مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۸ شماره ٤ مهر و آبان ۱۳۹۳، ۲۷۹-۲۶۹

بررسی اثر ترکیب داروهای ATRA و BIBR1532 در رده سلولی NB4

محمد صباغی[۱]، دکتر احمد کاظمی[۲]، سعید حسنی[۱]، دکتر کامران علی مقدم[۳]
دکتر اردشیر قوام زاده[٤]، دکتر سید حمیداله غفاری[۳]

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد نوعی از لوسمی است که در اثر توقف بلوغ در رده‌ی میلوئیدی بوجود می‌آید. مهمترین روشهای درمانی برای این لوسمی استفاده از ATRA و آرسنیک است. ATRA عموماً توسط بیماران خوب تحمل می‌شود، اما در برخی از بیماران موجب بروز "سندروم ATRA " می‌گردد. برخی از علائم این سندرم به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم با افزایش شمارش گلبول‌های سفید خون در ارتباط است. این مطالعه با هدف تعیین اثر ترکیب داروهای BIBR1532 و ATRA بر روی شمارش گلبول‌های سفید به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی سندرم انجام شده است.

روش بررسی: به منظور بررسی اثرترکیب دو داروی BIBR1532 و ATRA سلولهای NB4 به ترتیب در حضور غلظت‌های ۳۰ میکرومولار و ۱ میکرومولار از داروها کشت داده شد. از آزمون‌های تریپان بلو، Brdu و MTT به ترتیب جهت بررسی اثر داروها برشمارش سلول‌های زنده، فعالیت تکثیری، فعالیت متابولیکی سلولها استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده از تریپان بلو، MTT و Brdu نشان می‌دهد که ترکیب دو دارو، در مقایسه با زمانی که از ATRA به تنهایی استفاده می‌شود اثر بهتری روی کاهش شمارش سلول‌های زنده، فعالیت متابولیک و تکثیر سلول‌های سرطانی دارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که احتمالاً در صورت استفاده از ترکیب دو دارو در درمان بیماران، نتایج بهتری بدست می‌آید، این بهبود نتایج در چند روز اول درمان و به ویژه در دسته‌ای از بیماران که در معرض بروز سندرم ATRA هستند بیشتر مشهود می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، ATRA، BIBR1532، سندرم ATRA

* نویسنده مسئول :
دکتر سید حمیداله غفاری؛
مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email : Shghaffari200@yahoo.com

- دریافت مقاله : تیر ۱۳۹۳ پذیرش مقاله :شهریور ۱۳۹۳

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد یکی از سرطانهای خون است که در اثر نقص در بلوغ گلبولهای سفید در رده‌ی میلوئیدی به وجود می‌آید و باعث تجمع سلولهای نابالغی به نام پرومیلوسیت می‌شود. لوسمی پرومیلوسیتیک حاد(APL) حدود ٪۱۵-۱۰ انواع لوسمی میلوسیتیک حاد را شامل می‌شود و معمولاً در سنین ۵۰-۴۰ سالگی رخ می‌دهد. این بیماری همراه با هموراژی می‌باشد. لوسمی پرومیلوسیتیک حاد یک بیماری تهاجمی با وقوع ناگهانی است(۱). در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد به طور ثابت ناهنجاری‌های

[۱] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] استاد گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳] دانشیار مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[٤] استاد مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

کروموزومی غیرتصادفی به وجود می‌آید که به عنوان جابجایی بین بازوی‌های بلند کروموزومهای ۱۵ و ۱۷ شناخته می‌شود. این جابجایی باعث اتصال ژنهای RARα و PML شده و در نتیجه موجب تشکیل دو رونوشت الحاقی دو سویه می‌شود، یعنی PML/RARα که در تمام بیماران لوسمی پرومیلوسیتیک حاد وجود دارد، و RARα/PML که در ۲/۳ بیماران دیده می‌شود. بنابراین در این لوسمی یک جابجایی باعث ایجاد پروتئین الحاقی مختص به بیماری می‌گردد که در ایجاد بدخیمی نقش دارد(۲). علاوه بر ژن PML ژنهای دیگری نظیر PLZF، NuMA، NPM و Stat5b هم به RARα متصل می‌شوند و سبب ایجاد بیماری می‌شوند(در کمتر از ۲٪ موارد)(۳).

RARα-PML قادر به ایجاد همودایمر و محبوس کردن RXR و پروتئین PML در کمپلکس‌های بزرگ پروتئینی می‌باشد. این همودایمر مهارکننده‌ی رونویسی ژن‌هایی است که در روند تمایز گرانولوسیتی نقش دارند که از طریق اتصال به نواحی موسوم به عناصر پاسخ دهنده به رتینوئیک اسید(RAREs) در نواحی تنظیمی این ژن‌ها و به کار گیری پروتئین‌های Corepressor از قبیل Daxx و mSin3A/NcoR/HDAC در هر دو نیمه‌ی PML و RARα انجام می‌دهد(۴). غلظت فارماکولوژیک ATRA یعنی بین ۰/۱ میکرو مولار تا ۱ میکرو مولار سبب تغییر در پیکر بندی PML-RARα شده و در نتیجه کمپلکس Corepressor از گیرنده‌اش جدا می‌شود؛ در حالی که کمپلکس CO-activator ترکیب شده با پروتئین‌های دارای خاصیت هیستون استیلازی(HAT) به کار گرفته می‌شود و باعث باز شدن ساختار کروموزوم شده و در نهایت مهار رونویسی برداشته خواهد شد. این تغییرات با مطالعاتی ترانس کریپتومیک و پروتئومیک مورد تائید قرار گرفته‌اند(۵).

در حال حاضر از ATRA و آرسنیک تری اکساید جهت درمان لوسمی پرومیلوسیتیک حاد استفاده می‌شود. اما در بسیاری از موارد، امکان عود مجدد وجود دارد، لذا یافتن درمانهای جایگزین ضروری است(۲). مهمترین مشکلی که بیماران به دنبال مصرف ATRA با آن مواجه می‌شوند، سندرومی موسوم با "سندروم اسید رتینوئیک " است. علائم این سندروم شامل تب غیر قابل توجیه، از دست دادن وزن، مشکلات تنفسی، افزایش شمارش گلبول‌های سفید در خون محیطی، اینفیلتراسیون سلولی در ریه، نشت سلول‌ها به پرده پلورال و پری کاردیال است. میزان وقوع این سندرم ۲۵٪ و میزان مرگ و میر ناشی از آن در حدود ۲٪ از کل موارد تجویز ATRA است. در این میان به نظر می‌رسد درصد قابل توجهی از این علائم بالینی در این بیماران به طور مستقیم و یا غیر مستقیم به علت شمارش بالای گلبول‌های سفید خون در این بیماران باشد(۶). مطالعات قبلی نشان می‌دهد داروی ATRA در دوز ۱ میکرو مولار نمی‌تواند به طور قابل توجهی شمار و درصد سلول‌های زنده در محیط کشت را کاهش دهد(۷). از آنجایی که سلول‌های پرو میلوسیت تا رسیدن به بلوغ، توانایی میتوز را تا ۳ مرتبه دارند، این موضوع چندان دور از ذهن نیست که مکانیسم اثر داروی ATRA در القای تمایز در پرومیلوسیت‌ها خود می‌تواند باعث این افزایش شمارش سلولی شود(۸) .

امروزه نسل جدیدی از داروهای ضد سرطان با قابلیت مهار ترمیم تلومر به روش‌های مختلف تولید شده‌اند. تلومرها ساختارهایی هستند که در انتهای کروموزوم‌ها وجود دارند و آنزیم تلومراز مسئول نگه داشتن طول این تلومرهاست. طول تلومر نقش مهمی

در فرآیندهایی از قبیل آپوپتوز و پیری سلولی دارد. همچنین مشخص شده است سلول‌های سرطانی طول تلومرهای کوتاهتر و فعالیت تلومرازی بیشتری نسبت به سلول‌های طبیعی دارند. این تفاوت، موقعیت مناسبی برای استفاده از داروهای مهارکننده تلومراز مثل داروی BIBR1532 درمان سرطان‌ها فراهم آورده است(۹). اگرچه مکانیسم دقیق داروی BIBR1532 هنوز به خوبی مشخص نشده است، اما مطالعات نشان می‌دهد که این ترکیب مستقیماً اجزای مرکزی آنزیم تلومراز را مورد هدف قرار می‌دهد. داروی BIBR1532 مراحل کاتالیتیک فعالیت آنزیم را که شامل کپی شدن الگوست، مهار نمی‌کند، بلکه وقتی سوبسترا (DNA) طولانی شد و به انتهای ´۵ الگو رسید، در آنجا اثر کرده و به دنبال تکمیل کپی شدن الگو، باعث مهار جابجایی آنزیم بروی سوبسترا و یا جدایی آنزیم از سوبسترا می‌شود که منجر به تولید تلومرهایی با طول کوتاه می‌شود. در نتیجه‌ی این عمل، کروموزوم‌های موجود تلومرهای کوتاه خواهند داشت(۱۰).

در مطالعاتی که El-Daly و همکاران روی اثرBIBR1532 بر رده‌های سلولی مختلف لوسمی و همچنین سلول‌های به دست آمده از بیماران لوسمی‌حاد میلوئید و لوسمی مزمن لنفوئیدی انجام شد، اثر ساتیوتوکسیک وابسته به دوز BIBR1532 مشاهده گردیده است(۱۱). مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین چگونگی استفاده از داروی BIBR1532 در کنار داروی ATRA به منظور تاثیر بر عواملی که باعث شکل گیری سندروم ATRA در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می شود انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه سلولهای NB4 ابتدا در غلظت‌های دارویی مد نظر کشت داده شدند و سپس تعداد سلول‌های زنده مانده با استفاده از تکنیک Trypan Blue Exclusion Assay، فعالیت متابولیک سلولها توسط MTT Assay، و میزان تکثیر سلول‌ها با انجام آزمون Brdu بررسی شد.

از آنجایی که این مطالعه از نوع مطالعات پایه‌ای بود و در شرایط in vitro و بر روی رده سلولی NB4 انجام گرفت، بنابراین نمونه گیری از بیمار در آن منظور نشده است. سلولهای NB4 از نوع سلولهای سوسپانسیون بودند؛ یعنی به صورت محلول و منفرد می‌باشند. رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال تهیه شد. آنالیز آماری با استفاده از آزمون Student-t-test و نرم افزار EXCEL انجام شد.

برای تهیه استوک ۱۰۰mM داروی ATRA، مقدار mgr ۳۰ از پودر ATRA در یک میلی لیتر DMSO حل شد. سپس از استوک فوق، محلول کاری با غلظت mM ۱ تهیه گردید. استوک ۱۰۰mM از داروی BIBR1532(Tocris, bioscience, USA) با حل کردن پودر در DMSO تهیه و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای تهیه‌ی استوک ۱۰۰mM از BIBR1532، مقدار mgr ۱۰ از پودر BIBR1532 در مقدار µL DMSO ۳۰۲ حل شد. برای تهیه محلول کاری NB4 mM ۵، مقدار µL ۲۵ از استوک ۱۰۰mM در DMSO µL ۷۵ و RPMI ۴۰۰µL حل شد.

رده سلولی NB4(خریداری شده از انیستیتو پاستور ایران) در محیط کشت RPMI-1640 ساخت شرکت GIBCO حاوی FBS با غلظت ۱۰٪ در حضور ۵٪ گاز CO2 و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. این محیط حاوی BIBR1532 با غلظت ۳۰ میکرو مولار و ATRA با غلظت ۱

میکرومولار بود. محیط هر ۴۸ ساعت یک بار برای جلوگیری از کاهش مواد مغذی و غلظت داروهای موجود در محیط کشت تعویض گردید.

برای بررسی تعداد سلولهای زنده از Trypan Blue Exclusion Assay استفاده شد. در ابتدا برای همه‌ی دوزها به میزان کاملاً برابر سلول یعنی ۲۰۰ هزار در هر میلی لیتر محیط کشت ریخته شد، تا در شرایط تعداد سلول برابر، شمارش سلول‌ها در مدت زمان‌های مورد نظر با هم مقایسه شوند. شمارش سلول‌ها به مدت ۱۴ روز به روش زیر در هر ۲۴ ساعت یکبار انجام پذیرفت. ابتدا سلولها سانترفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته و با ۱ سی سی محیط، پلیت سلولی معلق شد. ۱۰-۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته و به همان میزان از رنگ تریپان بلو به آن اضافه شد و به مدت ۱-۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید تا رنگ، جذب سلولهای مرده شود. سپس این سلولها با لام نئوبار شمارش شد و تعداد سلولهای زنده در هر میلی لیتر محیط کشت محاسبه گردید.

از تست MTT به منظور تشخیص میزان فعالیت متابولیک سلول‌ها استفاده شد. با توجه به اینکه قرار بود آزمون MTT برای مدت طولانی تری یعنی ۵ روز روی سلول‌های تیمار شده انجام گیرد، این احتمال وجود داشت که غلظت داروها و همچنین مواد مغذی درون محیط کشت کاهش یابد، لذا سلول‌ها ابتدا با تعداد کاملاً برابر یعنی ۲۰۰×۱۰^۳ در میلی لیتر در فلاسک در حجم ml ۴ تیمار شدند و هر ۴۸ ساعت محیط آنها تعویض گردید و دوباره با دارو تیمار شدند. سپس در روزهای مورد نظر پس از اینکه سلول‌ها کاملاً به صورت یکنواخت معلق گردیدند، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول حاوی سلول‌ها به چاهک پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد. به منظور بررسی تاثیرات سایتوتوکسیک دارو به روش MTT، بعد از انتقال ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده و پس از تکان دادن به مدت ۵ دقیقه، پلیت به مدت ۳ ساعت انکوبه گردید. این پلیت با دور g ۳۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب ته پلیت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه پلیت در دمای ۳۷ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در نهایت پلیت جهت قرائت در دستگاه الایزا ریدر قرار گرفت و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

از آزمون Brdu به منظور تشخیص میزان تکثیر سلولی استفاده شد. Brdu می‌تواند در ساختار DNA تازه سنتز شده در مرحله‌ی S چرخه سلولی وارد شود. در مرحله‌ی بعد می‌توان با استفاده آنتی بادی ضد Brdu به میزان Brdu در ساختار DNA سلول پی برد، که خود نشان دهنده‌ی میزان تکثیر این سلول‌هاست(۱۲). برای انجام این آزمون از کیت(colometric)Brdu، Cell Proliferation ELISA محصول شرکت Roche استفاده شد. در اینجا نیز با توجه به اینکه قصد بر این بود که آزمون Brdu برای مدت طولانی‌تری یعنی ۵ روز روی سلول‌های تیمار شده انجام گیرد، به همان طریق که در قبل توضیح داده شد سلول‌ها کشت داده شدند و سپس تست مطابق با پروتوکل موجود در کیت روی آنها انجام گردید.

یافته‌ها

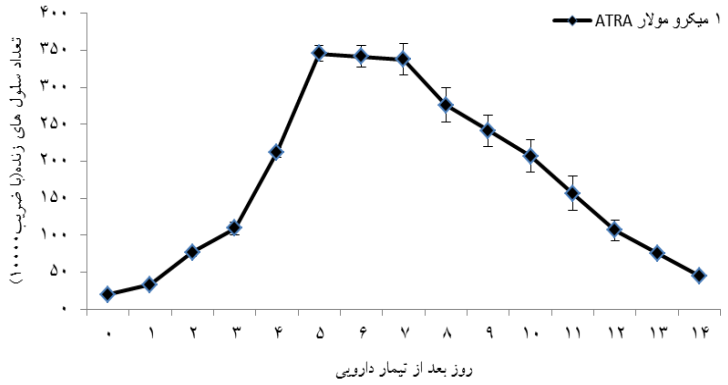
بعد از کشت رده سلولی NB4 در غلظتهای ۳۰ میکرومولار از BIBR1532 و ۱ میکرومولار از

ATRA، شمارش تعداد سلول‌های زنده به طور روزانه با استفاده از روش Trypan Blue Exclusion Assay مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: شمارش تعداد سلول‌های زنده در هر میلی لیتر محیط در روزهای مختلف(×۱۰۰۰۰)

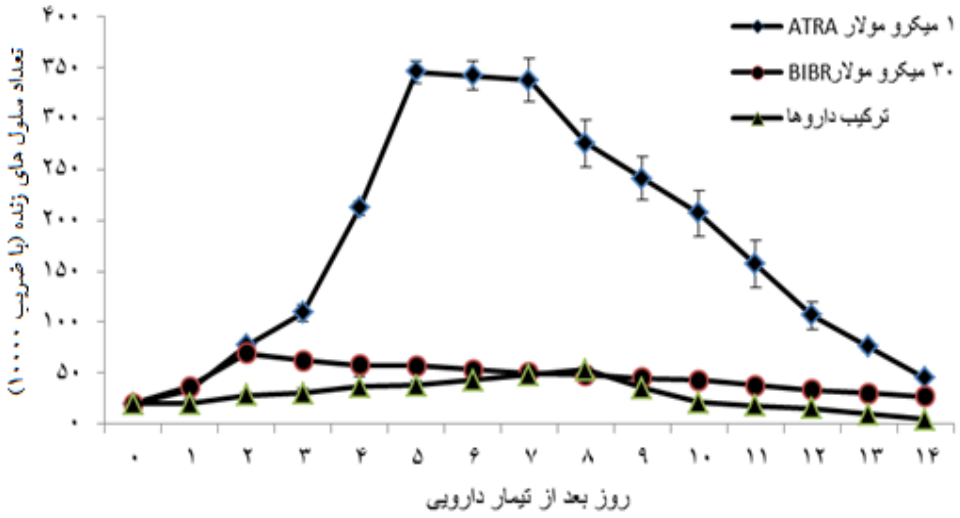
دوز / روز	Untreateted	1 µM ATRA	30 µM BIBR	combination
۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
روز ۱	۴۶	۳۳	۳۶	۲۰
روز ۲	۸۷	۷۷	۷۰	۲۸
روز ۳	۱۳۱	۱۰۹	۶۲	۳۰
روز ۴	۲۹۱	۲۱۲	۵۸	۳۶
روز ۵	۵۱۰	۳۴۶	۵۷	۳۷
روز ۶	۱۰۲۷	۳۴۲	۵۳	۴۳
روز ۷	۱۵۴۵	۳۳۸	۵۰	۴۸
روز ۸	۲۱۳۶	۲۷۶	۴۸	۵۳
روز ۹	۲۹۰۴	۲۴۳	۴۴	۳۵
روز ۱۰	۴۹۴۴	۲۰۷	۴۳	۲۱
روز ۱۱	۸۵۰۸	۱۵۷	۳۸	۱۸
روز ۱۲	۱۲۰۷۲	۱۰۸	۳۴	۱۵
روز ۱۳	۳۰۰۱۲	۷۶	۳۱	۹
روز ۱۴	۴۷۹۵۲	۴۵	۲۹	۴

همانطور که در جدول ۱ مشخص است داروها بر شمارش سلول‌های زنده تاثیر گذار بودند و این اثر مهاری در ترکیب دو دارو نسبت به هرکدام از آنها بیشتر است.



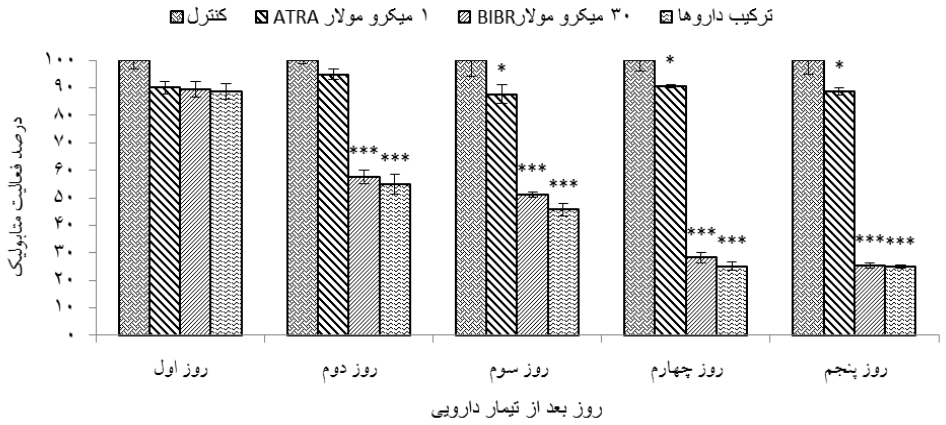
شکل ۱: منحنی رشد سلول‌های تیمار شده با ۱ µM از ATRA

شکل ۱ منحنی شمارش سلول‌های تیمار شده با دوز ۱ میکرومولار ATRA را نشان می‌دهد که موید این نکته است شمارش سلول‌های تیمار شده با دوز ۱ میکرومولار از ATRA در ۵ روز اول به میزان کمی تحت تاثیر دارو قرار می‌گیرد. به عبارت دیگر، علیرغم حضور ATRA در محیط، افزایش تصاعدی شمارش سلولی همچنان دیده می‌شود و از روز ۶ به بعد تعداد سلول‌های زنده شروع به کاهش می‌کنند.



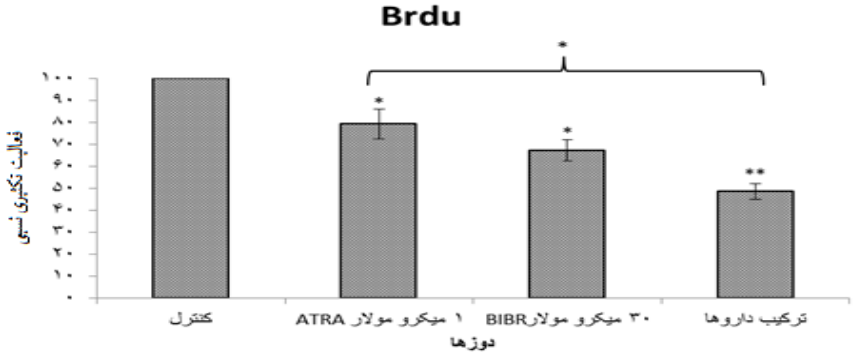
شکل ۲: منحنی مقایسه رشد سلول‌های تیمار شده با ۱ µM از ATRA و ۳۰ µM ازBIBR1532 و سلول‌های تیمار شده با ترکیب دو دارو

شکل ۲ منحنی شمارش سلولی در دوزهای مختلف را با هم مقایسه می‌کند. این شکل نشان می‌دهد ترکیب دو دارو از افزایش شمارش سلول‌های لوسمی در فاز اولیه ۵ روزه جلوگیری می‌کند و در همین حال در دراز مدت نیز شمارش سلولی را پایین نگه می‌دارد.



شکل ۳: نمودار فعالیت متابولیک سلول‌های تیمارشده با BIBR1532 و ATRA و ترکیب این دو دارو
(*: P<0.05, **: P <0.01, ***: P<0.001)

نتایج حاصل از MTT در شکل۳ نشان می‌دهد که فعالیت متابولیک سلول‌های تیمار شده با دوز ۱ میکرو مولار ATRA در طی ۵ روز اول تیمار سلول‌ها به طور موثری کاهش پیدا نکرده است و تنها به حدود ۹۰ درصد سلول‌های کنترل می‌رسد؛ در حالی که در همین مدت سلول‌هایی که با ترکیب ۱ میکرو مولار از ATRA و ۳۰ میکرو مولار از BIBR1532 به طور معناداری در مقایسه با سلول‌های کنترل با کاهش فعالیت متابولیک روبرو هستند و این فعالیت متابولیک در روز پنجم به حدود ۲۵٪ می‌رسد.



شکل ۴: نتایج حاصل از آزمون Brdu سلول‌های تیمار شده با BIBR1532
و ATRA و ترکیب این دو دارو P<۰/۰۵ :*، P<۰/۰۱ :**

نتایج حاصل از آزمون Brdu در شکل ۴ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که داروی ATRA به تنهایی تا روز پنجم فقط توانسته است به میزان ۲۱ درصد تکثیر سلول‌ها را مهار کند و این فعالیت را به میزان ۷۹٪ سلول‌های تیمار نشده برساند. در حالی که ترکیب این دارو با BIBR1532 به طور معناداری توانسته این تکثیر را مهار کند.

بحث

در این مطالعه ترکیب دو داروی BIBR1532 و ATRA روی رده سلولی NB4 مربوط به لوسمی پرومیلوسیتی حاد مورد بررسی قرار گرفت. مهم ترین مشکلی که بیماران به دنبال مصرف ATRA با آن مواجه می‌شوند، سندروم اسید رتینوئیک است. درصد قابل توجهی از علائم بالینی در این سندروم به طور مستقیم و یا غیر مستقیم به علت شمارش بالای گلبول‌های سفید خون در این بیماران می‌باشد(۶).

تا به حال پژوهش‌های انجام شده عوامل مختلفی را در ایجاد این لوکوسیتوز دخیل دانسته‌اند. یکی از این عوامل که به نظر می‌رسد در افزایش شمارش لکوسیت‌ها دخیل هستند، افزایش گیرنده‌های سطحی است که خروج این سلولها را از مغز استخوان تسهیل می‌کند. همچنین تئوری‌های دیگری همانند افزایش طول عمر سلول‌های بالغ شده نیز در این ارتباط بیان شده است(۱۳). از طرف دیگر، چنین به نظر می‌رسد تغییراتی که سلول‌های پرومیلوسیت و اندوتلیال در معرض ATRA پیدا می‌کنند، می‌تواند در افزایش نفوذ این سلول‌ها به بافت‌ها دخیل باشد. هم چنین، مشخص شده است پرومیلوسیت‌ها به دنبال تاثیر ATRA، LFA-1 را بیشتر بروز می‌دهند و بدنبال آن راحت‌تر در فرآیند مهاجرت از رگ به بافت شرکت می‌کنند و یا اینکه مشخص شده است، سلولهای اندوتلیال به میزان بیشتری ICAM-1(به دنبال اثر ATRA بر روی آنها) بروز می‌دهند(۶). یکی از دلایل افزایش شمارش گلبول‌های سفید می‌تواند همین موضوع باشد. چنین به نظر می‌رسد که سلول‌های پرومیلوسیت به دنبال تیمار دارویی با ATRA شروع به تمایز می‌کنند، اما در همین حال سلول‌های پرومیلوسیت توانایی ۳ مرحله میتوز را تا رسیدن به مرحله‌ی نوتروفیل دارند(۸)، که همین امر افزایش شمارش این سلول‌ها را به دنبال استفاده از ATRA توجیه می‌کند. لذا یکی از راه‌های جلوگیری از بروز سندروم می‌تواند استفاده از درمان‌های ترکیبی به منظور جلوگیری از افزایش تعداد سلول‌ها در روزهای اولیه تیمار سلولی باشد(۶).

داروی آرسنیک که امروزه به عنوان مهمترین داروی ترکیبی با ATRA استفاده می‌شود، هر چند به میزان قابل توجهی در کیفیت بهبودی بیماری تاثیرگذار است، اما نمی‌تواند از میزان وقوع سندرم اسید رتینوئیک در ارتباط با هایپرلوکوسیتوز جلوگیری کند و چه بسا این بیماران هایپرلوکوسیتوز شدیدتری را نسبت به گروهی که فقط ATRA را دریافت کرده‌اند، تجربه کنند. پژوهشگران پیشنهاد می‌کنند به منظور کنترل افزایش شمارش گلبول‌های سفید، از شیمی درمانی‌های دیگری در کنار درمان ترکیبی، یعنی آرسنیک/ATRA، استفاده گردد که پر واضح است در کیفیت زندگی بیماران تحت درمان، اثر منفی خواهد داشت(۱۴). در مقاله‌ای که توسط Jing و همکاران در سال ۲۰۰۱ منتشر شد مشخص گردید که داروی ATRA در دوز ۱ میکرو مولار تا روز ۴ نمی‌تواند به طور قابل توجهی شمارش و درصد سلول‌های زنده را کاهش دهد و در این روز تعداد سلول‌های زنده فقط به حدود ۸۵٪ تعداد سلول‌های کنترل می‌رسد. این گروه در ادامه از داروی آرسنیک با

دوز ۰/۵ میکرو مولار در کنار ATRA استفاده کرد، اما در شمارش سلول‌های زنده تغییر محسوسی مشاهده نشد و درصد سلول‌های زنده نسبت به کنترل در روز ۴ به حدود ۷۵٪ رسید(۷). در حالی که نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که در این دوز، ترکیب دو داروی ATRA و BIBR1532 توانسته است از افزایش شمارش سلولی به طور کاملاً واضحی جلوگیری کند و این شمارش را در ۳۶×۱۰^{۳} نگه دارد. در حالی که در همین روز سلول‌های تیمار نشده‌ی شمارشی معادل ۲۹۱×۱۰^{۴} و سلول‌های تیمار شده با ۱ میکرومولار ATRA عدد ۲۱۲×۱۰^{۴} را نشان می‌دادند.

نتایج آزمون Brdu به طور دقیق‌تر این نکته را که داروی ATRA به تنهایی نمی‌تواند به طور موثری تکثیر سلول‌های بدخیم را مهار کند نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که این دارو تا روز پنجم تنها توانسته است ۲۱ درصد خاصیت سلول‌های بدخیم را مهار کند. در مطالعه‌ای که توسط ماندگاری و همکاران نیز صورت گرفته است به این نکته اشاره شده است که داروی ATRA نمی‌تواند به طور موثر و مشخصی تکثیر سلول را مهار کند(۱۴).

پیش‌تر در مطالعه Vahdat و همکاران گزارش شد که شمارش گلبول‌های سفید خون از شروع درمان با ATRA و همچنین شتاب بالا رفتن شمارش گلبول‌های سفید خون در حین درمان ATRA رابطه‌ی معناداری با سندرم ATRA ندارد. اما شمارش بالای گلبول‌های سفید خون در طول درمان با ATRA می‌تواند به عنوان یک عامل خطر مورد توجه قرار گیرد. آنها در ادامه‌ی بررسی تاثیر لوکوفرز و شیمی درمانی به دنبال بوجود آمدن سندرم ATRA پرداختند و متوجه شدند چنانچه لوکوفرز و شیمی درمانی با عواملی مثل ara-c(سیتوزین آرابینوزید) و هیدروکسی اوره بعد از بوجود آمدن سندرم ATRA شروع شوند، نمی‌توانند تاثیر قابل توجهی به علائم و مشکلات این سندرم بگذارند؛ اما استفاده از دوز بالای کورتیکواستروئید در این شرایط، یعنی بعد از شروع درمان با ATRA، می‌تواند تاثیرگذار بوده و علائم سندرم را کاهش دهد(۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که استفاده از ترکیب دو داروی BIBR1532 و ATRA نتایج بهتری در درمان این بیماران به دست می‌آید. به نظر می‌رسد این بهبود نتایج در دو مرحله قابل توجه باشند: یکی در اثر بخشی طولانی مدت داروی ATRA که با توجه به اثر ترکیب دو دارو در تیمار ۱۴ روزه‌ی سلول‌ها مطرح می‌گردد و دیگری در چند روز اول درمان و به ویژه در دسته‌ای از بیماران که در معرض بروز سندرم ATRA هستند. البته این امر مستلزم انجام پژوهش‌های بیشتری در استفاده از داروی BIBR 1532 در فازهای بعدی مطالعات و همچنین ترکیب این دو دارو خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با تامین بودجه توسط مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفت، لذا نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولان و کارکنان آن مرکز ابراز می‌دارند.

منابع

1. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol 2004 Jul; 51(1): 1-28.

2. Warrell RP Jr, de The H, Wang ZY & Degos L. Acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med 1993 Jul; 329(3): 177-89.

3. Pandolfi PP. Pml, Plzf and Npm genes in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Haematologica 1996 Sep-Oct; 81(5): 472-82.

4. Rowley JD, Golomb HM & Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. Lancet 1977 Mar; 1(8010): 549-50.

5. Zheng PZ, Wang KK, Zhang QY, Huang QH, Du YZ, Zhang QH, et al. Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2005 May; 102(21): 7653-8.

6. Larson RS & Tallman MS. Retinoic acid syndrome: Manifestations, pathogenesis, and treatment. Best Pract Res Clin Haematol 2003 Sep; 16(3): 453-61.

7. Jing Y, Wang L, Xia L, Chen GQ, Chen Z, Miller WH, et al. Combined effect of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells in vitro and in vivo. Blood 2001 Jan; 97(1): 264-9.

8. Henry JB, Mc Person RA & Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Philadelphia: Elsevier; 2007: 495.

9. Baker NM. Targeting telomerase and telomeres with small molecule anticancer compounds. Basic Biotechnology eJournal 2008; 1(1): 72-9.

10. Pascolo E, Wenz C, Lingner J, Hauel N, Priepke H, Kauffmann I, et al. Mechanism of human telomerase inhibition by bibr1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. J Biol Chem 2002 May; 277(18): 15566-72.

11. El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, Pantic M, Waller CF & Martens UM. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor bibr 1532. Blood 2005 Feb; 105(4): 1742-9.

12. Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, Lehner C, Furtner T, Couillard-Despres S, et al. The dark side of brdu in neural stem cell biology: Detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. Cell Tissue Res 2011 Sep; 345(3): 313-28.

13. Bi KH & Jiang GS. Relationship between cytokines and leukocytosis in patients with apl induced by all-trans retinoic acid or arsenic trioxide. Cell Mol Immunol 2006 Dec; 3(6): 421-7.

14. Mandegary A & Mehrabani M. Effects of arsenic trioxide, all-trans-retinoic acid and dexamethasone on nb4 cell line. Daru 2010; 18(4): 303-9.

15. Vahdat L, Maslak P, Miller WH Jr, Eardley A, Heller G, Scheinberg DA, et al. Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: Impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, pmn/rar-alpha isoform, and cd13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid. Blood 1994 Dec; 84(11): 3843-9.

Evaluation Of BIBR1532 And ATRA Combination In NB4 Cell Line

Sabbaghi Mohammad[1](MSc.) - Kazemi Ahmad[2](Ph.D) - Hassani Saeed[1](MSc.)
Alimoghaddam Kamran[3](M.D.) - Ghavamzadeh Ardeshir[4](M.D.)
Ghaffari Seyed Hamidollah[3](Ph.D)

1 Master of Sciences in Hematology & Blood Banking, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Professor, Hematology & Blood Banking Department, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Associate Professor, Hematology-Oncology and Stem cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 Professor, Hematology-Oncology and Stem cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Jun 2014
Accepted : Sep 2014

Background and Aim: Acute promyelocytic leukemia (APL) is a distinct type of leukemia which is caused due to a blockage in myeloid cells normal maturation. The most important therapeutic strategies include the use of ATRA and Arsenic trioxide. Although ATRA is generally well tolerated, some patients develop Retinoic acid syndrome. Some of the symptoms of this syndrome are directly or indirectly related to elevated WBC counts. This study aims to determine the effect of ATRA and BIBR1532 combination on WBC count as a factor leading to the formation of ATRA syndrome.

Materials and Methods: To investigate the effect of BIBR1532 and ATRA combination, NB4 cells were cultured in the presence of 30μ M and 1 μM densities of the drugs. To study the effect of drugs on living cells count, proliferation activity, and metabolic activity of the cells, Trypan blue, Brdu and MTT tests were used, respectively.

Results: The results of Trypan blue, MTT and Brdu suggest that the combination of ATRA and BIBR1532 is more effective than ATRA alone on the reduction of viable cell count, metabolic activity and proliferation of leukemic cells in the first five days of treatment.

Conclusion: The results suggest that the combination of ATRA and BIBR1532 is probably more effective in the treatment of APL patients. It seems that such improvement in results is more obvious especially among the patients who are at a higher risk of ATRA syndrome.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, ATRA, BIBR1532, ATRA Syndrome

* **Corresponding Author:**
Ghaffari Seyed H;
E -mail:
Shghaffari200@yahoo.com