



تأثیر آدنوزین-۵-تری فسفات در القای آپوپتوز و مهار بیان ژن Survivin و واریانت K562 SUR-3B آن در سلول‌های

محمد علی حسینپور فیضی^۱، سید محمد امین موسوی^{*۲}، امیر حسین احمدی^۳، علی موافقی^۴

۱- استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۷

چکیده

مقدمه: لوسمی یک بیماری بدخیم محسوب می‌شود که در آن پیشرفت بیماری در سطح سلول‌های CD34+، اثرات عمدہ‌ای در مقاومت به دارو و عود مجدد بیماری داشته و همزمان، پروتئین‌های مهار کنندگی آپوپتوز (IAPs) نظری Survivin و نیز پروتئین P-Glycoprotein به عنوان محصول ژن مقاومت به دارو در این سلول‌ها سبب بروز مقاومت به آپوپتوز و در نهایت مقاومت به دارو و شیمی درمانی می‌شود. اخیراً گزارش شده است که آدنوزین-۵-تری فسفات (ATP) قادر به مهار رشد و القای آپوپتوز در چندین رده‌ی سلولی میلوئیدی می‌باشد که در این میان، رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدلی برای لوسمی میلوئید مزمن (CML) دارای خصوصیات ویژه‌ای در بیان Survivin و سایر ژن‌های مرتبط با مقاومت دارویی می‌باشد. به همین منظور در مطالعه‌ی حاضر اثر ATP بر رده‌ی سلولی K562 و بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش برسی: رده‌ی سلولی K562 انسانی پس از کشت، تحت تأثیر ATP در غلظت و فواصل زمانی گوناگون قرار گرفت. اثرات ATP بر رشد و زیستایی سلول‌های K562 با استفاده از شمارش سلولی توسط هموسایتومتر و آزمون دفع رنگ تریپان بلو بررسی شد. برای برسی آپوپتوز میکروسکوپ فلورسانس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که ATP سبب مهار رشد وابسته به زمان و غلظت و القای آپوپتوز می‌شود. همچنین ATP کاهش بیان ژن Survivin و واریانت ضد آپوپتوزی Sur-3B آن می‌گردد ($P < 0.05$). سطح بیان دیگر واریانت‌های پیرایشی ΔEx3 ، 2α و $2b$ و 3α تغییر معناداری نشان نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر ATP در کاهش بیان Survivin و واریانت پیرایشی Sur-3B و القای آپوپتوز این ترکیب می‌تواند در کنار سایر ترکیبات دارویی برای کاهش مقاومت دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز - مقاومت دارویی - ATP - K562 - لوسمی - Survivin

مقدمه

سلول‌های مختلف تولید می‌شود که از آن جمله می‌توان به واریانت‌های Δ Ex3، Δ Ex3 α ، 2b، 3b و 3 α اشاره کرد (۷،۸). هر یک از این واریانت‌ها ویژگی‌های خاصی در ارتباط با فرآیند آپوپتوز داردند. به عنوان مثال تاکنون نقش ضدآپوپتوزی برای واریانت پیرایشی Δ Ex3 و 3b و نقش پروآپوپتوزیک برای واریانت 2b و 2 α گزارش شده است (۷،۸).

یکی از شاخص‌ترین خصوصیات Survivin بیان بالا و متمایز آن در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی می‌باشد (۶). گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که بیان بالای Survivin در بیماران سرطانی با کاهش طول عمر این بیماران، افزایش احتمال عود بیماری و مقاومت به درمان در ارتباط است (۹). مطالعات صورت گرفته در مبتلایان به CML نیز نشان می‌دهد که Survivin به میزان بالایی در تمامی مراحل بیماری در مقایسه با افراد سالم بیان می‌شود (۹). با توجه به این یافته‌ها هر عاملی که بتواند بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی ضد آپوپتوزی آن را کاهش دهد و سبب القای آپوپتوز شود می‌تواند به عنوان عاملی برای کاستن از مقاومت دارویی و یک راهکار درمانی مؤثر برای مبتلایان به CML مطرح شود (۱۰).

در جستجوی ترکیبی که قادر به القای آپوپتوز و کاهش مقاومت دارویی باشد آدنوزین ۵- تری فسفات (ATP) می‌تواند به عنوان یکی از کاندیداهای بالقوه مطرح گردد. ATP نه تنها به عنوان یک منبع رایج انرژی برای سلول‌ها محسوب می‌شود بلکه می‌تواند به عنوان یک مولکول پیام رسان بین سلولی ایفای نقش کند و سبب ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیک متنوع در سلول‌های مختلف شود (۱۱). ATP به صورت خارج سلولی می‌تواند از طریق گیرنده‌های سطح سلولی پورینی موسوم به گیرنده‌های P2، سبب راه اندازی مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی و القای اثرات کوتاه مدتی چون ترشح سیتوکین، تجمع پلاکت‌ها، التهاب و موارد بسیار دیگر شود (۱۱). از طریق ATP می‌تواند در سلول‌های مختلف اثرات بلند مدت مختلفی چون آپوپتوز، تمایز و تکثیر اعمال کند که اشاره به اهمیت این نوکلئوتیدها در فرآیندهایی چون رشد و مرگ سلولی دارد (۱۲). در واقع اثرات ضد سرطانی

لوسمی میلوئید مزمن (CML) به دلیل یک جابجایی دو طرفه بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چند توان، ایجاد می‌شود (۱،۲). انکوژن p210Bcr-Abl حاصل از این جابجایی، پروتئین Abl را کد می‌کند که علاوه بر تکثیر بی‌رویه و مستقل از فاکتور رشد سلول‌های پیش ساز میلوئید، باعث اختلال در مرگ طبیعی و برنامه ریزی شده‌ی آپوپتوز آنها نیز می‌شود (۲،۱).

تا کنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، درمان با ایترافرون آلفا، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد (۳). در کتاب این راهکارها استفاده از مهار کننده‌های تیروزین کینازی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. کاربرد یکی از این مهار کننده‌ها که به طور اختصاصی Bcr-Abl را مهار می‌کند و ایماتینیب مسیلات (Imatinib mesylate) یا STI571 (با نام تجاری Gleevec) نامیده می‌شود، در حال حاضر خط اول درمانی CML محسوب می‌شود (۴). به هر حال استفاده از این مهار کننده‌ها نیز با برخی اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی همراه است که اشاره به این دارد که هیچ یک از روش‌های درمانی فعلی منجر به درمان کامل CML نگردیده است (۵). این گونه عنوان شده است که علت اصلی مقاومت دارویی وجود مکانیسم‌های مختلف در سطح سلول‌های CD34+ می‌باشد. سلول‌های سرطانی با استفاده از مکانیسم‌های مختلف از جمله تغییر در متابولیسم دارو، کاهش جذب دارو و یا افزایش خارج شدن دارو با استفاده از P-گلیکوپروتئین نسبت به داروها مقاومت نشان می‌دهند (۵). یکی دیگر از مکانیسم‌های عمدی مقاومت ذاتی و اکتسابی به دارو مقاومت به آپوپتوز است. بیان بیش از حد پروتئین‌های مهار کننده‌ی آپوپتوز (IAPs) در سلول‌های سرطانی یکی از عوامل اصلی مقاومت آنها به آپوپتوز محسوب می‌شود (۶). یکی از اعضای خانواده‌ی Survivin پروتئین‌های مهار کننده‌ی آپوپتوز به شمار می‌رود که در تنظیم مرگ سلولی و کنترل تقسیم سلولی نقش ایفا می‌کند (۷). علاوه بر Survivin واریانت‌های پیرایشی دیگری نیز از این ژن در

و آنزیم MMulV-RT نیز از شرکت آلمان Fermentase خریداری شد.

کشت سلول: ردهی سلولی K562 از استیتو پاستور ایران تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI 1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱٪ و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) و پنی سیلین (100 U/mL) بود، استفاده گردید. محیط کشت سلول‌ها در محیط استریل و زیر هود مخصوص کشت سلول هر دو روز یکبار مورد تعویض قرار گرفت. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در فلاسک‌های استریل و در انکوباتور مخصوص کشت انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، O_2 ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفت.

بررسی مهار رشد سلولی و زیستایی با استفاده از هموسایتومتر و تریپان بلو: برای این منظور تعداد 2×10^4 سلول از سلول‌هایی که در پاساژ چهارم خود بودند در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف از چاهکی قرار داده شد. در هر بازه‌ی زمانی تعداد سلول‌های هر ۷۲ ساعت اضافه شد. در هر بازه‌ی زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و آزمون تریپان بلو مورد شمارش قرار گرفت.

مطالعه‌ی ریخت شناسی سلول‌های آپوپتوزی: به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌باشد از میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ آمیزی آکریدین اورنج (AO)/اتیدیوم بروماید (EtBr) استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول‌های زنده رنگ سبز یکنواخت به خود می‌گیرند. سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز نزدیک اورنج (Early Apoptotic)، رنگ سبز به خود می‌گیرند و دارای نقاط روشن سبز در هسته هستند که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند. سلول‌هایی که در مراحل نهایی آپوپتوز اند (Late Apoptotic) رنگ اتیدیوم بروماید را از خود عبور می‌دهند و بدین ترتیب رنگ نارنجی (Orange) می‌گیرند. در مقایسه با سلول‌های آپوپتوز ثانویه که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند، سلول‌های نکروز شده (Necrotic) نیز به رنگ نارنجی در می‌آیند با این تفاوت که

ATP برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط Rapaport نشان داده شد و مطالعات مختلف بیشتر ثابت کرد که ATP سبب مهار همانند سازی DNA و رشد سلولی در رده‌های سلولی سرطان پانکراس، کلون، ملانوما، روده و سینه می‌شود (۱۳). همچنین مطالعات متعددی که بر روی مدل‌های حیوانی صورت گرفته است حاکی از اثر ضد توموری این مولکول در موجود زنده نیز می‌باشد. مطالعات بالینی بر روی انسان نیز نشان می‌دهد که ATP اثرات مؤثری در درمان برخی بیماری‌ها دارد در حالی که هیچ اثر جانبی از آن مشاهده نشده است (۱۲). اهمیت این مطالعه بر این واقعیت استوار است که علی‌رغم پیشرفت‌های درمانی، CML مطالعه‌ی چالش بزرگ محسوب می‌شود و جستجوی راهکارها و داروهای مختلف در این راستا از الوبیت‌های تحقیقاتی می‌باشد. لذا مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی ATP بر ردهی سلولی K562 به عنوان مدل انسانی CML با تمرکز بر اثرات آن روی بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرايشی آن به عنوان بازيگرهاي مهم در مقاومت دارويي به آپوپتوز پايه گذاري گردید. در واقع سلول K562 یک سلول بنیادي سرطانی است که مقاومت به آپوپتوز (IAPs) را نشان می‌دهد (۱۴).

روش بررسی

مواد: محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Biosera انگلستان تهیه شد. اسید بوریک، آدنوزین ۵-تری فسفات (ATP)، رنگ تریپان بلو (Trypan blue)، آکریدین اثیدیوم (Acridine orange (AO) و اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide (EtBr) از شرکت Sigma و فلاسک‌های کشت سلول SPL life science و ظروف ۹۶ و ۲۴ چاهکی استریل از شرکت SPL life science کره جنوبی خریداری شد. برای تست لاتکس از محصول شرکت Gravindex انگلستان استفاده شد. اتیلن دی آمین ترا استیک اسید(Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)، سدیم دودسیل سولفات (SDS))، تریس (Tris-HCl) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. RNX-Plus و آنتی بیوتیک‌های استرپتو مایسین و پنی سیلین از شرکت سیناژن (تهران-ایران) خریداری شدند. پرایمر dT Oligo

و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RT (Germany, Fermentase) به cDNA تبدیل شدند.

طراحی پرایمر: در این تحقیق، ژن $\beta2m$ به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد. پرایمرهای ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن بر روی اگزونهای جداگانه طراحی شده‌اند به گونه‌ای که محصول PCR ناشی از آلدگی با cDNA ژنومی به دلیل تفاوت در اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیر شده، از محصول اصلی RT-PCR قابل تمایز باشد. شماره دستیابی ژن‌های تحت مطالعه و واریانت‌های پیرایشی مختلف، توالی و جایگاه پرایمرها و طول محصولات PCR در جدول ۱ آورده شده است.

واکنش PCR Nested: واکنش PCR برای ژن Survivin در دو مرحله و با استفاده از پرایمرهای داخلی و خارجی صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده قادر به تکثیر چهار واریانت Survivin-3b، Survivin-2b، Survivin- Δ Ex3، Survivin-3b و Survivin-2b باز را برای واریانت‌های مذکور به وجود می‌آورند. قابل ذکر است که بیان کم Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در مرحله‌ی اول PCR قابل آشکارسازی نمی‌باشد.

واکنش Heminested-PCR: این واکنش با استفاده از پرایمر اختصاصی واریانت پیرایشی 3b و در دو مرحله جهت آشکارسازی بیان واریانت پیرایشی 3a، همچنین بررسی دقیق و اختصاصی بیان واریانت پیرایشی 3b انجام گرفت. پرایمرهای رفت به کار رفته همان پرایمرهای واکنش قبلی هستند، ولی پرایمر برگشت، اختصاصی واریانت‌های پیرایشی 3b و 3a بوده و این دو واریانت را به طور همزمان تکثیر می‌نماید.

در تمام نمونه‌ها، از ژن $\beta2m$ به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و واکنش PCR برای هر دو ژن $\beta2m$ و surviving در تیوب‌های جداگانه و در شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلدگی، یک تیوب نیز به عنوان کنترل منفی در هر واکنش به کار رفت که در آن به جای cDNA آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. بعد از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از تکثیر بهینه‌ی قطعه‌ی موردنظر، محصول PCR توسط

کروماتین آنها متراکم و قطعه قطعه نمی‌شود. برای انجام این آزمایش صد میکروگرم از هر دو AO و EtBr، بطور جداگانه در ۱ میلی لیتر PBS حل گردید. در هنگام آزمایش نسبت حجمی ۱:۱ از دو محلول تهیه شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون EtBr/AO (5×10^5 cell/ml) با ۱ میکرولیتر از محلول مخلوط و ده میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از تهیه اسمیر سلول‌ها با لام پوشانده و با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss-آلمان) مشاهده می‌شود.

آزمون قطعه قطعه شدن DNA: با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA وقوع آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک تحت تأثیر بافر لیز EDTA 10 mM, W/V, Tris-HCl 10 mM, (pH 7.4) کنندۀ [SDS 0.1] قرار گرفتند پس از سانتریفوژ DNA با استفاده از ترکیب فل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل جداسازی شد. DNA جدا سازی شده با اتانول مطلق و ۵ مولار به مدت یک شب رسوب داه شد. در نهایت رسوب DNA در بافر TE (Tris-HCl, EDTA 10 mM) حل شد و روی ژل آگاراز ۱/۵٪ با ولتاژ ۱۰ ولت بارگذاری (Load) شد.

استخراج RNA: سلول‌های گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف ATP پس از ۷۲ ساعت برداشت شده و مقداری یکسان از هر گروه سلول‌ها پس از شستشو جهت استخراج RNR مورد استفاده قرار گرفتند. Total RNA کل (RNA) با استفاده از محلول RNX-Plus و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن- ایران) استخراج شد. به دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلدگی با RNase، جهت غیرفعال سازی این DEPC(Di Ethyl Pyro Carbonate) با استفاده از محلول ۱٪ اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

تیمار با DNaseI و واکنش رونویسی معکوس Reverse (RT) Transcription: به منظور جلوگیری از آلدگی RNA با DNA، ابتدا مقداری یکسان از RNA اولیه (۱ میکروگرم) مربوط به هر گروه از سلول‌ها با آنزیم DNaseI تیمار

میکرومولا، رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۲۲٪، ۳۴٪، ۴۰٪، ۴۸٪ و ۶۰٪ مهار می‌شود (شکل ۱-الف).

داده‌های به دست آمده از آزمایش تریپان بلو (شکل ۱-ب) نشان می‌دهد که ATP علاوه بر مهار چشمگیر رشد سلولی، سبب القای مرگ در بین سلول‌های تحت تیمار ATP در هر دو ردهی سلولی می‌شود. همانطور که در شکل ۱-ب مشاهده می‌شود زیستایی سلول‌های K562 تحت اثر ATP در ۲۴ ساعت تغییر معناداری نشان نمی‌دهد. این در حالی است که در ۴۸ ساعت زیستایی شروع به کاهش می‌کند ولی در ۷۲ ساعت کاهش چشمگیری به صورت وابسته به غلظت مشاهده می‌شود. به عنوان نمونه میزان زیستایی سلول‌های تحت تیمار با ATP در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولا در ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۱۵٪، ۲۰٪، ۲۵٪ و ۴۰٪ در مقایسه با کنترل کاهش می‌یابد.

مطالعات اثرات ATP بر روی سلول‌های K562 با استفاده از رنگ تریپان بلو نشان دهنده آنست که ATP سبب مرگ سلولی می‌شود (شکل ۱-ب). برای مشخص شدن نوع مرگ سلولی و بررسی این موضوع که آیا ATP سبب القای مرگ به طریق آپوپتوز می‌شود یا خیر از میکروسکوپ فلوروست و تست قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. همان طور که در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود با استفاده از میکروسکوپ فلوروست مشخص شد که در میان سلول‌های تیمار شده با ATP پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌ایی با کروماتین سبز یا نارنجی درخشنان بسیار فشرده و یا قطعه قطعه دیده می‌شوند که نشان دهنده مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است. همچنین برای اثبات بیشتر موضوع از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل ۲-ب، eDNA سلول‌های تیمار شده با ATP به صورت لکه (Smear) بر روی ژل آگارز مشاهده می‌شود در حالی که این حالت در سلول‌های کنترل مشاهده نمی‌گردد. بنابراین این آزمون در کنار داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلوروست به طور کامل اثبات می‌کند که ATP از طریق آپوپتوز سبب القای مرگ در سلول‌های سرطانی K562 می‌شود.

الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید.

تعیین توالی: به منظور تعیین هویت قطعات حاصل از PCR باندهای مربوط به survivin و واریانت‌های پیرایشی sur-ΔEx3 sur-3α و sur-3b پس از استخراج از ژل، توسط شرکت (Netherlands) Microgene در سایت NCBI مقایسه گردید.

نیمه کمی کردن بیان ژن: برای کمی‌سازی بیان ژن، تصاویر مربوط به الکتروفورز ژل آگارز توسط نرم‌افزار Uvidoc مورد بررسی قرار گرفت و پس از تعیین حجم باندها، شاخص بیان ژن در هر نمونه (نسبت حجم باند مذکور به حجم باند β 2m) محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: مقایسه میزان رشد و زیستایی بین سه گروه از سلول‌های تحت تیمار ATP که هر گروه شامل ۵ غلظت متفاوت از ATP می‌شد با سه گروه از سلول‌های تیمار نشده صورت گرفت و از آزمون t-test برای یافتن اختلافات معنادار استفاده شد. در این آزمون داده‌هایی با $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. همچنین برای مقایسه بیان ژن‌ها از آزمون Mann-whitney استفاده شد و داده‌هایی با $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات غلظت‌های متفاوت ATP بر روی رشد سلول‌های K562 با فاصله‌های زمانی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۱-الف بیانگر مهار رشد سلول‌های K562 بعد از یک بار تیمار با ATP با غلظت‌های متفاوت ($1000 \mu\text{M}$ تا $50 \mu\text{M}$) برای زمان‌های مختلف می‌باشد. همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود اثرات مهار رشدی ATP بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شده و به صورت وابسته به زمان افزایش می‌یابد به طوری که در ۷۲ ساعت به بیشترین میزان خود می‌رسد. به عنوان مثال در غلظت $1000 \mu\text{M}$ و بعد از زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها به ترتیب به میزان ۳۳٪، ۵۳٪ و ۶۰٪ کاهش می‌یابد. این اثرات همچنین به صورت وابسته به غلظت می‌باشد به طوری که به عنوان نمونه بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ATP در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰

ضد آپوپتوزی 3b همگام با کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز در ۷۲ ساعت نیز گردید به طوریکه بیان واریانت پیرایشی 3b در سلولهای تیمار شده با ATP به طور کلی از بین رفت. همچنین الگوی بیان واریانت پیرایشی Δ Ex3 و ۳ α تغییر مشهودی نشان ندادند. ذکر این نکته ضروری است که واریانت پیرایشی 2b به دلیل بیان ضعیف نه در سلولهای کنترل و نه در سلولهای تیمار شده با ATP قابل تشخیص نمیباشد(شکل ۴).

به منظور بررسی اثرات ATP بر مقاومت دارویی بیان ژن Survivin و واریانتهای پیرایشی آن به عنوان تنظیم گرهای مهم در موقع پدیده‌ی آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی نیمه کمی ارتباط رخداد آپوپتوز با بیان ژن Survivin و واریانتهای پیرایشی آن (شکل ۳-الف و ۳-ب) در ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با ATP کاهش وابسته به غلظت بیان ژن Survivin در سلولهای تیمار شده نسبت به سلولهای کنترل را نشان داد. از طرفی ATP سبب کاهش بیان واریانت پیرایشی

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن $\beta2m$, survivin و واریانت‌های پیرایشی آن

$\beta2m$ (NM_00114048) size of product: 191 bp

HBF (Human $\beta2m$ Forward primer): 5'- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3' (94-114)

HBR (Human $\beta2m$ Reverse primer): 5'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3' (284-265)

Survivin (NM_001168) size of products; Survivin: 556 bp, Survivin- Δ Ex3: 438 bp, Survivin-2b: 625 bp

HFP (Human Survivin Forward Primer): 5'-TGG CAG CCC TTT CTC AAG-3' (149-166)

HRP (Human Survivin Reverse Primer): 5'-GAG AGA GAG AAG CAG CCA C-3' (782-762)

HFPN (Human Forward Primer Nested): 5'-ACC ACC GCA TCT CTA CAT TC- 3'(168-187)

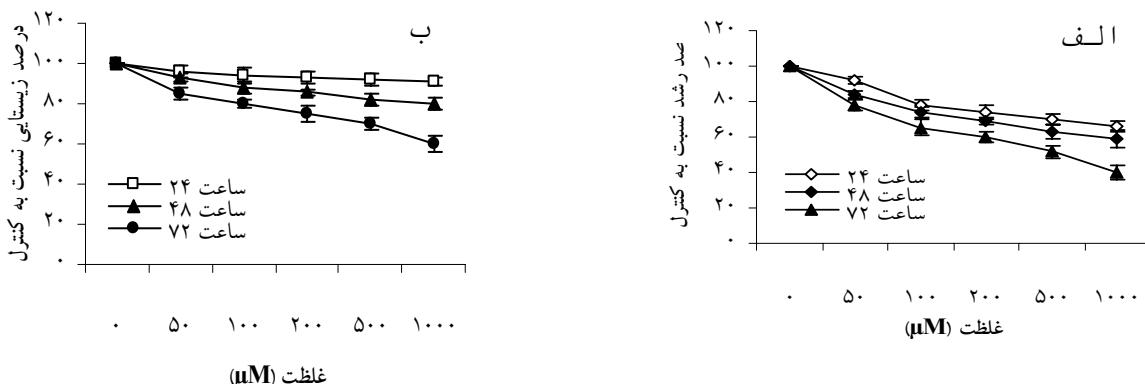
HRPN (Human Reverse Primer Nested): 5'- CTG GTG CCA CTT TCA AGA C -3'(723-705)

Survivin-3b (AB 154416) size of products; Survivin-3b: 420 bp, Survivin-3 α : 282 bp

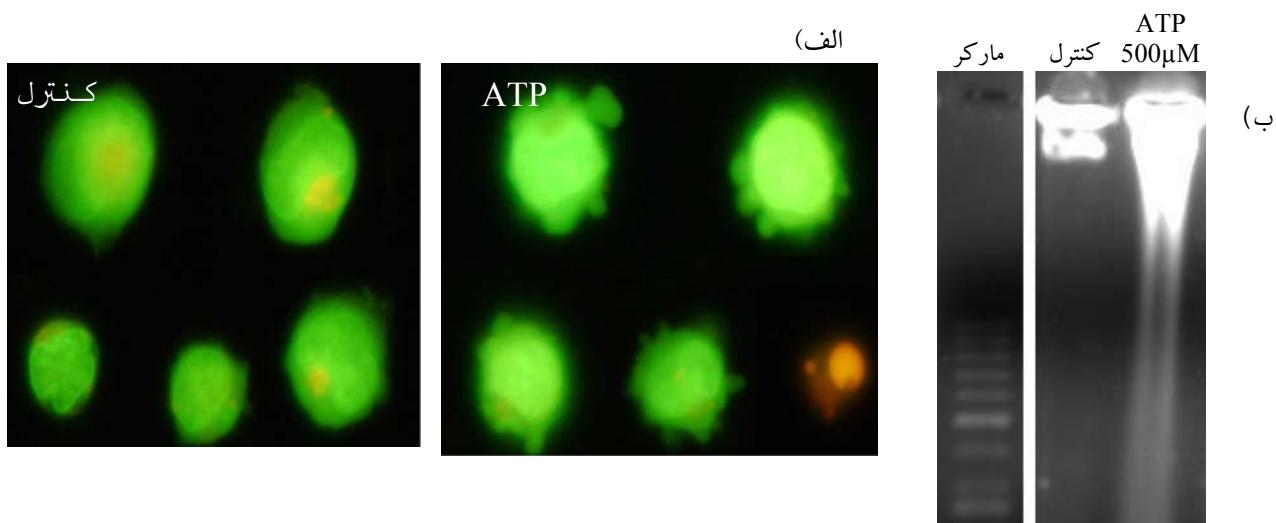
Forward primer: HFP

Nested forward primer: HFPN

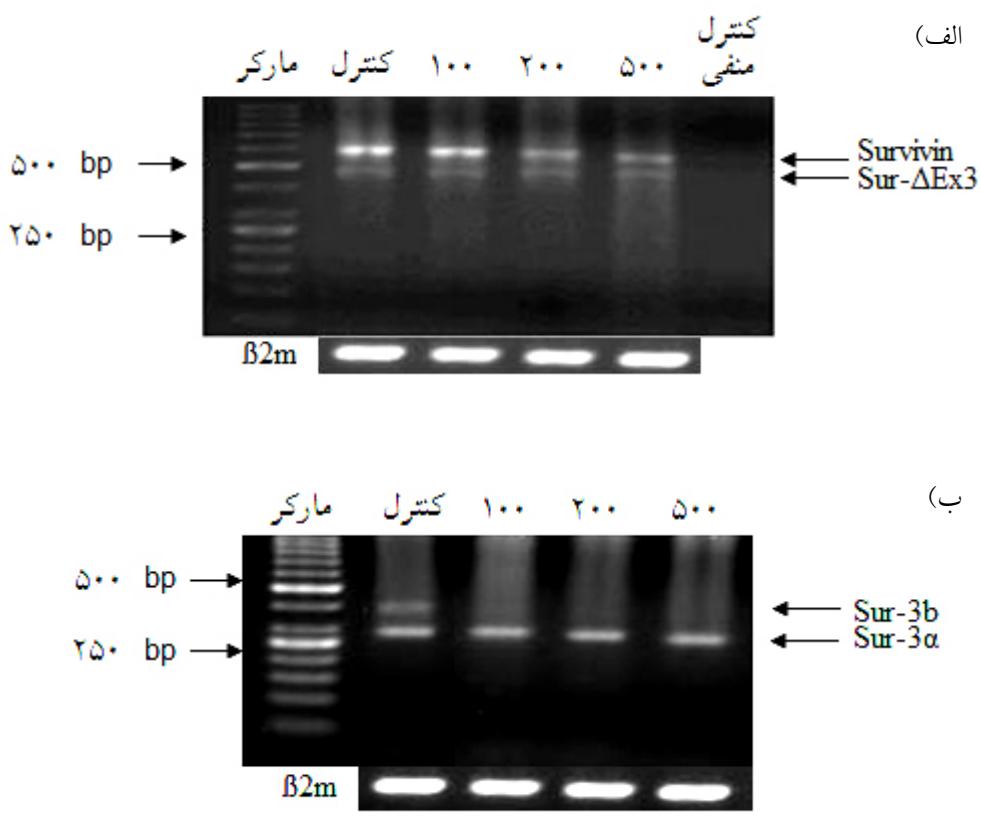
Reverse primer: 5'-ACA GAC CCT GGC AAA CAT C-3'(429-447)



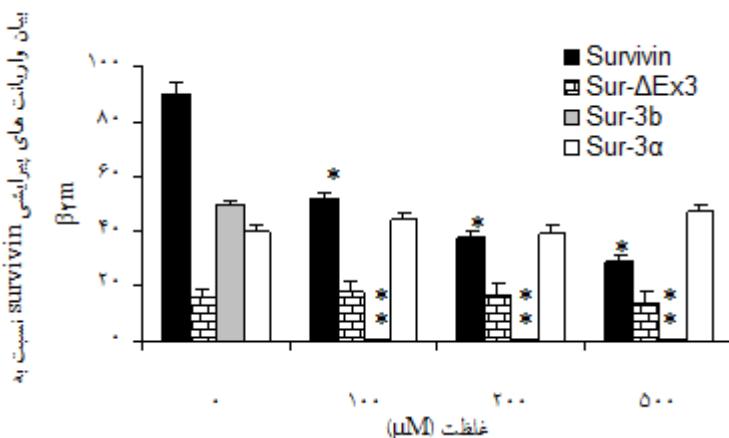
شکل ۱: اثرات ATP بر روی رشد و زیستایی سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ATP با فاصله‌های زمانی ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و مهار رشد (الف) و زیستایی (ب) سلول‌ها به ترتیب با استفاده از شمارش سلولی و آزمون دفع رنگ تریبان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل \pm خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. داده‌های نمایش داده شده در نمودار الف از نظر آماری معنادار ($P<0.05$) می‌باشند. در نمودار ب داده‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار ($P<0.05$) می‌باشند.



شکل ۲: مطالعه‌ی اثرات آپوتوزی ATP بر سلول‌های K562. (الف): بعد از تیمار سلول‌ها با ATP (غلظت ۵۰۰ میکرومولار) به مدت ۷۲ ساعت خصوصیات ظاهری آپوتوز با استفاده از میکروسکوپ فلوروستن مورد بررسی قرار گرفته است. وجود سلول‌های سبز و یا نارنجی با هسته‌ی متراکم نشان از وقوع آپوتوز می‌باشد. (ب): ژنومی DNA ژنومی سلول‌های کنترل و تیمار شده با ATP (۵۰۰ میکرو مولار) به مدت ۷۲ ساعت، استخراج شد و به کمک الکتروفورز میزان قطعه قطعه شدن DNA به عنوان شاخص آپوتوز بررسی گردید.



شکل ۳: بررسی بیان ژن survivin و واریانت‌های پیرایشی آن با استفاده از تکنیک RT-PCR. (الف): سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ATP مورد تیمار قرار گرفت و بیان واریانت‌های پیرایشی survivin sur-ΔEx3 و sur-2b پیرایشی RT-PCR با استفاده از نیمه کمی بررسی گردید. از β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. (ب): سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ATP مورد قرار گرفت و بیان واریانت‌های پیرایشی sur-3b و sur-3α پیرایشی بررسی شد.



شکل ۴: اندازه گیری بیان ژن survivin و واریانت های پیراishi آن با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی. سلول های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت های مختلف ATP مورد تیمار قرار گرفت و بیان واریانت های پیراishi survivin sur-3α و sur-ΔEx3 survivin sur-3b با استفاده از نرم افزار uvidoc از نظر آماری معنادار می باشد.

بحث

سرطان ریه به صورت وابسته به غلظت می شود. اگر چه غلظت بهینه ATP در این مطالعه ۳ میلی مولار و ۶ برابر غلظت بهینه نتایج ما گزارش شده است ولی آنها مشابه نتایج ما اشاره کرده اند که اثرات ATP در رده های سرطان ریه با مهار رشد، تغییر در شکل ظاهری این سلول ها و مرگ سلولی همراه می باشد(۱۵). اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ATP بر روی رده سلولی TE-13 سرطان معده و HT-1376 سرطان مثانه نیز مشاهده شده است به طوریکه ATP در غلظت های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار سبب مهار رشد و القای آپوپتوز می گردد(۱۶، ۱۷). به علاوه بررسی اثرات ATP بر روی رده سلولی HL-60 که مدلی برای لوسومی میلوبئید حاد محسوب می شود نیز یک بازه غلظتی مشابه نتایج ما را نشان داده است به طوری که ATP سبب سرکوب رشد این رده سلولی در غلظت ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار می شود. نکتهی جالب توجه در این مطالعه آنست که بر خلاف نتایج مطالعات ما علاوه بر اثرات مهار رشدی قادر به القاء تمایز در رده سلولی HL-60 نیز می باشد(۱۸). در واقع در نتایج مطالعات ما هیچگونه شاخصی مبنی بر القای تمایز در مطالعات ما بر سلولهای K562 مشاهده نگردید و به نظر می رسد اثرات ATP در این سلولهای لوسومی فقط از طریق مهار رشد و به دنبال آن مرگ سلولی می باشد. علاوه بر مطالعات صورت گرفته در

اگرچه تا کنون روش ها و داروهای متعددی برای درمان مبتلایان به سرطان خون به کار گرفته شده است اما با توجه به وجود مقاومت دارویی تلاش های گسترده ای در جهت یافتن ترکیبات مؤثرتری که پتانسیل تومور کشی بیشتری داشته باشند و قادر به غلبه بر مقاومت دارویی باشند در جریان است(۱۰). در مطالعهی حاضر نشان داده شد که ATP به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب مهار رشد تا ۶۰ درصد در سلول های K562 به عنوان مدلی برای فاز بلاست CML می شود، به طوریکه غلظت و زمان بهینه آن ۵۰۰ میکرومولار بعد از ۷۲ ساعت از تیمار می باشد. همچنین داده های به دست آمده از میکروسکوب فلوروستن و آزمون قطعه قطعه شدن DNA نشان داد که ATP سبب القای آپوپتوز در سلول های K562 می شود. از آنجایی که اختلال در فرایند آپوپتوز یکی از نقص های رایج در سلول های سرطانی می باشد، القای آپوپتوز می تواند به عنوان یکی از استراتژی های مورد توجه در درمان سرطان به شمار آید(۶). با توجه به این موضوع اثر آپوپتوزی ATP بر سلول های K562 حائز اهمیت است. چنین اثراتی از ATP در مورد سرطان های دیگر نیز مشاهده شده است. به عنوان مثال Agteresch و همکارانش نشان داده اند که ATP در غلظت های ۰/۵ تا ۳ میلی مولار سبب مهار رشدی تا ۶۵ درصد در چهار رده سلولی

آنٹی سننس با کاهش بیان این ژن می تواند مقاومت دارویی را از طریق کاهش بیان ژن Survivin و القای آپوپتوz از بین ببرد(۲۱). در بررسی صورت گرفته توسط Xiaofei K562 و همکارانش مشاهده شده است که آرسنیک تری اکسید که به طور معمول سبب القای آپوپتوz در غلظت‌های بالا می‌شود در سلول‌های Survivin در باعث القای آپوپتوz نمی‌شود بلکه با افزایش بیان Survivin در سلول‌های K562 همراه می‌گردد. بنابراین این اثر را به عنوان عامل اصلی مقاومت به آپوپتوz سلول‌های K562 در مقابل آرسنیک تری اکسید مطرح کرده‌اند(۲۲). با توجه به اینکه که در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شده که ATP قادر به کاهش بیان این ژن می‌باشد، لذا اهمیت این دارو از جنبه مقاومت دارویی نیز می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در واقع نکته‌ی جالب در مورد ATP این است که این دارو علاوه بر القای آپوپتوz از طریق کاهش بیان ژن‌های مقاومت به آپوپتوz از قبیل Survivin و واریانت پیرايشی ضد آپوپتوزی Sur-3b می‌تواند به عنوان دارویی با اثرات مفید دوگانه مطرح گردد که از یک طرف سبب مرگ و از طرف دیگر باعث جلوگیری از بروز مقاومت دارویی می‌شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی با توجه به فقدان اثرات جانبی خاص توسط ATP که در مطالعات انسانی صورت گرفته و همچنین رفتار مؤثر آن در القای آپوپتوz همگام با کاهش بیان IAP ها می‌توان این ترکیب را به عنوان داروی قوی و مؤثر در درمان CML معرفی نمود.

سپاسگزاری

حمایت مالی این کار از محل طرح پژوهشی و پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت گرفته و بدین وسیله نویسنده‌گان از جناب آقای دکتر رستمی، دکتر حقیقت و دیگر همکاران تشکر می‌نمایند.

سرطان‌های مختلف اخیراً اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ATP در سلول‌های طبیعی بنیادی خونی موش نیز گزارش گردیده که بازه‌ی غلظتی اثر آن در غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰ میلی مولار می‌باشد(۱۹). اما بالاترین اختلاف در زمینه‌ی غلظت بهینه اثرات ATP در مطالعات ما با رده‌ی سلولی Li-7A سرطان کبد می‌باشد که در آن در غلظت‌های غلظت بهینه ۵ میلی مولار برای اثرات ATP گزارش شده است که در ۱۰ برابر بیشتر از مطالعات ما بر سلولهای K562 می‌باشد(۲۰). به طور کلی از مقایسه نتایج مطالعات دیگران با نتایج این مقاله مشخص می‌گردد که غلظت‌های مورد استفاده و غلظت بهینه‌ی هر مطالعه با دیگری و با مطالعه‌ی حاضر متفاوت است که این تفاوتها تا حدی می‌تواند مربوط به اختلاف بین رده‌های سلولی و القای مرگ سلولی نقاط مشترک این مطالعات با نتایج ارایه شده در این مطالعه است. در بررسی مکانیسم اثرات ATP، ما برای اولین بار در مطالعه حاضر نشان دادیم که ATP سبب کاهش بیان ژن Survivin و Survivin و واریانت پیرايشی ضد آپوپتوزی sur-3b می‌شود. واریانت‌های ضد آپوپتوزی آن از جمله قوی ترین مهار کنندگان آپوپتوز به شمار می‌آیند و بیان بالای این ژن در سرطان‌های مختلف با کاهش طول عمر بیماران و مقاومت به درمان همراه است(۶). بنابراین به نظر میرسد کاهش بیان این ژن در ارتباط با مکانیسم اثرات آپوپتوزی ATP باشد. از طرف دیگر با توجه به نقش Survivin در مقاومت به آپوپتوز، کاهش بیان این ژن با استفاده از RNAهای کوچک مداخله گر (siRNA) به عنوان راهبردی نوین در کاهش مقاومت به آپوپتوز و درمان سرطان‌های مختلف مطرح است(۱۰). در این راستا اخیراً Yanq و همکارانش با مطالعه‌ی اثرات الیگونوکلئوتید آنتی‌سننس Survivin بر مقاومت دارویی سلول‌های K562، گزارش کرده‌اند که الیگونوکلئوتید

منابع:

- 1- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. Blood. 2000; 96(10): 3343-56.

- 2- O'Dwyer M. *Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias*. The Oncologist. 2002; 7(1): 34-8.
- 3- Quintas-Cardama A, Cortes JE. *Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment*. Mayo Clin Proc. 2006; 81(7): 973-88.
- 4- Drummond MW, Holyoake TL. *Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukaemia: so far so good*. Blood Rev. 2001; 15(2): 85-95.
- 5- Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. *Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies*. Leukemia. 2003; 17(7): 1211-62.
- 6- Li F. *Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis*. Br J Cancer 2005; 92(2): 212-6.
- 7- Altieri DC. *Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer*. Prog Cell Cycle Res. 2003; 5(1): 447-52.
- 8- Quhittit A, Matrouguni K, Bengrine A, Koochekpour S, Zerfqou M, Yousief Z. *Survivin is not only a death encounter but also a survival protein for invading tumor cells*. Front Biosci. 2007;12(1): 1260-70.
- 9- Contea E, Stagnob F, Guglielmob P, Scutoa A, Consoli C, M Angelo. *Survivin expression in chronic myeloid leukemia*. Cancer Letters. 2005; 225(1):105-10.
- 10- Schimmer AD. *Apoptosis in leukemia: From molecular pathways to targeted therapies*. Best Pract Res Clin Haematol. 2008; 21(1): 5-11.
- 11- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. *P2 receptors: intracellular signaling*. Pflugers Arch. 2006; 452(5): 552-62.
- 12- White N, Burnstock G. *P2 receptors and cancer*. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27(4): 211-7.
- 13- Rapaport E. *Treatment of Human Tumor Cells With ADP or ATP Yields Arrest of Growth in the S Phase of the Cell Cycle*. J Cell Physiol 1983; 114(3): 279-83.
- 14- Lozzio BB, Lozzio CB. *Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia*. Int J Cancer. 1977; 19(1): 136-7.
- 15- Agteresch HJ, Rooijen MH, Berg JW, Minderman-Voortman GJ, Wilson JHP, Dagnelie PC. *Growth inhibition of lung cancer cells by adenosine 5'-triphosphate*. Drug Develop Res. 2003; 60(3):196–203.
- 16- Wang MX, Ren LM, Shan BE. *Inhibitory effects of extracellular adenosine triphosphate on growth of esophageal carcinoma cells*. World J Gastroenterol. 2005; 11(38):5915-9.
- 17- Shabbir M, Ryten M, Thompson C, Mikhailidis D, Burnstock G. *Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer*. BJU International. 2007, 101(1): 106–12.
- 18- Yoon MJ, Lee HJ, Kim JH, Kim DK. *Extracellular atp induces apoptotic signaling in human monocyte leukemic cells, HL-60 and F-36P*. Arch Pharm Res. 2006; 29(11): 1032-41.

- 19- Yoon MJ, Lee HJ, Lee YS, Kim JH, Park JK, Chang WK, et al. *Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells.* Biol Pharm Bull. 2007; 30(4): 671-6.
- 20- Wen LT, Knowles AF. *Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor.* Br J Pharmacol. 2003; 140(6): 1009-18.
- 21- Yang S, Xu YH, Wen XH, Chen L, Li X. *Effects of survivin antisense oligodeoxynucleotide on drug resistance in K562 cells.* Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2008; 39(6):905-8.
- 22- Wu X, Chen Z, Liu Z, Zhou H, You Y, Li W, et al. *Arsenic trioxide inhibits proliferation in K562 cells by changing cell cycle and survivin expression.* J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2004; 24(4): 342-4.