تاثیر تیموکینون بر بقای سلول‌های سرطانی خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

مریم محمدلو [۱و۲](M.Sc)، مارال همتی [۱و۲](M.Sc)، مریم عبداللهی [۱و۲](M.Sc)، مهرنوش پاشایی [۴](Ph.D)، فرحناز قهرمانفرد [۱](M.D)، پرویز کوخایی [۳و۵*](Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- بیوکلینیکوم، دپارتمان پاتولوژی وانکولوژی، بیمارستان و دانشگاه کارولینسکا، استکهلم، سوئد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۳۹۰۶۸۶ p_kokha@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

چکیده

هدف: اخیراً در درمان لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) که به عنوان یک اختلال لنفوپرولیفراتیو با گسترش سلول‌های B CD5+CD23+ مونوکلونال بالغ در خون محیطی، بافت‌های لنفاوی ثانویه و مغز استخوان مشخص می‌شود، استراتژی‌های درمانی جدید که مسیرهای بیولوژیکی حیاتی را هدف قرار می‌دهند به روی کار آمده‌اند. تیموکینون نوعی ماده فعال زیستی اصلی موجود در روغن سیاه دانه است که دارای اثرات ضدتوموری است و این اثرات را عمدتاً با القای آپوپتوز در سلول‌های توموری اعمال می‌کند. این مطالعه به بررسی تاثیرات ضد توموری تیموکینون بر سلول‌های سرطانی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن در شرایط آزمایشگاهی پرداخته است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) ۶ بیمار مبتلا CLL و ۶ فرد سالم با ۱/۵ µg/mL تیموکینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. میزان سیتوتوکسیسیتی و آپوپتوز سلول‌ها به روش MTT و فلوسایتومتری، مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان سیتوکسیسیتی در سلول‌های PBMCs بیماران مبتلا به CLL متعاقب تیمار با تیموکینون در مقایسه با سلول‌های تیمارنشده این بیماران، به طور معناداری افزایش یافت (P=۰/۰۲۱). نتایج فلوسایتومتری نشان داد که تیموکینون به‌صورت معناداری موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های PBMCs بیماران مبتلا به CLL در مقایسه با افراد سالم شد (P=۰/۰۰۱). علاوه بر این، تیموکینون به طور قابل ملاحظه‌ای میزان آپوپتوز سلول‌های تیمار شده را در گروه CLL در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده افزایش داد (P=۰/۰۰۶).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که تیموکینون دارای پتانسیل درمانی امیدوارکننده‌ای به‌عنوان یک عامل ضد توموری در درمان لوسمی لنفوسیتی مزمن مطرح است و این اثر را عمدتاً از طریق القای مرگ سلولی اعمال می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوسیتی مزمن، تیموکینون، آپوپتوز، گلبول‌های سفید تک هسته‌ای

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic lymphocytic leukemia-CLL) با تکثیر و تجمع لنفوسیت‌های B- $CD19^{+}CD5^{+}$ در خون محیطی، مغز استخوان و ارگان‌های لنفاوی ثانویه مشخص می‌شود [۲،۱]. این بیماری شایع‌ترین لوسمی جوامع غربی است و در کشورهای آسیایی کم‌ترین میزان شیوع را دارد، همچنین در ایران شیوع CLL بین ۱۵ – ۱۱درصد از انواع مختلف لوسمی می‌باشد [۳]. خطر ابتلا به بیماری CLL در مردان ۲ برابر بیش‌تر از زنان می‌باشد و سن متوسط تشخیص این بیماری در حدود ۷۰-۷۲ سالگی می‌باشد [۴]. لوسمی لنفوسیتی مزمن معمولاً به آرامی رشد می‌کند و سال‌ها بدون علامت باقی می‌ماند. به طور کلی به دو فرم تهاجمی و غیرتهاجمی بروز می‌کند که در حالت غیر تهاجمی تا چندین سال نیاز به درمان ندارند ولی در حالت تهاجمی نیاز به درمان سریع دارند، به علاوه CLL غیر تهاجمی می‌تواند به فرم تهاجمی پیشرفت کند [۵]. ترکیب

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی [۶] با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا استفاده از مولکول‌های کوچک جدید (مانند ایبروتینیب، ایدلالیسیب و ونتوکلاکس) درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به CLL است [۷–۹]. با این وجود، بیماران دچار مقاومت دارویی می‌شوند و بعد از چند مرحله درمان با عوامل دارویی به آن‌ها مقاوم می‌شوند و در نتیجه پاسخ دارویی مورد نظر حاصل نمی‌گردد. بنابراین، تحقیقات برای یافتن عوامل دارویی جدید همچنان ادامه دارد. در سال‌های اخیر نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که مواد طبیعی گیاهان نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان دارند، که دارای عوارض جانبی کم‌تری هستند [۱۱،۱۰]. این ترکیبات می‌توانند بیان ژن را با مکانیسم‌های مولکولی اپی‌ژنتیک تحت تاثیر قرار دهند [۱۲]. تقریباً ۳۸ درصد از داروهای ضد سرطانی که در ۴۰ سال گذشته تأیید شده‌اند، یک ماده طبیعی یا از مشتقات آن بوده‌اند [۱۳]. گیاه سیاه دانه با نام علمی .Nigella sativa L از خانواده Ranunculaceae است [۱۴]. اثرات فارماکولوژیک سیاه دانه شامل اثرات ضد التهابی و آنتی کسیدانی [۱۵] و همچنین اثرات ضد میکروبی [۱۶] و ضد انگلی [۱۷] از این گیاه گزارش شده است. همچنین مطالعات گسترده‌ای در زمینه خواص ضد سرطانی سیاه دانه و ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون بر روی سرطان‌های مختلف از جمله کولون [۱۸]، سینه [۱۹]، سارکوما [۲۰]، معده [۲۱] صورت گرفته است. ماده تیموکینون یک اثر بازدارنده انتخابی بر رشد سلول‌های سرطانی دارد و با چندین فرآیند سرطان‌زایی مانند رگ‌زایی، مهاجرت سلولی و تهاجم از طریق تعدیل مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی سلول‌های سرطانی، از جمله استیلاسیون و متیلاسیون DNA یا دمتیلاسیون یا استیلاسیون هیستون‌ها، تداخل می‌کند [۲۲–۲۴]. با این حال، فعالیت‌های ضد لوسمی تیموکینون و اثر آن بر آپوپتوز سلول‌های CLL هنوز به طور کامل بررسی نشده است. در این مطالعه، توانایی تاثیر تیموکینون را بر روی بقای سلول‌های لوسمی لنفوسیتی مزمن در محیط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب و گروه‌بندی بیماران CLL و افراد سالم. شش بیمار مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن تازه تشخیص داده شده و ۶ فرد سالم بر اساس معیارهای کارگروه بین‌المللی لوسمی لنفوسیتی مزمن (IWCLL) [۲۵] از بیمارستان‌های کوثر و رسول اکرم (ص) انتخاب شدند. حدود ۱۰ میلی‌لیتر خون کامل محیطی از همه شرکت‌کنندگان در یک لوله استریل حاوی ضد انعقاد هپارین، پس از کسب رضایت آگاهانه کتبی جمع‌آوری شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران (نیماد) با شناسه اخلاق IR.NIMAD.REC.1397.389 ق ل ۵۵ تایید شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) و کشت سلولی. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از نمونه‌های خون محیطی توسط گرادیان چگالی فایکول(Amersham Pharmacia Biotech، سوئد) جدا شدند. به طور خلاصه، نمونه‌های خون محیطی رقیق‌شده با بافر فسفات (PBS) بر روی فایکول اضافه شدند. سپس لوله‌های حاوی محلول فایکول و خون به مدت ۲۵ دقیقه، با دور g ×۴۰۰ و با دمای ۲۰–۲۲ درجه سانتی‌گراد با کم‌ترین میزان شتاب و ترمز سانتریفیوژ شدند. سپس در محیط کشت RPMI-1640 (DNAbiotech، ایران) همراه با ۱۰درصد AB سرم انسانی و ۱درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۸درصد رطوبت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه سلول‌های تک هسته‌ای جداشده در ۳ گروه مختلف کشت داده شدند. گروه اول تحت عنوان vehicle که سلول‌ها توسط حلال داروی مورد نظر، DMSO کشت داده شد، گروه دیگر تحت عنوان Treat توسط داروی تیموکینون با غلظت بهینه ۱/۵ µg/mL تیمار شدند و گروه سوم بدون هیچ گونه تیماری تحت عنوان گروه کنترل (Untreat) کشت داده شدند.

بررسی میزان بقای سلول‌های تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی تیموکینون بر سلول‌های تک‌هسته‌ای، از تست MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrasolium bromide] استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا، $۱/۵\times۱۰^{۵}$ سلول تک‌هسته‌ای بیماران CLL و افراد سالم در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و میزان ۱/۵ µg/mL تیموکینون (GLPBIO، آمریکا) به چاهک‌ها افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، پلیت سلولی در به مدت ۵ دقیقه با دور g × ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. در ادامه ۱۵۰ میکرولیتر حلال (دی متیل سولفوکسید) به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax 4300 Microplate) قرائت شد.

بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. بررسی میزان آپوپتوز القا شده

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

توسط تیموکینون با استفاده از تکنیک Annexin V متصل شده به رنگ FITC و 7-AAD انجام شد. ابتدا تعداد 10^5 سلول در هر ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها از چاهک‌ها جمع‌آوری و با بافر اتصال‌دهنده (Calcium-binding buffer) شست‌وشو داده شدند. در ادامه میزان ۵ میکرولیتر از ترکیب Annexin V-FITC و 7-AAD (Biolegend, USA) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. میزان آپوپتوز سلول‌ها پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در تاریک و دمای اتاق با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (Partec, Münster, Germany) قرائت و با استفاده از نرم‌افزار فلوجو نسخه ۷ (FLOWJO LLC، آمریکا) آنالیز شد.

آنالیز آماری. تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم نسخه ۸ (GraphPad Prism) انجام شد. برای بررسی نحوه توزیع متغیرهای عددی پیوسته از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. به منظور مقایسه اثرات داروی تیموکینون بین دو گروه بیماران مبتلا به CLL و افراد سالم از تست Unpaired t test و برای مقایسه بین سه گروه treat، Untreat و DMSO از تست ANOVA استفاده شد.

نتایج

ویژگی‌های بالینی بیماران CLL و افراد سالم. در این مطالعه ۶ فرد مبتلا به CLL درمان نشده با میانگین سنی ۵۸/۹±۶۷/۷۷ سال و ۶ فرد سالم با میانگین سنی ۵۲/۴±۱۷/۴۹ سال شرکت کردند. مشخصات دموگرافیک بیماران و افراد سالم شامل اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی در جدول ۱ خلاصه شده است.

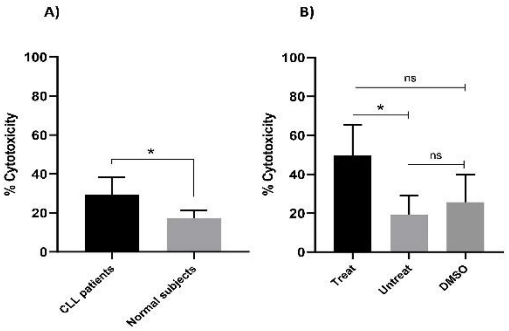
جدول ۱- اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی بیماران مبتلا به CLL و افراد سالم شرکت کننده در مطالعه

	جنسیت	سن	تعداد گلبول سفید/میکرولیتر	مرحله بیماری (Rai Stage)
بیماران مبتلا به CLL	زن	۶۴	۱۲۰×۱۰^۳	I
	مرد	۴۷	۱۸×۱۰^۳	0
	زن	۵۰	۵۴×۱۰^۳	II
	زن	۵۵	۱۱۲×۱۰^۳	IV
	زن	۷۳	۳۱×۱۰^۳	0
	مرد	۶۳	۴۶×۱۰^۳	I
افراد سالم	مرد	۵۷	۵×۱۰^۳	-
	مرد	۵۳	$۷,۳\times۱۰^۳$	-
	زن	۵۶	۱۰×۱۰^۳	-
	مرد	۴۹	$۴/۳\times۱۰^۳$	-
	زن	۴۵	$۹/۱\times۱۰^۳$	-
	زن	۵۳	$۵/۶\times۱۰^۳$	-

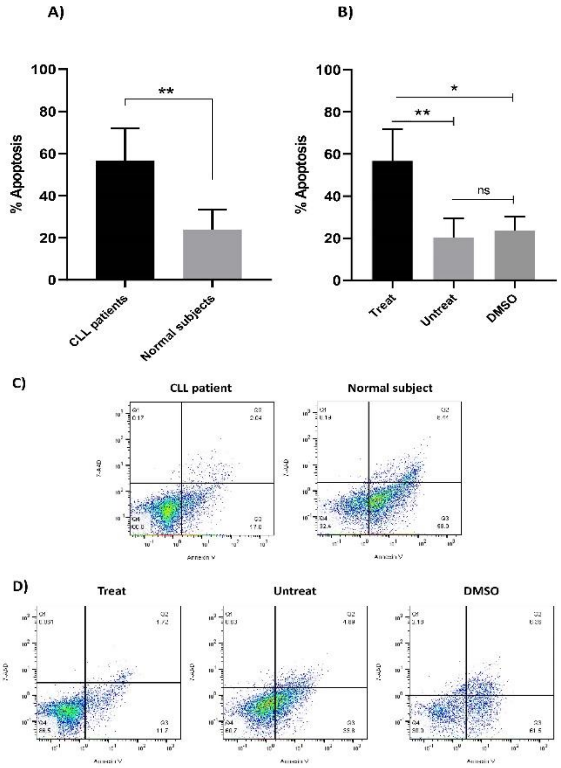
اثرسایتوتوکسیسیتی تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. اثر سایتوتوکسیسیتی تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به CLL با روش MTT در ۲۴ ساعت ارزیابی شد (شکل ۱). میزان سایتوتوکسیسیتی تیموکینون بر سلول‌های تک هسته‌ای بیماران CLL در مقایسه با سلول‌های افراد سالم در مجاورت با تیموکینون (۱/۵µg/mL) به مدت ۲۴ ساعت، به صورت معناداری افزایش داشته است (P=۰/۰۱۳). هم‌چنین تیموکینون دارای سایتوتوکسیسیتی بالایی در سلول‌های CLL در گروه سلول‌های تیمار شده با تیموکینون (Treat) در مقایسه با گروه تیمار نشده (Untreat) بوده است (P=۰/۰۲۱) در حالی‌که میزان سایتوتوکسیسیتی تیموکینون در سلول‌های گروه DMSO(حلال دارو) در مقایسه با گروه تیمار شده با تیموکینون و گروه تیمار نشده تفاوت معناداری نداشت (به ترتیب P=۰/۰۷۸ و P=۰/۱۳۱)

اثر تیموکینون بر آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به CLL. میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران CLL در مقایسه با افراد سالم پس از ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌ها با تیموکینون (µg/mL ۱/۵) با استفاده از کیت آپوپتوز مورد سنجش قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ (A و B) آمده است، میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران CLL در مقایسه با گروه افراد سالم به صورت معناداری افزایش نشان می‌دهد (P=۰/۰۰۱) هم‌چنین تیموکینون موجب افزایش معنادار میزان آپوپتوز سلول‌های CLL در گروه تیمار شده با تیموکینون در مقایسه با گروه تیمار نشده با تیموکینون (Untreat) شده است (P=۰/۰۰۶). میزان آپوپتوز سلول‌ها در گروه تیمار شده با تیموکینون در مقایسه با گروه DMSO نیز افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۱۹)؛ در حالی‌که بین گروه Untreat و DMSO تفاوتی مشاهده نشد (P=۰/۷۱۱). قسمت‌های C و D شکل ۲ نشان‌دهنده نتایج فلوسایتومتری می‌باشد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل ۱. بررسی اثر تیموکینون بر بقای PBMC بیماران CLL و افراد سالم. (A بررسی سایتوتوکسیسیتی تیموکینون بر PBMC افراد سالم مجاورشده با تیموکینون نسبت به سلول های PBMC بیماران CLL مجاور شده با تیموکینون اثر معنی داری را نشان داد. (B بررسی اثر تیموکینون در مقایسه با سلول های تیمار نشده (Untreatو همچنین سلول های مجاور شده با حلال دارو (DMSO در PBMC بیماران CLL. نتایج نشانگر سایتوتوکسیسیتی بالای تیموکینون سلول های مجاور شده با تیموکینون نسبت به سلول های گروه Untreat نشان داد. در حالیکه خاصیت سایتوتوکسیسیتی تیموکینون در سلول های گروه DMSO (حلال دارو) در مقایسه با گروه Treat و Untreat تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



شکل ۲. بررسی اثر تیموکینون بر میزان آپوپتوزPBMC بیماران CLL و افراد سالم. (Aبررسی اثر تیموکینون بر میزان آپوپتوز در PBMC افراد سالم مجاور شده با تیموکینون نسبت به سلول های PBMC بیماران CLL مجاور شده با تیموکینون اثر معنی داری را نشان داد. (B بررسی اثر تیموکینون بر میزان آپوپتوز سلول های PBMC بیماران CLL و مقایسه آن با سلول های مجاور نشده (Untreat و سلول های مجاور شده با حلال دارو .(DMSO) تیموکینون باعث افزایش آپوپتوز در سلول های PBMC نسبت به سلول های مجاور نشده گردید، همچنین اختلاف میزان آپوپتوز در اثر مجاورت با تیموکینون نسبت به گروه DMSO قابل توجه و معنادار بوده است. (Cشکل حاکی از تجزیه تحلیل فلوسایتومتری ازاثر تیموکینون بر میزان آپوپتوزPBMC افراد سالم. (Dشکل حاکی از تجزیه تحلیل فلوسایتومتری از اثر تیموکینون بر میزان آپوپتوز PBMC بیماران CLL.

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه در سال‌های اخیر با ظهور روش‌های درمان انتخابی، درمان افراد مبتلا به بیماری لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) دچار تحول عظیمی شده است، اما بسیاری از بیماران دچار عود مجدد شده و برخی از آن‌ها قادر به تحمل عوارض جانبی حاصل از داروها نیستند [۲۶]. با توجه به این موضوع، یافتن راهی جدید برای درمان موثر این افراد همچنان متصور است.

یکی از نگرانی‌های اصلی شیمی‌درمانی سرطان، عوارض جانبی ناشی از هدف قرار دادن غیر اختصاصی سلول‌های طبیعی و سرطانی توسط داروهای درمانی است. تاکید زیادی بر کشف ترکیبات جدیدی شده است که سلول‌های تومور را به طور موثرتر و انتخابی با حداقل اثرات سمی روی سلول‌های طبیعی هدف قرار می‌دهد. بنابراین، امروزه محققان مطالعات ضد سرطانی را بر روی عصاره‌های گیاهی و همچنین ترکیبات طبیعی بر اساس خواص بیوشیمیایی آپوپتوز انجام داده‌اند [۲۷]. درمان‌های سنتی به‌خصوص با فرآورده‌های طبیعی مشتق شده از گیاهان از زمان‌های قدیم به‌منظور پیشگیری و درمان انواع بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در مطالعات اخیر استفاده از داروهای گیاهی و مشتقات آن‌ها در درمان سرطان‌ها مورد توجه واقع شده است. از جمله داروهای گیاهی که خاصیت ضد سرطان دارد، داروی تیموکینونین می‌باشد [۲۹،۲۸]. تیموکینون ماده فعال زیستی اصلی موجود در روغن سیاه دانه (Nigella sativa) است و اثربخشی آن در برابر سرطان مورد آزمایش قرار گرفته شده است. بسیاری از محققان مکانیسم اثر تیموکینون و استعداد آن برای القای آپوپتوز و مهار رشد تومور را مورد مطالعه قرار داده‌اند. تا به امروز، پتانسیل شیمی‌درمانی تیموکینون در بالین مورد آزمایش قرار گرفته نشده است. با این حال، مطالعات متعدد اثرات ضد سرطانی امیدوارکننده آن را در مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند [۳۱،۳۰]. مطالعات بالینی مختلف در مدل‌های موشی مانند سرطان سینه، سرطان کبد و سرطان پانکراس، اثر ضد سرطانی تیموکینون را به واسطه کاهش تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی، به تعویق انداختن متاستاز این سلول‌ها و ممانعت از فرایند رگ‌زایی تاکید می‌کنند [۲۳] مطالعه حاضر، در نوع خود اولین مطالعه‌ی این دارو بر روی سلول‌های Primary بیماران مبتلا به CLL بوده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که مجاور کردن PBMC سلول‌های بیماران مبتلا به CLL با داروی تیموکینون با دوز ۱/۵ میکرومولار با زمان ۲۴ ساعت منجر به کاهش معنادار میزان بقا در این سلول‌ها می‌شود. همچنین نتایج به دست آمده

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

از مطالعه ما در مورد سلول‌های افراد نرمال بر روی PBMC افراد سالم بیانگر این مسئله است که تیموکینون بر روی سلول‌های نرمال اثر کشندگی خاصی نداشته است و برای این سلول‌ها سمی نیست. نتایج به دست آمده از کار ما با نتایج حاصل از کارLanda Zeenelabdin Ali Salim و همکارانش که با هدف بررسی اثرات ضد لوسمی در شرایط in vitro و in vivo تیموکینون بر سلول‌های WEHI-3 انجام شده بود در یک راستا بوده و این دارو سمیت بالایی در برابر رده سلولی WEHI-3 نشان داد که با افزایش آپوپتوز اولیه تایید شد [۳۲].

پس از بررسی تاثیر سایتوتوکسیسیتی داروی تیموکینون بر روی PBMC افراد مبتلا به CLL با استفاده از روش MTT برای بررسی نوع اثر مهاری که داروی تیموکینون می‌تواند بر روی این سلول‌ها داشته باشد، به بررسی تاثیر این دارو بر روی میزان آپوپتوز تیموکینون بر روی PBMC این بیماران پرداخته شد. آپوپتوز یکی از اشکال مرگ سلولی فیزیولوژیکی یا فعال یا یک مسیر کلیدی برای تنظیم هموستاز و مورفوژنز سلول‌های پستانداران است و با چندین بیماری به ویژه سرطان مرتبط است [۳۳]. آپوپتوز، فروپاشی هماهنگ یک سلول را توصیف می‌کند که مشخصه آن حفره حفره شدن غشاء، انقباض سلولی، متراکم شدن کروماتین و تکه‌تکه شدن DNA و به دنبال آن بلعیده شدن سریع این اجسام اپوپتوتیک توسط سلول‌های فاگوسیت حرفه‌ای است. آپوپتوز به طور گسترده‌ای به عنوان محافظت ذاتی بافت در برابر عوامل سرطان‌زا با مهار بقا و کنترل رشد جمعیت‌های سلولی پیش سرطانی و تومورها در مراحل مختلف سرطان‌زایی شناخته می‌شود [۲۷]. با تأمل در این دانش، مکانیسم عمل بسیاری از عوامل ضد سرطانی که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند، به طور خاص برای تنظیم مسیر آپوپتوز مورد هدف قرار گرفته است و بر نقش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در حفظ هموستاز طبیعی تأکید می‌کند.

در مطالعه حاضر خاصیت ضد آپوپتوزی تیموکینون را بر جمعیت سلول‌های PBMC با استفاده از Annexin V مورد سنجش قرار گرفت. نشان داده شد که Annexin V به شدت و به طور خاص با فسفاتیدیل سرین تعامل دارد و می‌تواند برای تشخیص آپوپتوز با هدف قرار دادن از دست دادن عدم تقارن غشای پلاسمایی استفاده شود [۳۴]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که درمان با تیموکینون قادر به القای مرگ سلولی از طریق آپوپتوز در سلول‌های PBMC بیماران مبتلا به CLL است. نتایج به دست آمده از کار ما با نتایج حاصل از کار Musalli و همکارانش در یک راستا می‌باشد که در سال ۲۰۱۹ تاثیر داروی تیموکینون را بر مهار تکثیر سلولی و القا آپوپتوز در سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد مورد بررسی قرار دادند، نتایج این مطالعه نشان داد که تیموکینون باعث مهار تکثیر سلولی و آپوپتوز در سلول‌های لوسمی میلوئید حاد می‌شود [۳۵]. در امتداد مطالعاتی که در حیطه‌ی تاثیرات ضدسرطانی تیموکینون انجام شده است، مطالعه‌ی دیگری پتانسیل ضد توموری تیموکینون و مکانیسم‌های عمل آن را در سلول‌های A549 (رده سلولی سرطان ریه انسان) مورد ارزیابی قرار داد. نتایج حاصل از آن نشان داد که تیموکینون به طور قابل توجهی منجر به کاهش بقا و افزایش آپوپتوز در سلول‌های توموری ریه انسان می‌شود و هم‌چنین منجر به افزایش بیان پروتئین تنظیمی آپوپتوز یعنی P53 می‌شود، هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد که درمان با تیموکینون به طور قابل توجهی نسبت Bax/Bcl-2 را در سلول‌های سرطانی ریه افزایش داده است هم‌چنین آپوپتوز وابسته به کاسپاز را با فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹- فعال کرده است [۳۶]. با توجه به یافته‌های مطالعات هم‌راستا با مطالعه ما در سلول‌های سرطانی دیگر و یافته‌های مطالعه حال حاضر که نشان‌دهنده‌ی تاثیر تیموکینون بر کاهش بقا و افزایش آپوپتوز سلول‌های PBMC بیماران مبتلا به CLL است، پیشنهاد می‌شود مکانیسم‌های اثر داروی تیموکینون بر آپوپتوز سلول‌های PBMC در ارتباط با تنظیم کاهنده بیان BCL2 با توجه به این موضوع که سلول‌های CLL دارای بیان افزایشی پروتئین آنتی‌آپوپتوزی BCL2 نسبت به سلول‌های نرمال می‌باشند، تنظیم افزاینده بیان Bax و یا تحریک فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ در مطالعات آینده مورد مطالعه قرار بگیرد، بنابراین برای بررسی دقیق مکانیسم اثر این دارو در درمان بیماران CLL نیاز به گسترش مطالعات In vitro و In vivo در این حیطه همواره احساس می‌شود. از مهم‌ترین محدودیت‌های این طرح پژوهشی کم بودن تعداد نمونه‌های دسترس بیماران مبتلا به CLL بود، در پژوهش‌های آینده جامعه آماری بیش‌تر اطلاعات دقیق‌تر از مکانیسم عمل این دارو را برای ما فراهم خواهد آورد.

با توجه به نتایج حاضر داروی تیموکینون باعث کاهش میزان بقاء و افزایش آپوپتوز سلول‌های CLL شده بدون این‌که تاثیر مخرب محسوسی بر روی سلول‌های PBMC افراد سالم بگذارد. این مطالعه یک تلاش موفقیت‌آمیز برای ارزیابی اثر ترکیبات گیاهی بر CLL به عنوان گزینه‌ای برای ترکیب با درمان‌های رایج است. تحقیقات بیش‌تری برای درک بهتر تاثیر تیموکینون در یک محیط بالینی مورد نیاز است. امید است این دارو به عنوان یک گزینه درمانی در بیماری CLL در نظر گرفته شود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

تشکر و قدردانی

تحقیق گزارش شده در این نشریه توسط کمیته گرنت پژوهشگر فرهیخته با شماره ۹۷۷۴۶۲ از موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران (نیماد) به شناسه IR.NIMAD.REC.1397.389 تصویب و پشتیبانی شد.

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: پرویز کوخایی، مهرنوش پاشایی و مریم محمدلو: ایده و طراحی مطالعه، فرحناز قهرمانفرد، مریم محمدلو و مریم عبداللهی: جمع‌آوری نمونه‌ها و داده‌ها، مارال همتی: آنالیز و تفسیر نتایج، مریم محمدلو و مارال همتی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. Biochim Biophys Acta 2016; 1863: 401-413. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.009 PMid:26193078 PMCid:PMC4715999

[2] Kokhaei P. B-cell chronic lymphocyte leukemia (B-CLL). Koomesh 1386; 9: 1-12. (Persian).

[3] Koohi F, Salehiniya H, Shamlou R, Eslami S, Ghojogh ZM, Kor Y, Rafiemanesh H. Leukemia in Iran: Epidemiology and morphology trends. Asian Pacific J Cancer Prev 2015; 16: 7759-7763. https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7759 PMid:26625794

[4] Pulte D, Redaniel MT, Bird J, Jeffreys M. Survival for patients with chronic leukemias in the US and Britain: age-related disparities and changes in the early 21st century. Eur J Haematol 2015; 94: 540-545. https://doi.org/10.1111/ejh.12468 PMid:25315799

[5] Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, Balatti V, Pearl DK, Acunzo M, et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011; 118: 3072-3079. https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333484 PMid:21636858 PMCid:PMC3175784

[6] Sadeghnejad A, Hemati M, Pashaei M, Rasouli Nejad Z, Ghahremanfard F, Kokhaei P. Effect of IL-27 on activity of bone marrow NK cells of patient with B-chronic lymphocytic leukemia in vitro. Koomesh 1399; 23: 131-138. (Persian) https://doi.org/10.29252/koomesh.23.1.131

[7] Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. N E J Med 2014; 370: 1101-1110. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313984 PMid:24401022

[8] Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink A, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. The Lancet 2010; 376: 1164-1174. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61381-5 PMid:20888994

[10] Taylor WF, Jabbarzadeh E. The use of natural products to target cancer stem cells. Am J Cancer Res 2017; 7: 1588-1605.

[9] Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. Blood Cancer J 2018; 8: 93. https://doi.org/10.1038/s41408-018-0131-2 PMid:30283014 PMCid:PMC6170426

[11] Sauter ER. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. Exp Rev Clin Pharmacol 2020; 13: 265-285. https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218 PMid:32154753

[12] Ratovitski EA. Anticancer natural compounds as epigenetic modulators of gene expression. Curr Genom 2017; 18: 175-205. https://doi.org/10.2174/1389202917666160803165229 PMid:28367075 PMCid:PMC5345332

[13] Fatfat Z, Fatfat M, Gali-Muhtasib H. Therapeutic potential of thymoquinone in combination therapy against cancer and cancer stem cells. World J Clin Oncol 2021; 12: 522-543. https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i7.522 PMid:34367926 PMCid:PMC8317652

[14] Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Rehman MU, Qamar W, et al. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. Saudi Pharmace J 2019; 27: 1113-1126. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.008 PMid:31885471 PMCid:PMC6921197

[15] Amizadeh S, Rashtchizadeh N, Khabbazi A, Ghorbanihaghjo A, Ebrahimi AA, Vatankhah AM, et al. Effect of Nigella sativa oil extracts on inflammatory and oxidative stress markers in Behcet's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Avicenna J Phytomed 2020; 10: 181.

[16] Nawarathne NW, Wijesekera K, Wijayaratne WM, Napagoda M. Development of novel topical cosmeceutical formulations from Nigella sativa L. with antimicrobial activity against acne-causing microorganisms. Scientific World J 2019; 2019. https://doi.org/10.1155/2019/5985207 PMid:31485198 PMCid:PMC6710770

[17] Hamada F, Abdel-Aziz H, Badr F, Moustafa A, Rashad A. The mutagenic effect of praziquantel in S. mansoni-infected mice. Arab J Lab 1992; 18: 301-311.

[18] Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (Nigella sativa L.) seeds against rat colon carcinogenesis. Nutr Cancer 2003; 45: 195-202. https://doi.org/10.1207/S15327914NC4502_09 PMid:12881014

[19] Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KH. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR-γ pathway. Biochem Pharmacol 2011; 82: 464-475. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.030 PMid:21679698

[20] Awad E. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by Nigella sativa oil. Phytomedicine 2005; 12: 100-107. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.003 PMid:15693715

[21] Bargi R, Hosseini M, Asgharzadeh F, Khazaei M, Shafei MN, Beheshti F. Protection against blood-brain barrier permeability as a possible mechanism for protective effects of thymoquinone against sickness behaviors induced by lipopolysaccharide in rats. Jundishapur J Nat Pharmac Prod 2021; 16. (Persian) https://doi.org/10.5812/jjnpp.67765

[22] Khan MA, Tania M, Wei C, Mei Z, Fu S, Cheng J, et al. Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. Oncotarget 2015; 6: 19580. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3973 PMid:26023736 PMCid:PMC4637306

[23] Khan MA, Tania M, Fu S, Fu J. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. Oncotarget 2017; 8: 51907.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

https://doi.org/10.18632/oncotarget.17206
PMid:28881699 PMCid:PMC5584300
[24] Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, et al. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF-κB pathway. Oncol Rep 2013; 29: 571-578.
https://doi.org/10.3892/or.2012.2165
PMid:23232982
[25] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood 2008; 111: 5446-5456.
https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906
PMid:18216293 PMCid:PMC2972576
[26] Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. Blood 2015; 125: 2062-2067.
https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603670
PMid:25573991 PMCid:PMC4467871
[27] Edris AE. Anti-cancer properties of Nigella spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. Curr Clin Pharmacol 2009; 4: 43-46.
https://doi.org/10.2174/157488409787236137
PMid:19149500
[28] Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. Chem Rev 2009; 109: 3012-3043.
https://doi.org/10.1021/cr900019j
PMid:19422222
[29] Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. Blood 2015; 125: 2062-2067.
https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603670
PMid:25573991 PMCid:PMC4467871
[30] Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, et al. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. Mol Cancer Ther 2008; 7: 1789-96.
https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0124
PMid:18644991 PMCid:PMC2587125
[31] Al-Johar D, Shinwari N, Arif J, Al-Sanea N, Jabbar AA, El-Sayed R, et al. Role of Nigella sativa and a number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats. Phytother Res 2008; 22: 1311-1323.
https://doi.org/10.1002/ptr.2487
PMid:18570215
[32] Salim LZ, Othman R, Abdulla MA, Al-Jashamy K, Ali HM, Hassandarvish Pet al. Thymoquinone inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and in vitro. PloS One 2014; 9: e115340.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115340
PMid:25531768 PMCid:PMC4274020
[33] Goldsworthy TL, Conolly RB, Fransson-Steen R. Apoptosis and cancer risk assessment. Mutat Res 1996; 365: 71-90.
https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90013-5
PMid:8898990
[34] Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. Exp Cell Res 2000; 256: 12-18.
https://doi.org/10.1006/excr.2000.4834
PMid:10739646
[35] Musalli MG, Hassan MA, Sheikh RA, Kalantan AA, Halwani MA, Zeyadi M, et al. Thymoquinone induces cell proliferation inhibition and apoptosis in acute myeloid leukemia cells: Role of apoptosis-related WT1 and BCL2 genes. Eur J Cell Sci 2019; 1: 2-9.
https://doi.org/10.34154/2019-EJCS-0101-02-09/euraass
[36] Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. J Cell Physiol 2019; 234: 10421-10431.
https://doi.org/10.1002/jcp.27710
PMid:30387147

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

The effect of Thymoquinone on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) viability of patients with B-Chronic Lymphocytic Leukemia

Maryam Mohammadlou (M.Sc)[1,2], Maral Hemati (M.Sc)[1,2], Maryam Abdollahi (M.Sc)[1,2], Mehrnoosh Pashaei (Ph.D)[4], Farahnaz Ghahremanfard (M.D)[1], Parviz Kokhaei (Ph.D)[*3,5]

1- Cancer Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2 - Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
3- Dept. of Immunology, School of Medicine, Arak, University of Medical Science, Arak, Iran
4- Dept. of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- BioClinicum, Department of Oncology-Pathology Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden

* Corresponding author. +98 9127390686 p_kokha@yahoo.com
Received: 30 Aug 2022; Accepted: 14 Mar 2023

Introduction*:* Chronic lymphocytic leukemia (CLL) as a lymphoproliferative disorder that is characterized by the expansion of monoclonal, mature CD5+CD23+ B cells in the peripheral blood, secondary lymphoid tissues, and bone marrow is facing with advent of new therapies targeting crucial biological pathways. Thymoquinone (TQ) is the major bioactive constituent in black seed oil (Nigella sativa) and has been found to exert anti-tumor impacts mainly through the induction of apoptosis. This study aimed to evaluate the in vitro anti-leukemia effects of TQ on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of CLL patients.

Materials and Methods*:* Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 6 patients and 6 healthy donors were treated with 15 µg/ml of TQ for 24 h. The cytotoxic effect of TQ was assessed using the MTT assay. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis of PBMCs.

Results: Treatment with TQ increased the cytotoxicity of PBMCs of CLL patients more significantly than in Untreated cells (P=0.021). Flow cytometry results indicated that TQ exhibited a significant apoptotic impact on PBMCs of CLL patients compared to the healthy subjects (P=0.001). TQ also induced marked apoptosis in CLL cells compared to the Untreated cells (P=0.006).

Conclusion: Our findings reveal that TQ possesses promising therapeutic potential as an anti-tumor agent for treating CLL mainly through the induction of cell apoptosis and cytotoxicity.

Keywords*:* Chronic Lymphocytic Leukemia, Thymoquinone, Apoptosis, Mononuclear Leukocytes

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]