

Original Article

The Effect of Iron on Malignant Lymphoblastic Cells Survival and Its Mechanism

Marjan Abedi¹ , Soheila Rahgozar^{1*} , Abolghasem Esmacili¹ 

¹Department of Biological Sciences and Microbiology, School of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

***Corresponding Author:**

Soheila Rahgozar;
Department of Biological Sciences and Microbiology, School of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Email:
rahgozar@sci.ui.ac.ir,
soheila.rahgozar@gmail.com

Received: 4 Nov, 2019

Accepted: 6 Jan, 2020

Abstract

Background and Objectives: Anemia is a common complication of chemotherapy. In order to resolve this problem, multiple red blood cell transfusions are administered, leading to iron overload. Given the confirmation of positive correlation between the increased bone marrow iron stores and adverse response to the treatment in the previous study, the effect of iron on the proliferation of acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell lines and its underlying mechanism were investigated in the current study.

Methods: Nalm6 and CCRF-CEM cell lines were selected as representatives of B-ALL and T-ALL Immunophenotypes and were treated with different concentrations of holo-transferrin (1 - 120 μ M) and ferric ammonium citrate (FAC) (400 - 25000 μ M). The cellular iron uptake was confirmed by AAS test. The cell proliferation and levels of intracellular free radicals (ROS), were evaluated by MTT and flow cytometry, respectively. Statistical analysis was performed using GraphPad prism software by one-way ANOVA test.

Results: The effect of holo-transferrin on cell proliferation was not significant. However, FAC enhanced the proliferation rate of both ALL cell lines over 50%. Evidence showed that iron induced intracellular ROS, so that FAC in the concentration of 400 μ M may induce the intracellular ROS over 50% (55.27 $\pm$ 6.36% vs. 100%, $p < 0.001$).

Conclusion: Iron can support these cancerous cells by inducing ROS and augmenting leukemic cell proliferation. Therefore, the present study suggests that the volume of the injected blood in ALL patients should be minimized to prevent iron overload.

Keywords: Iron; acute Lymphoblastic leukemia; Treatment outcome; Reactive oxygen species (ROS).

DOI: 10.29252/qums.13.11.73

نقش آهن بر بقا و تکثیر سلول های بدخیم لنفوبلاستیک و مکانیسم آن

مرجان عابدی^۱، سهیلا رهگذر^{۱*}، ابوالقاسم اسماعیلی^۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوارض رایج شیمی درمانی کم خونی است که به منظور رفع این مشکل، تزریق گلبول های قرمز به دفعات زیاد، در حین درمان، انجام شده و این مسئله باعث ایجاد گران باری آهن می شود. با توجه به تأیید ارتباط افزایش ذخایر آهن در مغز استخوان و پاسخ نامطلوب به درمان در مطالعه قبلی، در پژوهش حاضر تأثیر آهن بر تکثیر رده های سلولی لنفوبلاستیک حاد (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) و مکانیسم آن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: رده های سلولی Nalm6 و CCRF-CEM به ترتیب به عنوان نماینده ایمنوفنوتیپ های B-ALL و T-ALL انتخاب شده و با غلظت های مختلف هولوترنسفرین (۱-۱۲۰ میکرومولار) و فریک آمونیوم سترات (۲۵۰۰-۴۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. ورود آهن به داخل سلول با آزمون AAS (Atomic Absorption Spectroscopy) تأیید شد. تکثیر سلولی و سطح رادیکال های آزاد داخل سلولی (ROS: Reactive Oxygen Species) به ترتیب با استفاده از دو روش MTT و فلوسیتومتری ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل های آماری با نرم افزار GraphPad Prism و به کارگیری آزمون یک طرفه ANOVA انجام شد.

یافته ها: هولوترنسفرین تأثیر قابل ملاحظه ای بر تکثیر سلولی نداشت. با این حال فریک آمونیوم سترات (FAC) میزان تکثیر هردو رده ی سلولی ALL را تا بیش از ۵۰ درصد افزایش داد. شواهد نشان داد آهن سبب القای ROS داخل سلولی می شود؛ به طوری که FAC (ferric ammonium citrate) در غلظت ۴۰۰ میکرومولار سبب القای بیش از ۵۰ درصدی میزان ROS شد ($155 \pm 27/36$ درصد در مقابل ۱۰۰ درصد، $P < 0/001$).

نتیجه گیری: آهن می تواند از طریق القای ROS و تقویت تکثیر سلول های لوسمیک، حامی این سلول های سرطانی باشد؛ بنابراین پژوهش حاضر، پیشنهاد می دهد که بایستی حجم خون تزریقی در مبتلایان به ALL به حداقل ممکن کاهش یابد تا از گران باری آهن جلوگیری شود.

کلید واژه ها: آهن؛ بازده درمان؛ سرطان خون لنفوبلاستی حاد؛ گونه های فعال اکسیژن.

^۱ گروه زیست شناسی سلولی- مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

سهیلا رهگذر؛ گروه زیست شناسی سلولی- مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

soheila.rahgozar@gmail.com
rahgozar@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Abedi M, Rahgozar S, Esmaili A. The Effect of Iron on Malignant Lymphoblastic Cells Survival and Its Mechanism. Qom Univ Med Sci J 2020;13(11):73-83. [Full Text in Persian]

مقدمه

طبق آمار منتشرشده رایج‌ترین سرطان در بین کودکان ایرانی، سرطان خون می‌باشد (۱).

۸۰ درصد سرطان‌های خون کودکان از نوع لنفوبلاستی حاد (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) است (۲). به‌رغم ارتقای تحسین‌برانگیز نرخ درمان، متأسفانه نرخ بقای کلی در افرادی که عود بیماری را تجربه می‌کنند ۲۵ الی ۴۰ درصد است (۳). از سوی دیگر شیمی‌درمانی به‌دلیل توقف اریتروپویز، سبب کم‌خونی می‌شود (۵،۴). این عارضه‌ی رایج، ۹۷ درصد از کودکان مبتلا به ALL را درگیر می‌کند (۶). به‌منظور کاهش شدت این مشکل و یا رفع آن، بیماران در چندین نوبت گلبول‌های قرمز خون دریافت می‌کنند. برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که درمان قوی، نیاز به تزریق خون را افزایش داده و در نتیجه سبب افزایش ذخایر آهن می‌شود (۷،۴). همچنین بیان شده است که این دریافت خون منجر به گران‌باری آهن می‌شود (۵). طبق تحقیق اخیر گروه حاضر، که بر روی کودکان مبتلا به ALL مراجعه‌کننده به بیمارستان سیدالشهدای اصفهان صورت گرفته است، مشخص شد که در بیش از بیست درصد از مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستی حاد، در طی سال اول درمان به‌تدریج ذخایر آهن در مغز استخوان افزایش می‌یابد (۸).

افزون بر این، دریافتیم که افزایش ذخایر آهن مغز استخوان (BMIS: Bone Marrow Iron Store)، در مبتلایان به ALL محدود به تزریق خون نبوده و در بیمارانی که دفعات کمتری تزریق خون دریافت کرده بودند نیز، افزایش BMIS مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل افزایش نیاز متابولیکی سلول‌های سرطانی به آهن و جذب بیشتر آن نسبت به سلول‌های طبیعی باشد. علاوه‌براین، ارتباطی معنادار و مثبت بین ذخایر آهن مغز استخوان و پاسخ به درمان مشاهده شد؛ به‌طوری که میزان کم ذخایر آهن در مغز استخوان کودکان مبتلا به ALL با افزایش بقا، همبستگی مثبت داشت (۸). درنتیجه این فرضیه مطرح شد که آهن این توانایی را دارد که به‌عنوان شمشیر دولبه عمل نماید و ممکن است بر بقای سلول‌های لوسمیک و مقاومت آن‌ها به درمان نقش داشته باشد و گران‌باری آهن را بتوان به‌عنوان فاکتور خطر عود بیماری به‌شمار آورد.

در تلاش برای روشن‌شدن نقش این عنصر کوچک اما حیاتی در بقای سلول‌های لنفوئیدی لوسمیک، ابتدا تأثیر آهن بر تکثیر رده‌های سلولی لوسمیک ارزیابی شد، سپس مکانیسم آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

کشت سلولی

دو رده‌ی سلولی CCRF-CEM (به‌شماره شناسه C105) و Nalm6 (به‌شماره شناسه C212) به‌ترتیب به‌عنوان نماینده T-ALL و B-ALL از موسسه پاستور خریداری شدند. محیط کشت هر دو رده‌ی سلولی RPMI1640 محتوی ۱۰ درصد FBS (Fasting Blood Sugar) بود که به‌صورت دوره‌ای مابین پاساژهای مختلف ۰/۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین به محیط کشت افزوده شد. لازم به ذکر است در ۴۸ ساعت قبل از تیمارها و طی دوره‌های تیمار، جهت جلوگیری از هرگونه تداخل در پاسخ سلولی، از محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک استفاده گردید.

تیمار با آهن

جهت بررسی تأثیر آهن بر سلول‌ها، تیمارهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعتی با هولوترنسفرین (Sigma; Darmstadt, Germany) و یا فریک آمونیوم سترات (FAC, Merck; Burlington, MA) انجام شد. هولوترنسفرین در محدوده غلظت ۱۰-۱۲۰ میکرومولار و فریک آمونیوم سترات در محدوده غلظت ۲۵۰۰-۴۰۰ میکرومولار مورد بررسی قرار گرفتند. FAC به‌صورت ویال ذخیره ۱۰۰ میلی‌مولاری در آب مقطر استریل تهیه و سپس غلظت‌های مورد نظر از آن، در محیط کشت کامل تهیه شد. برای هر دو رده، $10^4 \times 15$ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد و حجم نهایی محیط کشت حاوی آهن ۱۵۰ میکرولیتر بود. پس از گذشت زمان انکوباسیون، آزمون سنجش زنده‌مانی سلولی با استفاده از ترکیب MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) صورت گرفت.

بررسی ورود آهن به داخل سلول‌ها

سلول‌ها با غلظت‌های ۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرومولاری از FAC در پلیت‌های ۶ خانه ($10^5 \times 10$ سلول در دو میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها جمع‌آوری و بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۷۰۰ دور بر دقیقه (rpm) رسوب‌های حاصل به‌منظور حذف کامل آهن در بافر PBS محلول شده و مجدداً با همان شرایط سانتریفیوژ گردیدند. بعد از شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار، جهت بررسی کمی میزان آهن داخل سلولی، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اسید نیتریک ۶۵ درصد در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از لیز شدن کامل سلول‌ها (تهیه محیط شفاف) میزان آهن به روش اسپکتروفوتومتری جذب اتمی (AAS) اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا با استفاده از غلظت‌های فزاینده‌ی فریک آمونیوم سترات و خوانش جذب هر غلظت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری مدل AA-6200 (Japan, Shimadzu Scientific Instruments, Inc) منحنی استاندارد رسم گردید. سپس با قراردادن عدد جذب هر نمونه به جای y در معادله‌ی خطی نمودار استاندارد، غلظت آهن موجود در هر نمونه (مقدار x حاصل) مشخص شد.

سنجش زنده‌مانی و تکثیر با استفاده از MTT

این روش به‌طور متداول جهت سنجش تکثیر سلولی استفاده شده است (۹-۱۱). جهت آماده‌سازی محلول

MTT (Atocel, Austria) ۵۰ میلی‌گرم پودر MTT در تاریکی در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۲۲ میکرونی محلول به واحدهای یکسان تقسیم‌بندی شده (الیکوت) و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گشت. جهت سنجش زنده‌مانی ۱۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، محتوی تیمار مورد نظر، اضافه شد. پس از انکوبه کردن پلیت‌ها به مدت ۲/۵ ساعت، در انکوباتور، جهت حل کردن بلورهای حاصل، ۵۰ میکرولیتر از محتوای هر چاهک حذف شده و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شده و با پیچینگ آرام، بلورها حل شدند. سپس در طول موج ۴۹۲ نانومتر (۱۳،۱۲) خوانش جذب به‌وسیله دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness Technology, Inc, PA) STAT FAX 2000 صورت گرفت.

سنجش میزان ROS داخل سلولی

به‌منظور سنجش میزان گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلولی از رنگ دی‌کلرو فلورسین دی‌استات (DCFH-DA, Sigma, Germany) استفاده شد. این ماده یک پروپ غیرفلورسنت است که قابلیت ورود به سلول را دارد. این ترکیب در داخل سلول استریفیه شده و به محض اکسیداسیون تبدیل به ترکیب بسیار فلورسنت دی‌کلرو فلورسین می‌گردد. جهت سنجش گونه‌های فعال اکسیژن با استفاده از این رنگ ابتدا ویال ذخیره محلول DCFH-DA با حل کردن ۴/۸ میلی‌گرم از پودر DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) در شرایط تاریکی در ۱ میلی‌لیتر DMSO تهیه و سپس در ویال‌های استریل ۰/۲ میلی‌لیتری به‌صورت واحدهای ۵۰ میکرولیتری تقسیم شده و دور از نور در فریزر ۲۰- ذخیره شد. برای انجام آزمایش غلظت ۴۰ میکرومولاری از محلول در محیط کشت RPMI به‌صورت تازه در تاریکی تهیه گردید. برای تیمار سلول‌ها با DCFH-DA ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۴۰ میکرومولاری از این رنگ در پلیت ۲۴ خانه کاشته شده و پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. سپس محتویات هر چاهک به خوبی پیپت و به آن ۵۰۰ میکرولیتر PBS خنک اضافه شد. در مرحله بعد کل محتویات چاهک به لوله فلوسایتمتری منتقل و شدت فلورسنس فوراً با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری Partec CyFlow ML در کانال FL1 اندازه‌گیری گردید. در هر بار خوانش یک چاهک به سلول‌های فاقد DCFH-DA و یک چاهک به ترکیبات بدون سلول اختصاص داده شد که به‌عنوان کنترل، مورد استفاده قرار گرفتند. از سلول‌های بدون رنگ جهت مشخص کردن محدوده صحیح (گیت) سلول‌ها استفاده گردید. پس از خوانش، داده‌ها به فرمت FCS ذخیره شده و با استفاده از نرم‌افزار دستگاه (Flow Max)، شدت فلورسنس مشخص و به‌صورت درصد نسبت به کنترل محاسبه گشت. در این آزمایشات از H_2O_2 و ان-استیل سیستین، به‌ترتیب، به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. به‌منظور مشاهده همزمان پیک فلورسنت نمونه‌های مختلف در یک نمودار و رسم هیستوگرام‌ها از نرم‌افزار Flow Jo نسخه ۱۰،۶،۷ استفاده شد تا مشاهده شیف‌ت فلورسنس در مقایسه نمونه‌های کنترل و تیمار به‌صورت بصری امکان‌پذیر گردد.

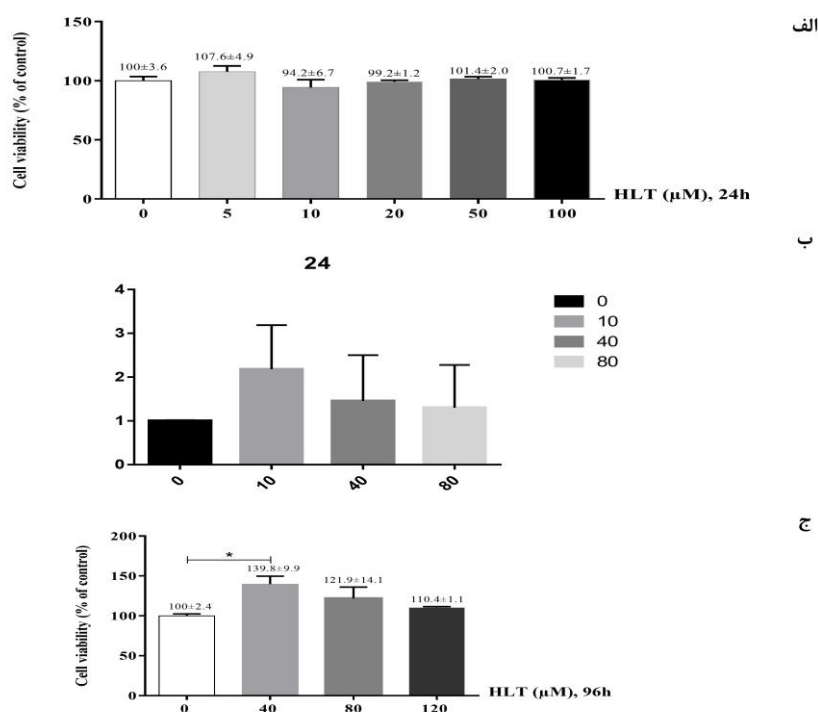
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری نتایج تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۷ صورت گرفت. از آزمون یک‌طرفه‌ی ANOVA برای ارزیابی وجود ارتباط و میزان معناداری داده‌های به‌دست‌آمده در گروه‌های مورد بررسی استفاده شد. در پژوهش حاضر، همه داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند. هر آزمایش حداقل سه بار با پاساژهای سلولی مختلف انجام شده و در هر آزمون نمونه‌ها به‌صورت سه بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنادار آماری در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

بررسی تأثیر هولوترنسفرین بر تکثیر سلولی

در ابتدا جهت بررسی تأثیر آهن بر بقای سلول‌های لوسمیک سلول‌های رده CCRF-CEM در فواصل زمانی مشخص با هولوترنسفرین تیمار شدند. همان‌طور که در نمودارهای شکل ۱ مشهود است تیمار کوتاه‌مدت سلول‌ها با هولوترنسفرین (۲۴-۷۲ ساعت) تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر تکثیر سلولی نداشت و از نظر آماری معنادار نبود؛ اما در تیمار ۹۶ ساعته، غلظت ۴۰ میکرومولار هولوترنسفرین به‌طور معنادار ($P < 0.05$) بر تکثیر سلولی تأثیر مثبت داشت.

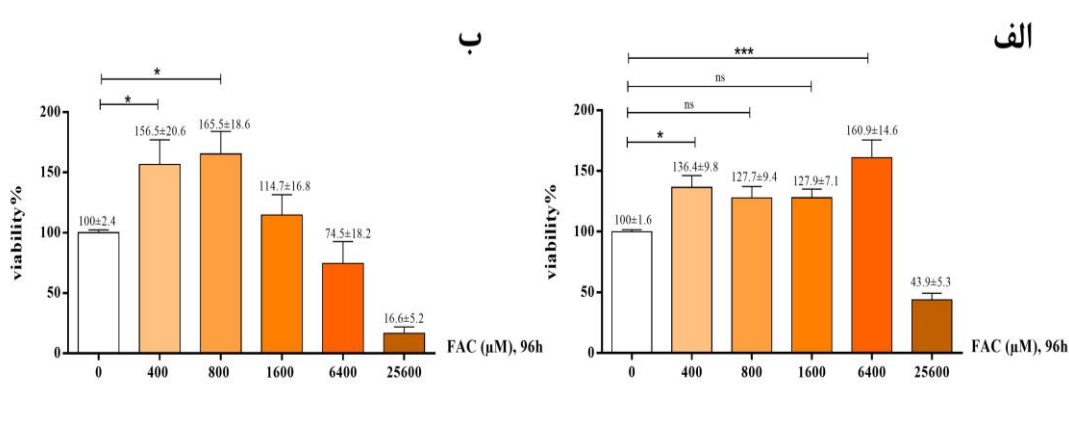


شکل شماره ۱: تأثیر هولوترنسفرین بر تکثیر (زنده‌مانی) رده‌ی سلولی CCRF-CEM. الف) تیمار ۲۴ ساعته، ب) تیمار ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار هولوترنسفرین. ج) تیمار ۹۶ ساعته در غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار هولوترنسفرین. زنده‌مانی با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شده است. تنها غلظت ۴۰ میکرومولاری هولوترنسفرین در تیمار ۹۶ ساعته از نظر آماری معنادار بود. مقادیر به‌صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند ($P < 0.05 = *$).

انتقال آهن به‌صورت مستقل از ترنسفرین استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، هنگامی که هر دو رده سلولی CCRF-CEM و Nalm6 به‌مدت ۹۶ ساعت با FAC تیمار شدند به‌طور قابل‌ملاحظه و وابسته به دوز تکثیر سلولی افزایش یافت.

بررسی تأثیر نمک آهن (فریک آمونیوم سترات) بر تکثیر سلولی

با توجه به آن که هولوترنسفرین تأثیر چشمگیری بر تکثیر سلولی نداشت، به‌منظور بررسی نقش آهن بر بقای سلول‌های لوسمیک از نمک فریک آمونیوم سترات (FAC) به‌عنوان بازیگر اصلی در

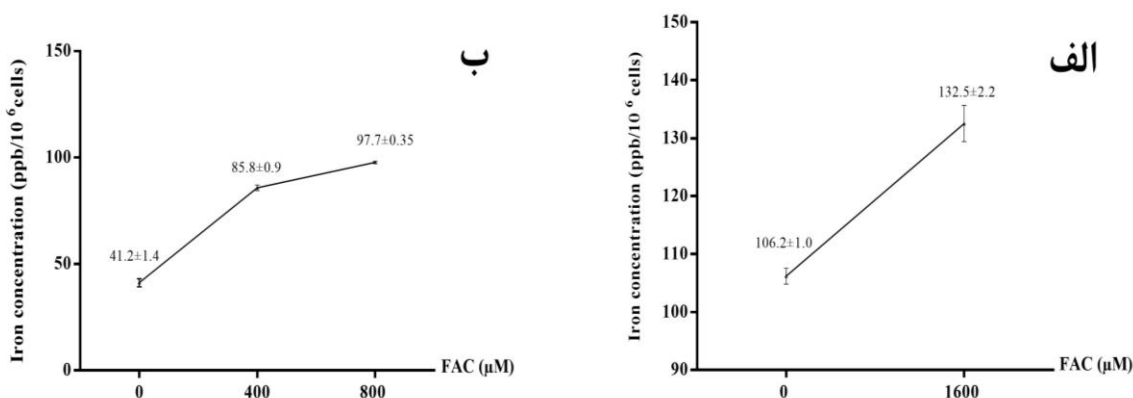


شکل شماره ۲: تیمار سلول‌ها با FAC به مدت ۹۶ ساعت به طور قابل توجهی تکثیر سلولی را تقویت کرد. الف) رده سلولی CCRF-CEM و ب) رده سلولی Nalm6 به مدت ۹۶ ساعت با غلظت‌های افزایش یافته FAC تیمار گردیدند. سنجش زنده‌مانی با استفاده از آزمون MTT به روشی وابسته به غلظت نشان‌دهنده افزایش زنده‌مانی و یا به تعبیری تکثیر سلولی در حضور FAC می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در غلظت‌های بالا، FAC اثری معکوس بر تکثیر و بقای سلولی دارد. مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند ($P < 0.05 = *$, $P < 0.01 = **$, $P < 0.001 = ***$).

نتایج نشان‌دهنده افزایش آهن داخل سلولی پیرو تیمار با FAC می‌باشد (شکل ۳).

تأیید ورود آهن به داخل سلول‌ها

جهت تأیید ورود آهن به داخل سلول‌ها میزان آهن داخل سلولی به وسیله روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی (AAS) اندازه‌گیری شد.

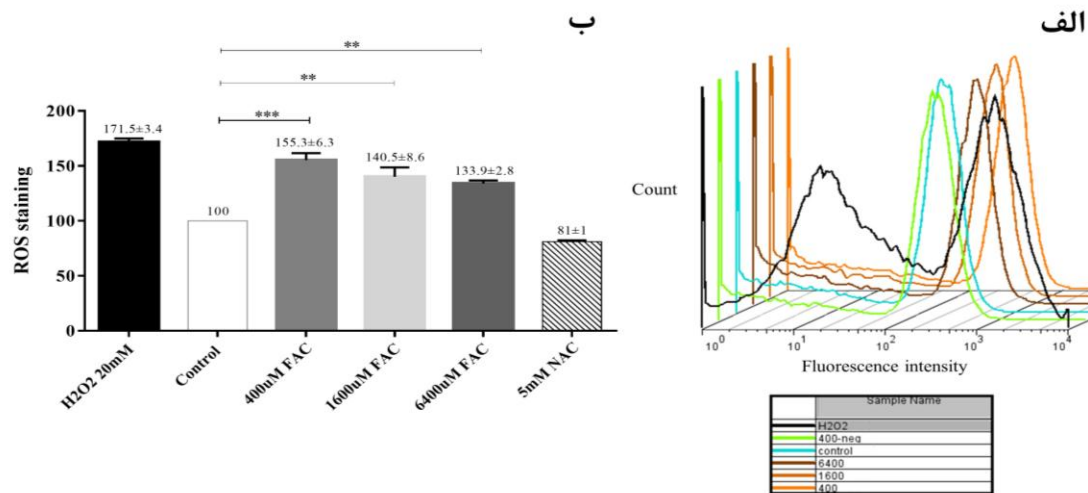


شکل شماره ۳: افزایش آهن داخل سلولی در رده سلولی CCRF-CEM (الف) و Nalm6 (ب) پس از تیمار ۲۴ ساعته با FAC. پس از تیمار سلول‌ها با آهن، سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۷۰۰ rpm سانتریفوژ گردیدند. پس از دور ریختن محلول رویی، پلت سلولی در PBS سوسپانسیون شده و سلول‌ها مجدداً با همان دور و طی همان مدت زمان، سانتریفوژ شدند. میزان آهن داخل سلولی پس از لیز آن‌ها با اسید نیتریک ۶۵ درصد با استفاده از روش AAS اندازه‌گیری شد. غلظت آهن به صورت بخش در بیلیون (ppb) در هر یک میلیون سلول گزارش گردیده است.

سنجش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در سلول‌های تیمار شده با آهن، سطح ROS به طور محسوس بیشتر از سلول‌های کنترل می‌باشد. با این حال FAC در غلظت ۴۰۰ میکرومولار بیشترین میزان ROS را القا نمود ($155/27 \pm 6/36$ درصد در مقابل ۱۰۰ درصد، $P < 0.001$) (شکل ۴، الف و ب).

کاهش سطح ROS در غلظت‌های بالاتر FAC نسبت به غلظت ۴۰۰ میکرومولار، احتمالاً، به واسطه افزایش سطح فریتین ناشی از افزایش آهن داخل سلولی است. به نظر می‌رسد فریتین با از دسترس خارج کردن آهن آزاد در سلول، یک نقش آنتی‌اکسیدانی را در این رابطه ایفا می‌کند.



شکل شماره ۴: آهن، تولید ROS داخل سلولی را القا می‌کند. (الف) شناسایی ROS با استفاده از ۲-۷-دی‌کلرو فلورسین دی‌استات (DCFH-DA). سلول‌های CCRF-CEM با غلظت‌های مختلف FAC تیمار گردیدند، سپس به وسیله رنگ آمیزی با DCFH-DA و با استفاده از فلوسایتمتری شدت فلورسنت اندازه‌گیری شد. شدت فلورسنت با میزان فرم اکسیدشده‌ی شناساگر (DCF) همبستگی دارد و نشان‌دهنده میزان ROS داخل سلولی است. در این آزمایش‌ها H₂O₂ و N استیل سیستئین (NAC) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی به کار رفتند. همان‌طور که در بخش الف نشان داده شد منحنی شدت فلورسنت در سلول‌های آهن‌دار شده به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای به سمت راست منتقل شده است. (ب) FAC سطح ROS داخل سلولی را در مقایسه با سلول‌های کنترل به‌طور چشمگیری افزایش داد. مقادیر به‌صورت mean ± SEM گزارش شده‌اند ($P < 0.01$ و $P < 0.001$).

بحث

در بسیاری از مقالات، بیان این گیرنده در رده‌ی CCRF-CEM بررسی شده و افزایش بیان آن نسبت به سایر سلول‌ها گزارش شده است (۱۶، ۱۷). در ابتدا جهت بررسی تأثیر آهن بر بقای سلول‌های لوسمیک سلول‌های رده CCRF-CEM در فواصل زمانی مشخص با هولوترنسفرین تیمار شدند.

در شرایط فیزیولوژیک مسیر ترنسفرین مسیر اصلی در جذب آهن است؛ با این حال مقادیر بالای آهن سیستمیک می‌تواند سبب اشباع ترنسفرین و تشکیل اشکال غیرمتصل به ترنسفرین شود (NTBI: Non Transferrin Bound Iron). به‌صورت غیرانتخابی و آزادانه به‌وسیله‌ی بافت‌ها جذب می‌شود (۱۸). از این موارد می‌توان به سیستم انتقال آهن واجد کمپلکس‌های دارای وزن مولکولی کم، همچون فریک سترات، اشاره کرد (۱۵). نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از فریک آمونیوم سترات نشان داد آهن بر تکثیر دو رده‌ی سلولی ALL (CCRF-CEM و Nalm6) تأثیر مثبت داشته‌است. Pourcelot و همکاران (۲۰۱۵) نیز این اثر را بر رشد رده‌های لوسمیک میلوئیدی (KG1 و K562) گزارش کرده‌اند (۱۹). در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد FAC به روشی وابسته به دوز تکثیر سلول‌های لوسمیک را به‌طور چشمگیر تقویت می‌کند.

آهن از عملکردهای متابولیکی ضروری برای سلول حمایت کرده و تکثیر سلولی را تقویت می‌نماید (۱۴)؛ همچنین نقشی حمایتی را برای سلول‌های سرطانی بازی می‌نماید. نیاز سلول‌های سرطانی به آهن بیشتر از سلول‌های طبیعی می‌باشد. در نتیجه سلول‌های نوپلاستیک و توموری، به دلیل وابستگی زیاد به آهن، نسبت به سلول‌های سالم به فقر آهن حساس‌تر می‌باشند (۱۵). اگرچه تحقیقات متعددی درباره تلفیق شیمی‌درمانی و کلاته‌کننده‌های آهن صورت گرفته با این حال، بسیاری از مکانیسم‌های مولکولی، واسط نقش آهن در پاسخ به درمان، همچنان ناشناخته هستند و طبق بررسی‌های انجام‌شده تاکنون نقش آهن در حمایت از سلول‌های لنفوبلاستیک بدخیم و تأثیر آن بر بازده درمان در سرطان خون لنفوبلاستی حاد (ALL) و نیز مکانیسم‌های مربوطه، مورد مطالعه قرار نگرفته است. در پژوهش حاضر، ابتدا تأثیر آهن بر بقای سلول‌های لوسمیک لنفوبلاستی بررسی گردید. با توجه به آن‌که شکل اصلی انتقال آهن از طریق گیرنده ترنسفرین و به‌صورت هولوترنسفرین است و از آن‌جا که هولوترنسفرین توسط گیرنده ترنسفرین موجود در سطح سلول‌ها جذب می‌گردد و این گیرنده به‌صورت اختصاصی بیان می‌شود.

در طول شیمی‌درمانی دارد (۳۷). ROS همچنین می‌تواند سطوح mRNA سیکلین‌ها را در گذار چرخه سلولی از G1 به S به‌طور افزایشی تنظیم نماید (۳۸).

Irwin و همکاران فعال‌شدن انکوژن، پیامدهای جهش‌ها در میتوکندری، کاهش بیان آنتی‌اکسیدان‌ها، تغییر در آنزیم‌های مسئول سم‌زدایی همچون گزانتین اکسیدوردوکتاز، سیتوکروم P450 و خانواده‌ی NOX را به‌عنوان منشأ افزایش ROS در سلول‌های لوسمیک معرفی کرده‌اند (۳۹). با توجه به آن‌که محتوای آهن سلول‌های لوسمیک نسبت به سلول‌های سالم بالاتر است، شیوع گران‌باری آهن در مبتلایان به ALL رایج است و آهن از طریق واکنش فنتون سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود (۴۰)، در این پژوهش برای اولین بار آهن به‌عنوان یکی دیگر از القاگرهای ROS در سلول‌های ALL معرفی می‌شود.

اگرچه تأثیر آهن بر پاسخ به درمان در ALL همچنان نیاز به بررسی و مطالعه‌ی بیشتر به‌ویژه ارزیابی‌های پیش‌بالینی در این حوزه‌ی نوین از تحقیقات دارد، باین‌حال پژوهش حاضر نشان داد، جدا از عوارض جانبی گران‌باری آهن، از جمله اختلال در عملکرد برخی از اندام‌ها (مانند تیروئید، قلب و کبد)، آهن می‌تواند از طریق القای ROS و تقویت تکثیر سلول‌های لوسمیک حامی این سلول‌های سرطانی باشد و با توجه به ارتباط معنادار و مثبت بین ذخایر آهن مغز استخوان و پاسخ به درمان، می‌توان آهن را به‌عنوان بازیگر دخیل بر فرایند درمان معرفی کرد (۸).

نتیجه‌گیری

بنابراین در تلاش برای ارتقای بازده درمان در کودکان مبتلا به ALL، یافته‌های این تحقیق بر دقت در میزان و حجم خون تزریقی به مبتلایان به ALL، به‌خصوص افرادی که دوز بالای شیمی‌درمانی دریافت می‌کنند، تأکید می‌نماید. همچنین پیشنهاد می‌شود که ذخایر آهن مغز استخوان بیماران در طول شیمی‌درمانی بررسی گردد تا با کاهش احتمال گران‌باری آهن از امکان عود بیماری نیز کاسته شود.

با این‌حال تأثیر هولوترنسفرین، به جز یک غلظت، قابل توجه نبود. این رخداد را می‌توان به اشباع‌پذیری گیرنده‌ی ترنسفرین نسبت داد؛ به‌طوری که ورود وابسته به گیرنده منجر به محدودسازی جذب آهن می‌شود. با آن‌که FAC در غلظت‌های پایین سبب افزایش تکثیر سلولی می‌شود؛ در غلظت‌های بالا (۲۵ میلی‌مولار) سمی است. سمیت غلظت بالای FAC (۱۰ میلی‌مولار) برای رده‌ی سلولی هپاتوسیتی (HH4) نیز گزارش شده است (۲۰). شایان ذکر است که آهن بسته به غلظت و طول مدت انکوباسیون می‌تواند علاوه بر تأثیر مثبت بر تکثیر سلولی، آپوپتوز، فروپتوز (یک مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی وابسته به آهن) و نکروز را القا نماید (۲۱-۲۳). با توجه به آن‌که فعالیت ریبونوکلوئتید ردوکتاز (RR) در سلول‌های بدخیم افزایش می‌یابد و این آنزیم در رشد سلولی‌های توموری دخیل است (۲۴)، فعالیت تکثیری آهن در سلول‌های لوسمیک ممکن است تا حدی مربوط به اهمیت آن در عملکرد این آنزیم باشد (۲۵). از سوی دیگر، شایان توجه است که هموستازی ردوکتاز در سلول‌های سرطانی از جمله سلول‌های T-ALL تغییر می‌یابد (۲۶،۲۷). در نتیجه سطوح ROS در سلول‌های T-ALL نسبت به سلول‌های غیرلوسمیک بالاتر است. اگرچه سطوح بالای ROS می‌تواند سبب القای توقف چرخه سلولی، پیری و آپوپتوز شود (۲۸). مقادیر غیرکشنده ROS در انواع مختلفی از سرطان‌ها منجر به القای تکثیر سلولی شده‌اند (۲۹). ROS به‌خصوص پراکسید هیدروژن می‌تواند به‌عنوان یک پیام‌آور ثانویه در سیگنالینگ سلولی عمل کند (۳۰،۳۱). آن‌ها فعالیت پروتئین را از طریق اکسیداسیون برگشت‌پذیر اهدافشان از جمله تیروزین فسفاتازها، تیروزین کینازها و فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌کنند (۲۹). گزارش شده است که ROS از طریق فعال کردن Erk1/2 در سرطان‌های مختلفی همچون تخمدان، سینه، ملانوما و سرطان خون بقای سلولی را افزایش داده است (۳۲-۳۴). در چندین مطالعه نیز مشخص شده که ROS با فعال کردن مسیر PI3k/Akt می‌تواند سبب تقویت بقای سلولی گردد (۳۵). همچنین استرس اکسیداتیو از طریق مسیرهای سیگنالینگ مختلف می‌تواند مسیر NF- κ B را فعال کند (۳۶). این مسیر نقشی حیاتی در بقای سلول، تنظیم چرخه سلولی و تکثیر آن، اتصالات سلولی و ایجاد مقاومت دارویی در سلول‌های سرطانی

References:

1. Mousavi SM, Pourfeizi A, Dastgiri S. Childhood cancer in Iran. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32(5):376-82. PMID: 20588194
2. Margolin JF. Molecular diagnosis and risk-adjusted therapy in pediatric hematologic malignancies: a primer for pediatricians. *Eur J Pediatr* 2011;170(4):419-25. PMID: 21350806
3. Raetz EA, Bhatla T. Where do we stand in the treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012(1):129-36. PMID: 23233571
4. Eng J, Fish JD. Insidious iron burden in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56(3):368-71. PMID: 21072815
5. Ruccione KS, Wood JC, Sposto R, Malvar J, Chen C, Freyer DR. Characterization of transfusion-derived iron deposition in childhood cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(9):1913-9. PMID: 24962841
6. Michon J. Incidence of anemia in pediatric cancer patients in Europe: results of a large, international survey. *Med Pediatr Oncol* 2002;39(4):448-50. PMID: 12203661
7. Ruccione KS, Mudambi K, Sposto R, Friley J, Ghazarossian S, Freyer DR. Association of projected transfusional iron burden with treatment intensity in childhood cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(4):697-702. PMID: 22190481
8. Moafi A, Ziaie M, Abedi M, Rahgozar S, Reisi N, Nematollahi P, et al. The relationship between iron bone marrow stores and response to treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Medicine* 2017;96(44):e8511. PMID: 29095311
9. Cetin Y, Bullerman LB. Evaluation of reduced toxicity of zearalenone by extrusion processing as measured by the MTT cell proliferation assay. *J Agric Food Chem* 2005;53(16):6558-63. PMID: 16076149
10. Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods* 1993;160(1):89-96. PMID: 8450240
11. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol* 2011;716:157-68. PMID: 21318905
12. Rahimi Babasheikhali S, Rahgozar S, Mohammadi M. Ginger extract has anti-leukemia and anti-drug resistant effects on malignant cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145(8):1987-98. PMID: 31214760
13. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int* 2005;54(2):119-22. PMID: 15866473
14. Rouault TA, Tong WH. Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet* 2008;24(8):398-407. PMID: 18606475
15. Steegmann-Olmedillas JL. The role of iron in tumour cell proliferation. *Clin Transl Oncol* 2011;13(2):71-6. PMID: 21324793
16. Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* 1983;36(5):539-45. PMID: 6302135
17. Larrick JW, Cresswell P. Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1979;583(4):483-90. PMID: 218639
18. Beguin Y, Aapro M, Ludwig H, Mizzen L, Osterborg A. Epidemiological and nonclinical studies investigating effects of iron in carcinogenesis-a critical review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;89(1):1-15. PMID: 24275533

19. Pourcelot E, Lenon M, Mobilia N, Cahn JY, Arnaud J, Fanchon E, et al. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: nailing down the intracellular functional iron concentration. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853(7):1596-605. PMID: 25827953
20. Li SW, Liu CM, Guo J, Marcondes AM, Deeg J, Li X, et al. Iron overload induced by ferric ammonium citrate triggers reactive oxygen species-mediated apoptosis via both extrinsic and intrinsic pathways in human hepatic cells. *Hum Exp Toxicol* 2016;35(6):598-607. PMID: 26224043
21. Munoz JP, Chiong M, García L, Troncoso R, Toro B, Pedrozo Z, et al. Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: role of reactive oxygen species and nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2010;48(4):526-34. PMID: 19969068
22. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ* 2016;23(3):369. PMID: 26794443
23. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060-72. PMID: 22632970
24. Tsimberidou AM, Alvarado Y, Giles FJ. Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002;2(4):437-48. PMID: 12647987
25. Nyholm S, Mann GJ, Johansson AG, Bergeron RJ, Graslund A, Thelander L. Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J Biol Chem* 1993;268(35):26200-5. PMID: 8253740
26. Silva A, Girio A, Cebola I, Santos CI, Antunes F, Barata JT. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2011;25(6):960-7. PMID: 21455214
27. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004;7(2):97-110. PMID: 15158766
28. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Ann Rev Cancer Biol* 2017;1:79-98. Link
29. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005;10(1-3):1881-96. PMID: 15769673
30. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000;87(3):179-83. PMID: 10926866
31. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, et al. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 2002;277(5):3101-8. PMID: 11719508
32. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26(22):3291-310. PMID: 17496923
33. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1263-84. PMID: 17126425
34. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 2008;22(4):686-707. PMID: 18337767
35. Liu LZ, Hu XW, Xia C, He J, Zhou Q, Shi X, et al. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2006;41(10):1521-33. PMID: 17045920

36. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerel PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* 2000;28(9):1317-27. PMID: 10924851
37. Ahmed KM, Cao N, Li JJ. HER-2 and NF-kB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Res* 2006;26(6B):4235-43. PMID: 17201139
38. Felty Q, Singh KP, Roy D. Estrogen-induced G 1/S transition of G 0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene* 2005;24(31):4883-93. Link
39. Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(11):1349-83. PMID: 22900756
40. Toyokuni S. Iron and thiols as two major players in carcinogenesis: friends or foes? *Front Pharmacol* 2014;5:200. PMID: 25221514