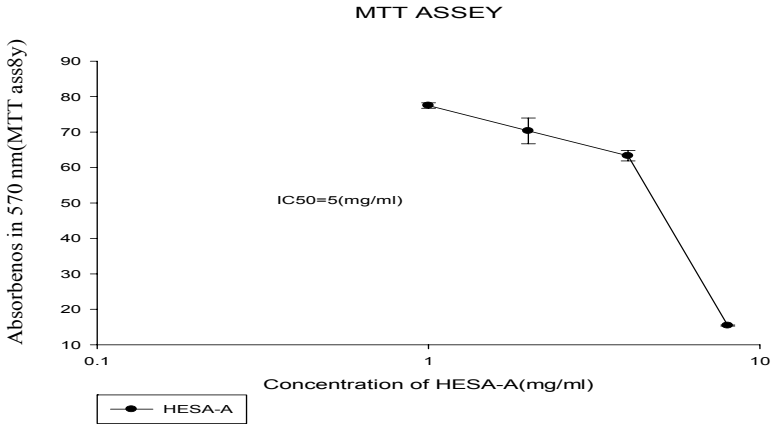
یافته‌ها



نمودار ۱: نتایج بررسی حیات سلولها با تریپان بلو پس از ۷۲ ساعت مواجهه با دارو

درصد زنده ماندن سلولهای NB4 پس از ۷۲ ساعت مواجهه با داروی حصا_آ در نمودار ۱ مشاهده می‌شود.

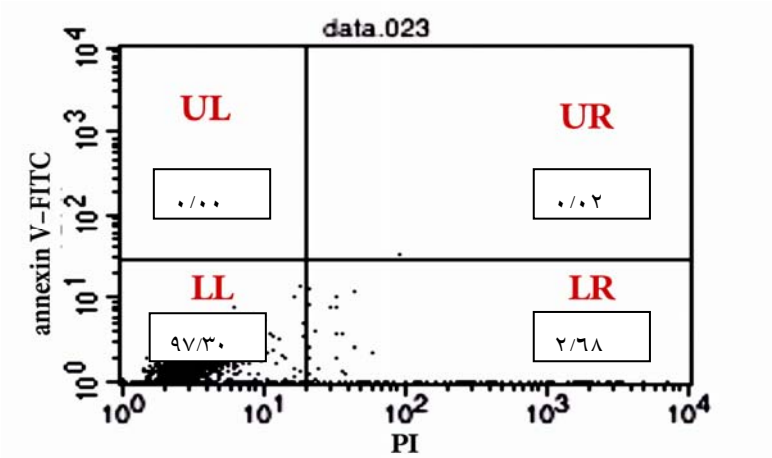
Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017



نمودار ۲: نتایج فعالیت متابولیک سلولها با MTT assay پس از ۷۲ ساعت مجاورت با دارو

مقادیر به صورت SD± ارائه شده‌اند. به طور آماری مقدار P<۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار می‌باشد. نتایج بدست آمده نشان داد که نرمال سالین اسیدی خنثی شده دارای اثرات کشندگی ضعیفی می‌باشد و حیات سلولها با افزایش دوز دارو کاهش می‌یابد. تست MTT بر روی سلولهای NB4 که به مدت ۷۲ ساعت در تماس با داروی حصا-آ قرار گرفته بود، انجام شد که نتایج آن در نمودار ۲ مشاهده می‌شود. در این نمودار نشان داده شد داروی حصا-آ در دوز ۵ mg/ml دارای اثر سیتوتوکسیکی می‌باشد که قادر بـه مهار ۵۰٪ فعالیـت متـابولیک سـلولهای NB4 است.

این دوز به عنوان دوز IC50 انتخاب شد و برای بررسی‌های تکمیلی می‌توان تنها از این دوز استفاده کرد. این نمودار توسط نرم افزار سیگما پلات رسم شده است که هر نقطه نماینده متوسط سه بـار تکرار ± SD می‌باشد. تاثیر سایتوتوکسیسیتی دارو در الگوی وابسته به دوز با(P.value <۰/۰۰۱) معنی دار است و با توجه به آن غلظت ۵ mg/ml به عنوان غلظت IC50 محسوب می‌شود و آن غلظتی ست که در آن ۵۰٪ سلولها زنده و ۵۰٪ سلولها مرده می‌باشند.

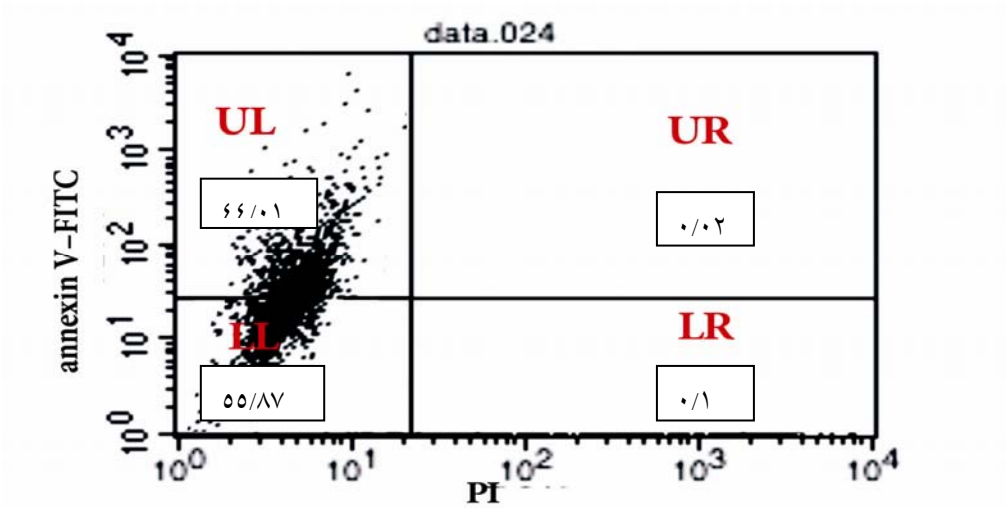


نمودار۳: نتایج آپوپتوز در سلولهای کنترل پس از ۷۲ ساعت در محیطی بدون دارو

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

طی بررسی آپوپتوز با روش فلوسیتومتری، نتایج سلولهای کنترل که به مدت ۷۲ ساعت در محیطی بدون دارو اما واجد نرمال سالین اسیدی خنثی شده کشت داده شده بودند، در نمودار ۳ قابل مشاهده است. انتظار پژوهشگران این بود که در این سلولها هیچگونه آپوپتوزی دیده نشود که نتایج نیز بیانگر همین مطلب می‌باشد.

با توجه به اینکه FL1 بیانگر annexin V-FITC و FL2 بیانگر PI می‌باشد ۹۷٪ سلولها FITC-/PI- یعنی در ناحیه LL می‌باشند که انتظار ما هم از سلولهای کنترل همین می‌باشد که اکثریت آنها تحت آپوپتوز قرار نگرفته‌اند و در ناحیه سلولهای زنده واقع شده‌اند چون با دارو تیمار نشده‌اند.



نمودار۴ : نتایج آپوپتوز درسلولهایی که پس از ۷۲ ساعت مواجهه با دوز IC50 از دارو تیمار شده اند

نتایج آپوپتوز در سلولهایی که با دوز IC50 از دارو تیمار شده‌اند در نمودار ٤ مشاهده می‌شود. حدود ٥٦٪ سلولها در ناحیه سلولهای زنده یعنی LL واقع شده اند و از نظر FITC-/PI- می‌باشند و ٤٤٪ سلولها در ناحیه سلولهای early آپوپتوتیک قرار گرفته‌اند یعنی در ناحیه UL واقع شده‌اند که از نظر FITC+/ PI- می‌باشند.

بحث

APL یکی از انواع زیر گروه‌های AML می‌باشد که در تقسیم بندی گروه FAB به عنوان AML-M3 شناخته می‌شود(۸).

در سال ۱۹۷۳، داروی Daunorubicin به عنوان یک داروی شیمی درمانی جهت درمان بیماران مبتلا به APL معرفی شد. بعد از آن ترکیبی از یک آنتراسیکلین(Daunorubicin،Idarubicin) و Ara-C خط اول درمان APL بودند. در سال ۱۹۸۵، ATRA بعنوان درمان جدید APL معرفی شد(۹). در اوایل دهه ۱۹۹۰ بکاربردن آرسنیک تری اکسید(ATO) باعث بهبودی بیشتر بیماران مقاوم به درمان و بیماران عود یافته علاوه بر بیماری اولیه APL شد(۸). ترکیب ATRA و ATO باعث بقاء بیشتر بیماران با APL اولیه می‌شود(۹). هر چند درمان APL با ATRA موفقیت آمیز می‌باشد، اما در بعضی موارد عود مجدد وجود دارد(۱۰). در این موارد، داروی آرسنیک داروی مناسبی می‌باشد(۱۱). اما آرسنیک در دوزهای پایین

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

به تنهایی نمی‌تواند باعث آپوپتوز شود و در دوزهای بالا نیز اثر سمی روی بافتهای سالم دارد(۱۲). همچنین عود مجدد در درمان با آرسنیک نیز در بعضی موارد وجود دارد(۱۳). با وجود پیشرفتهای اخیر در فارماکولوژی و شیمی دارویی، ۲۵٪ از کل داروهای تجویز شده، مشتقات محصولات طبیعی هستند. در مورد داروهای ضد سرطان این رقم به بیش از ۸۰٪ می‌رسد(۷). حصا-آ یک ترکیب طبیعی فعال با منشا دریایی و گیاهی می‌باشد. مکانیسم دقیق عملکرد حصا-آ هنوز شناخته نشده است، اما با توجه به بررسیهایی که دیگر گروههای تحقیقاتی بر روی این دارو انجام داده‌اند مشخص شده است که حصا-آ مخلوطی از نمکها یا کمپلکسهای غیرآلی می‌باشد، مثل اکسیدکلسیم(CaO)=٤٣/٧٨٪، اکسیدفسفر (P2O5)=٦/١٦٪، اکسید سدیم(Na2O5) =٣/٦٨٪، اکسید منیزیم(Mg2O)=٢/٨٩٪، اکسید سولفور(SO3) =٢/١٩٪، اکسید پتاسیم(K2O)=١/٩٨٪، اکسیدآهن (Fe2O3) =٠/٣٧٪، اکسیدآلومینیوم(Al2O3) =٠/٣٥٪ و دیگر اجزاء آن شامل

Zn،W،Tm،Lu،Ti،Er،Va،Cs،Ba،Cd،Te
Se،Br،Sr،TA،MN،Ni،As،Ag،Cu

که به مقدار کمی در این دارو یافت می‌شوند(۷).

در یک مطالعه که توسط صادقی علی آبادی و همکار در سال ۲۰۰۳ بر روی سلول در شرایط آزمایشگاه انجام شد، IC50 درسلول Hela و در سلول HepII به ترتیب ۰/۲ و ۰/٤ mg/ml بود. در این مطالعه که بر روی سلول NB4 دوز mg/ml۵ بعنوان IC50 انجام شد، روش تریپان بلو برای بررسی اثرات آنتی پرولیفراتیو و حیات سلولها به کار گرفته شد که نتایج حاصله نشاندهنده آن است که این دارو بر روی سلولهای NB4 دارای اثر مستقیم آنتی پرولیفراتیو وابسته به دوز می‌باشد و میزان حیات سلولهای تیمار شده با توجه به دوز دارو در مقایسه با سلولهای تیمار نشده کاهش یافته است و در این مطالعه اثر کشندگی دارو نیز مشاهده شده است(۷).

پیشنهاد شده است که اثرات این دارو به علت حضور اجزاء غیرآلی و دیگر ترکیبات مختلف آن است. این ترکیب حاصل اجزایی است که برای بدن ضروری ست و کمبود آن ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی مثل سرطان شود(۷).

از آنجاییکه ترکیب اصلی حصا-آ نمکهای کلسیم می‌باشد، Rozen و Holbrook پیشنهاد کرده‌اند که اضافه کردن مکملهای کلسیم به رژیمهای غذایی ممکن است باعث کاهش ریسک ابتلا به سرطان گردد(۱۵و۱٤).

سلنیوم(se) یک آنتی اکسیدان موثر است که کمبود آن باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان می‌گردد(١٦). سلنیوم ممکن است خطر ابتلا به ایجاد آدنوماهای بزرگ را کاهش دهد(۱۷).

بنابراین می‌توان گفت سلنیوم یک مدل درمانی موثر برای استئوسارکوما محسوب می‌شود(۱۸). دو مدل برای روش عملکرد ضد سرطانی سلنیوم پیشنهاد شده است. اول اینکه به عنوان یک ماده ضروری برای عملکرد آنتی اکسیدانها می‌باشد و دوم اینکه به عنوان منبعی از متابولیتهای سلنیوم می‌باشد که ممکن است از کارسینوژنز جلوگیری کند(۱۹). مطالعات نشان داده است که کمپلکسهای حاوی وانادیوم(va) در درمان سرطان موثر است، چون اثرات ضد سرطانی آن اثبات شده است. اثرات ضد توموری وانادیوم را بواسطه‌ی مهار تیروزین فسفاتاز سلولی و یا فعال کردن تیروزین فسفریلاز می‌دانند که در هر حال منجر به فعال شدن مسیرهای انتقال سیگنال و سرانجام آپوپتوز می‌گردد و یا باعث فعال شدن ژنهای سرکوب کننده تومور می‌شود(۲۰). بررسی‌ها نشان داده است که کمپلکس‌های حاوی تیتانیوم(Ti) طیف وسیعی از ویژگیهای ضد توموری را دارند(۲۱).

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

یک گزارش ابتدایی توسط Patel نشان داده است که تانتالیوم(Ta) در درمان تومورهای کلیوی موثر است(۲۲). Onyx، که کمپلکسی از ۲۸٪ تانتالیوم می‌باشد برای درمان خرگوشهای مبتلا به سرطان کبدی استفاده شده است(۲۳). در مطالعه حاضر نیز اثر توکسیک وآنتی پرولیفراسیون این دارو از طریق مرگ سلولی به اثبات رسید و از آنجایی که این دارو دارای ترکیبات مختلف می‌باشد و توسط محققین مختلف اثرات ضد توموری این عناصر مشخص شده است از اینرو مـی‌توان اثر توکسیک بودن این دارو را به عوامل و عناصر تشکیل دهنده آن نسبت داد.

نتایج بررسی آپوپتوز با تکنیک فلوسیتومتری در این مطالعه نیز نشاندهنده آپوپتوز در سلولهای تیمار شده با دارو می‌باشد و در مقایسه با سلولهای کنترل که هیچ آپوپتوزی در آنها صورت نگرفته است ٤٤٪ سلولها در ناحیه early آپوپتوزی هستند.

یک مطالعه دیگر بر روی حصاآ نشان داده است که حصاآ حاوی فلزات سنگین مثل کادمیم می‌باشد که می‌تواند آپوپتوز را در سلولهای جنین Zebrafish افزایش دهد(٢٤). شاید در مطالعه حاضر هم افزایش آپوپتوز بدلیل فلز کادمیم موجود در دارو باشد.

نتیجه گیری

در پایان می‌توان از این مطالعه نتیجه گرفت که حصا آ به علت تغییر در الگوی مرگ سلولی می‌تواند اثرات آنتی پرولیفراتیو و سیتوتوکسیک از طریق القای آپوپتوز بر روی سلولهای NB4 داشته باشد که همه اثرات آن را می‌توان به اجزای تشکیل دهنده‌اش نسبت داد.

تشکر و قدردانی

از شرکت دانش بنیان سیمرغ حکمت که در تهیه دارو و تامین بخشی از هزینه‌ها همکاری نمودند، سپاس گزاری می‌شود. همچنین از همکاران آزمایشگاه کشت سلول، گروه سم شناسی دانشکده داروسازی جناب آقای اکبری و سرکار خانم توجهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Montagna D, Maccario R, Montini E, Tonelli R, Lisini D, Pagani S, et al. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. Exp Hematol 2003 Nov; 31(11): 1031-8.

2. Hoffbrand AV, Catovsky D & Tuddenham EGD. Postgraduate Haematology. 5 ed. USA: Wiley Blackwell; 2005: 100-25.

3. Fauci A, Longo D, Kasper D, Hauser S, Jameson J & Loscalzo J. Harison's principle of internal medicine. 17 ed. USA: Mc Graw Hill; 2011 Feb: 6900-5.

4. Mc Pherson RA, Pincus MR & Henry JB. Henry′ s Clinical diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22 ed. USA: Elsevier; 2010: 678-702.

5. Moallem SA, Ahmadi A, Moshafi M & Taghavi MM. Teratogenic effects of HESA-A, a natural anticancer product from Iran, in mice. Hum Exp Toxicol 2011 Aug; 30(8): 851-9.

6. Moallem SA, Ahmadi A, Niapour M, Hosseini T & Habibi G. Role of apoptosis in HESA--a teratogenicity in mouse fetus. Drug Chem Toxicol 2009; 32(3): 186-90.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

7. Sadeghi Aliabadi H & Ahmadi A. Cytotoxicity and antitumor properties of a marine compound, HESA_A,on cancer cells. Daru 2003; 11(3): 8-10.

8. Wang ZY. Acute promyelocytic leukemia: from highly curable. Am Soc Hematology 2008 Apr; 111(5): 2505-10.

9. Sanz MA, Fenaux P & Lo coco F. Arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2005 Sep; 90(9): 1231-5.

10. Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Pendino F, Lanotte M, Aradi J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia:induction of telomerase-dependent cell death. Leukemia 2005 Oct; 19(10): 1806-11.

11. Cunha De Santis G, Tamarozzi MB, Sousa RB, Moreno SE, Secco D, Garcia A, et al. Adhesion molecules and differentiation syndrome:phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA,S2O3, phenybutyrate and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2007 Dec; 92(12)**:** 1615-22.

12. Zhang TC, Schmitt MT & Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomerase in relation to cell prolifration and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. Carcinogenesis 2003 Nov; 24(11): 1811-7.

13. Ghaffari SH, Shayan Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K & Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomerase length in patients with acute promylocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Annals of Oncology 2008 Nov; 19(11): 1927-34.

14. Rozen P, Lubin F, Papo N, Knaani J, Farbstein H, Farbstein M, et al. Calcium supplements interact significantly with long-term diet while suppressing rectal epithelial proliferation of adenoma patients. Cancer 2001 Feb; 91(4): 833-40.

15. Holbrook TL & Barrett Connor E. Calcium intake: covariates and confounders. Am J Clin Nutr 1991 Mar; 53(3): 741-4.

16. Burk RF. Selenium, an antioxidant nutrient. Nutr Clin Care 2002; 5(2): 75-9.

17. Fernandez Banares F, Cabre E, Esteve M, Mingorance MD, Abad Lacruz A, Lachica M, et al. Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status. AM J Gastroenterol 2002 Aug; 97(8): 2103-8.

18. Hiraoka K, Komiya S, Hamada T, Zenmyo M & Lnoue A. Osteosarcoma cell apoptosis induced by selenium. J Orthop Res 2001 Sep; 19(5): 809-14.

19. Costello AJ. A randomized, controlled chemoprevention trial of selenium in familial prostate cancer: Rationale, recruitment, and design issues. Urology 2001 Apr; 57(4): 182-4.

20. Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol 2002 Jun; 42(3): 249-65.

21. Melendez E. Titanium complexes in cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol 2002 Jul; 42(3): 309-15.

22. Patel VJ. Tantalum in diagnosing tumors of the ureter and renal pelvis. A preliminary report. Urologe 1978 May; 17(3): 150-4.

23. Komemushi A, Tanigawa N, Okuda Y, Kojima, Fujii H, Shomura Y, et al. A new liquid embolic material for liver tumors. Acta Radiol 2002 Mar; 43(2): 186-91.

24. Chan PK & Cheng SH. Cadmium induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos. Arch Toxicol 2003 Feb; 77(2): 69-79.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 7:45 IRST on Sunday December 17th 2017

Effect Of HESA-A On Acute Promyelocytic Cell Line(NB4)

Namjoo Soodeh[1](MSc.) - Nadali Fatemeh[2](Ph.D) - Kazemi Ahmad[2](Ph.D)
Dargahi Hossein[3](Ph.D) - Rezaiezadeh Hossein[4] (MSc.)
Rostami Shahrbanoo[5](Ph.D) - Ostad Seyed Nasser[6] (Ph.D)

1 Master of Sciences in Hematology and Blood Banking, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Associate Professor, Hematology and Blood Banking Department, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Associate Professor, Health Care Management Department, Member of Health Information Management Research Center, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 Ph.D Student in Traditional Medicine, School of Traditional Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5 Ph.D in Hematology, Hematology & Oncology and BMT Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6 Professor, Toxicology and Pharmacology Department, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Apr 2012
Accepted : Sep 2012

Background and Aim: Acute leukemia is one of the main causes of cancer in the world. Now a days using natural materials as source of anticancer drugs is more recommended. HESA-A is a drug of herbal-marine origin (patented by Iranian researcher). HESA-A is composed of 50% inorganic substance، 45% organic substance (aminoenthraquinone) and 5% water. In this study effects of HESA-A، on NB4 cell line (Acute promyelocytic leukemia cells) was evaluated.

Materials and Methods: HESA-A was prepared in normal saline as a stock solution (80 mg/ml, PH=7.4), and then was sterilized. After culturing and proliferation of NB4 cell line, the cells were treated by doses of 1, 2, 4 and 8 mg/ml of HESA-A. Respectively after 72h, the percentage of viable and dead cells were counted by using Trypan blue staining in Neubanr hemocytometer. Then by MTTassay, the percentage of cell survival were determined by ELISA reader in 570nm. Finally the effects of HESA-A on apoptosis were evaluated by flocytometery.

Results: This invitro study shows that HESA-A has a cytotoxcic and antiprolifrative effects against NB4 cell line (Dose dependent).IC50 dose was 5mg/ml .HESA-A can result in apoptosis in 50% of the cells.

Conclusion: Although the mechanism of HESA-A cytotoxicity action is not known, yet this study shows that this drug may cause apoptosis of cells by dose dependent method.

Key words: Acute Leukemia, NB4 Cell Line, HESA-A, Apoptosis

*** Corresponding Author:**
Ostad SN ;
E -mail:
Ostadnas @tums.ac.ir