

## اثر آدنوزین ۵- تری فسفات بر چرخه سلولی در مرحله S سلول های KG1 لوسمی میلوئید حاد انسانی

سید محمد امین موسوی<sup>۱</sup>، امیرحسین احمدی<sup>۲</sup>، راضیه یزدانپرست<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

<sup>۲</sup>کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

<sup>۳</sup>استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** آدنوزین ۵- تری فسفات (ATP) نه تنها به عنوان منبع رایج انرژی در تمامی سلول ها به شمار می رود؛ بلکه در تحریک مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی نیز که منجر به آپوپتوز و یا تمایز می شود، نقش دارد. همچنین تاکنون گزارش های متعددی درباره اثرات ضد سرطانی این ترکیب بر رده های سلولی سرطان های مختلف و چندین مکانیسم در مورد نحوه عملکرد آن ارائه شده است که به نظر می رسد مکانیسم اثر آن تا حدود زیادی بستگی به نوع سلول هدف دارد. در مطالعه حاضر اثرات ATP و مکانیسم عمل آن بر رده سلولی KG1 به عنوان مدلی برای لوسمی میلوئید حاد (AML) بررسی گردید.

**روش بررسی:** رده سلولی KG1 انسانی پس از کشت، تحت تأثیر ATP در غلظت های (۵۰-۱۰۰۰  $\mu$ m) و فاصله های زمانی مختلف (۲۴-۷۲ ساعت) قرار گرفت. اثرات ATP بر رشد سلول های KG1 با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد. برای بررسی آپوپتوز از روش های فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلوروسنت استفاده شد. محتوای DNA و چرخه سلولی با دستگاه فلوسایتومتر ارزیابی گردید. جهت مطالعه مکانیسم اثر ATP، اثرات ATP $\gamma$ S (آگونیست غیرقابل تجزیه ATP) و نوکلئوتیدهای حاصل از تجزیه ATP (آدنوزین، ADP و AMP) بر روی سلول های KG1 بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون تی تست صورت گرفت و  $P < 0.05$  سطح آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** در این مطالعه، ATP در فواصل زمانی ۲۴-۷۲ ساعت و در غلظت های بین ۱۰۰-۱۰۰۰  $\mu$ m سبب مهار رشد سلولی و توقف چرخه سلولی در مرحله S ( $P < 0.05$ ) به همراه وقوع آپوپتوز شد. به علاوه، نتایج نشان داد که این اثرات ATP بر سلول های KG1، از طریق گیرنده P2X<sub>7</sub> می باشد. **نتیجه گیری:** از آنجایی که روش های درمانی کنونی AML که بیشتر آنها مبتنی بر شیمی درمانی است، تاکنون چندان مؤثر واقع نشده اند و همراه اثرات جانبی از جمله مقاومت دارویی می باشند، براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر ATP می تواند به عنوان ترکیبی مؤثر به تنهایی و یا در ترکیب با داروهای دیگر در درمان این لوسمی مورد استفاده قرار گیرد. **کلید واژه ها:** آپوپتوزیس؛ لوسمی میلوئید حاد؛ گیرنده پورنیرژیک پی ۲ ایکس.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: moosav\_m@tabrizu.ac.ir

تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۴۴۳

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۰

### مقدمه

سلول های پیش ساز میلوئید است که باعث اختلال در مرگ طبیعی و برنامه ریزی شده (آپوپتوز) آنها نیز می گردد (۲،۱). تاکنون روش های مختلفی برای درمان AML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می توان به شیمی درمانی، تمایز درمانی، پیوند مغز استخوان و

لوسمی میلوئید حاد (AML) نوعی سرطان خون بدخیم است که در آن پیشرفت بیماری در سطح سلول های CD34<sup>+</sup> باعث مقاومت به دارو و عود بیماری می شود. عامل پیشرفت این بیماری تکثیر بی رویه

سبب القای آپوپتوز می‌شود، به‌عنوان مثال ATP با فعال کردن گیرنده سطح سلولی P2X<sub>7</sub> سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی A375 ملانومای انسان و یا PC-3 سرطان پروستات می‌شود (۸). علاوه بر اثر ATP از طریق گیرنده‌های سطح سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی، برخی مطالعات اثرات این نوکلئوتید را از طریق محصولات حاصل از تجزیه متابولیکی آن می‌دانند (۶). وجود اکتونوکلئوتیدها در سطح غشای سلولی و یا در محیط بین سلولی سبب هیدرولیز ATP به محصولات چون آدنوزین ۵'-دی فسفات (ADP)، آدنوزین ۵'-مونو فسفات (AMP) و آدنوزین می‌گردد. در برخی تحقیقات اثر ATP به‌واسطه تجزیه آن به آدنوزین گزارش شده است (۶). به هر حال در یک سلول همه این مسیرها می‌تواند با هم رخ دهد و یا یکی از آنها اتفاق بیفتد (۶). لذا با توجه به‌وجود زمینه‌هایی در مورد نقش ATP در مهار رشد سرطان‌های مختلف و کارکرد احتمالی بالینی آن، این مطالعه با هدف تعیین اثر ATP بر رده سلولی KG1 به‌عنوان مدلی برای AML انجام شد؛ تا راه برای کاربرد احتمالی بالینی آن هموارتر شود.

### روش بررسی

در این مطالعه که به روش تجربی انجام گرفت، محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Biosera انگلستان تهیه گردید. فلاسک‌های کشت سلول و ظروف ۹۶ و ۲۴ چاهکی استریل از شرکت SPL Life Science کره جنوبی خریداری شد. آدنوزین ۵'-تری فسفات (ATP)، آدنوزین ۵'-دی فسفات (ADP)، آدنوزین ۵'-مونو فسفات (AMP)، آدنوزین (Adenosine)، دیپیریدامول (Dipyridamole)، آدنوزین ۵'-تری-۳-تیو تری فسفات (Adenosine 5'-O-3-thio Triphosphate, ATP<sub>γ</sub>S) و پروپیدیوم یودید (Propidium Iodide) و رنگ هوخست (Hoechst 33258) از شرکت سیگما-آلدریش آمریکا و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA)، سدیم دودسیل سولفات (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)، تریس (Tris-HCl) از شرکت Merck خریداری شدند. آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی سیلین از سیناژن (تهران-ایران) تهیه گردید. نمک تترازولیوم [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-MTT] از شرکت Roche Applied Science آلمان خریداری شد. رده سلولی KG1 از انستیتو پاستور

درمان‌های ترکیبی اشاره نمود (۳). با این حال استفاده از این روش‌ها، برخی اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی را در پی دارد و نشان‌دهنده این مطلب است که هیچ‌یک از روش‌های درمانی فعلی منجر به درمان کامل AML نشده است و با وجود اطلاعات گسترده در مورد چگونگی بیماری‌زایی AML، هنوز راهکاری مناسب برای زنده نگه داشتن طولانی مدت بیماران وجود ندارد (۴). لذا تلاش برای یافتن ترکیباتی که توانایی تومورکشی بیشتر و اثر جانبی کمتر داشته باشند، ادامه دارد. در این میان استفاده از نوکلئوتیدهای آدنین دار می‌تواند راهگشا باشد (۵). نوکلئوتیدهای آدنین دار خارج سلولی اثرات فیزیولوژیک متعددی را از خود بروز می‌دهند که از آن جمله می‌توان مهار تجمع پلاکت‌ها، اثرات قلبی-عروقی، دخالت در انتقال پیام‌های عصبی و موارد دیگر را نام برد (۵). در سالیان اخیر توجه زیادی به اثرات ضد سرطانی نوکلئوتیدها شده است، که از مهم‌ترین آنها می‌توان به اثرات سمی ATP بر سلول‌های سرطانی اشاره نمود (۶). در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که ATP دارای اثرات مهار رشدی و یا حتی سمی برای بسیاری از رده‌های سلولی پستانداران مانند فیروبلاست‌های سرطانی موش، سلول‌های لمفو، لوسمی، کارسینومای پانکراس، سلول‌های سرطان سینه و کارسینومای پوست می‌باشد (۶). از آنجایی که سلول‌های سرطانی در مقابل ATP نسبت به سلول‌های طبیعی خود حساس‌تر هستند، درمان با ATP به‌عنوان راهکاری مناسب مورد توجه قرار گرفته است (۶). در سال ۱۹۹۸ انجام یک آزمایش مرحله دوم کلینیکی در بیمارانی که از سرطان پیشرفته ریه رنج می‌بردند، نشان داد ATP دارای اثرات ضد سوءهاضمه در دو سوم بیماران بوده و سبب پایداری در وضعیت بیماران می‌شود (۷). تاکنون مکانیسم‌های مختلفی برای اثرات ATP ارائه شده است و به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌های اثر آن تا حدود زیادی بستگی به نوع سلول مورد مطالعه دارد (۶). از جمله این مکانیسم‌ها القای مسیرهای پیام‌رسانی از طریق گیرنده‌های سطح سلولی پورینی P2 می‌باشد (۸). این گیرنده‌ها به ۲ زیرخانواده P2X (شامل ۷ نوع گیرنده) و P2Y (شامل ۸ نوع گیرنده) طبقه‌بندی می‌شوند که فعال شدن هریک اثرات متفاوتی چون آپوپتوز، تمایز یا حتی تکثیر سلولی را در پی دارد (۸). یکی از این گیرنده‌ها که نقش به‌سزایی در القای فرآیند آپوپتوز ایفا می‌کند، گیرنده P2X<sub>7</sub> می‌باشد. در گزارش‌های متعددی نشان داده شده است که فعال شدن این گیرنده توسط ATP

فلوسایتومتری بررسی شدند (۹). (دستگاه فلوسایتومتر از نوع Partec مدل Pas و ساخت کشور آلمان می‌باشد). با استفاده از نرم‌افزار خاص دستگاه، درصد جمعیت سلولی در مراحل  $G_1$ ،  $S$ ، و  $G_2/M$  مشخص گردید. برای مطالعه آپپتوز به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در رنگ آمیزی با رنگ هوخست ۳۳۲۵۸ (Hoechst 33258)، سلول‌های طبیعی به صورت آبی یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های آپپتوز شده به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته، به طور غیرمنظم و به صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده است. برای تهیه این محلول، ۱mg هوخست در ۱ml آب ۲ بار تقطیر حل گردید. بعد از رسوب و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، ۱۰۰µl از محلول سلولی با ۱µl از رنگ هوخست مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. در ادامه، ۱۰۰µl از سوسپانسیون را روی لام میکروسکوپی قرار داده و اسمیر تهیه گردید، سپس روی آن لامل گذاشته و با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss- آلمان) بررسی شد (۱۰). به منظور مطالعه مکانیسم اثر ATP، احتمال ۲ مکانیسم عمده مورد اشاره در مقدمه بررسی گردید.

برای تعیین اینکه آیا مکانیسم عمل ATP از طریق تجزیه متابولیکی می‌باشد اثرات نوکلئوتیدهای ADP، AMP و آدنوزین سنجیده شد. همچنین از ATPγS که آگونیست تجزیه‌ناپذیر ATP به شمار می‌رود و نسبت به ATP آگونیست قوی تری برای  $P2X_7$  محسوب می‌گردد (۱۱)؛ برای سنجش این مطلب که آیا اثر ATP به واسطه گیرنده  $P2X_7$  می‌باشد، استفاده گردید (۶). در این بررسی کلیه آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ۳ بار تکرار  $\pm$  خطای استاندارد (SE) نمایش داده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون تی تست استفاده گردید و ( $P < 0.05$ ) سطح آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

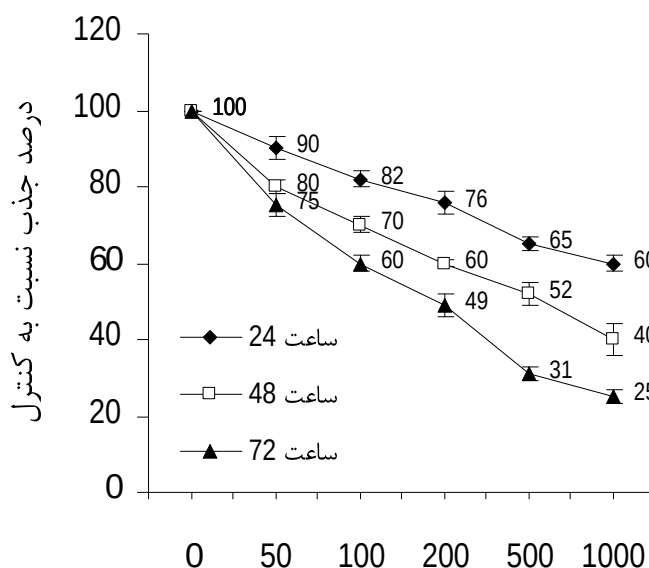
### یافته‌ها

در این مطالعه، داده‌های به دست آمده از آزمون نمک تترازولیوم نشان داد ATP دارای اثرات مهار رشدی بر روی سلول‌های KG1 می‌باشد (نمودار شماره ۱). همان‌طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود اثر مهار رشدی ATP به غلظت بستگی دارد، به طوری که مثلاً میزان مهار رشد در ۷۲ ساعت و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰µm به ترتیب ۲۵٪، ۳۳٪، ۵۵٪، ۶۰٪ و ۶۴٪ می‌باشد. همچنین اثرات ATP به زمان نیز بستگی دارد، به طوری که به عنوان

ایران تهیه گردید و برای رشد آن از محیط کشت RPMI 1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک‌های استروپتومایسین (۱۰۰µg/mL) و پنی سیلین (۱۰۰U/mL) بود، استفاده شد. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در انکوباتور با شرایط ۵٪  $CO_2$ ، رطوبت ۹۵٪ و در دمای ۳۷°C قرار گرفتند، و هر ۳ روز یک‌بار پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت صورت گرفت.

برای بررسی تکثیر و زیستایی از آزمون نمک تترازولیوم MTT استفاده شد. این آزمون که نوعی آزمون رنگ‌سنجی محسوب می‌شود، بر پایه شکسته شدن نمک تترازولیوم MTT زرد به کریستال‌های فورمازان بنفش توسط سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند، قرار دارد. این احیای سلولی با دخالت دهیدرونازهای میتوکندریایی صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازانی تشکیل شده قابل حل شدن هستند و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند با استفاده از اسپکتروفتومترهای چند چاهکی به طور کمی بررسی شود. به منظور انجام این آزمون ابتدا تعداد  $10^3$  سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت‌های مختلف تیمار شدند. با فرا رسیدن زمان‌های مختلف پس از تیمار، میزان ۱۰µm از نمک تترازولیوم (Roche-آلمان) به درون هر چاهک اضافه شد. سپس به مدت ۴ ساعت فرصت داده شد؛ تا واکنش تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان انجام گیرد. پس از طی ۴ ساعت ۱۰۰µm از بافر حل کننده (Roche-آلمان) برای از بین بردن سلول‌های موجود و حل کردن کریستال‌های فورمازان تولید شده استفاده گردید. پس از گذشت یک شب، جذب نوری هریک از چاهک‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر چند چاهکی در طول موج ۵۷۰nm مورد ارزیابی قرار گرفت (۹). جهت بررسی چرخه سلولی و محتوای DNA سلول‌های تیمار شده از دستگاه فلوسایتومتر استفاده شد. بدین منظور، سلول‌ها در ظروف ۲۴ خانه‌ای کشت شده و با غلظت‌های متفاوت دارو و در زمان‌های مختلف تیمار شدند. بعد از جمع‌آوری و سانتریفوژ در دور ۸۰۰g، سلول‌ها با بافر فسفات سرد شستشو و توسط اتانول ۷۰٪ تثبیت شدند. این سلول‌ها تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. برای بررسی مراحل چرخه سلولی، نمونه‌های کنترل و تیمار شده را به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰mg پروپیدیم ایویدید (PI) و ۲۰mg RNase (حل شده در ۱ml بافر فسفات) مخلوط کرده و با دستگاه

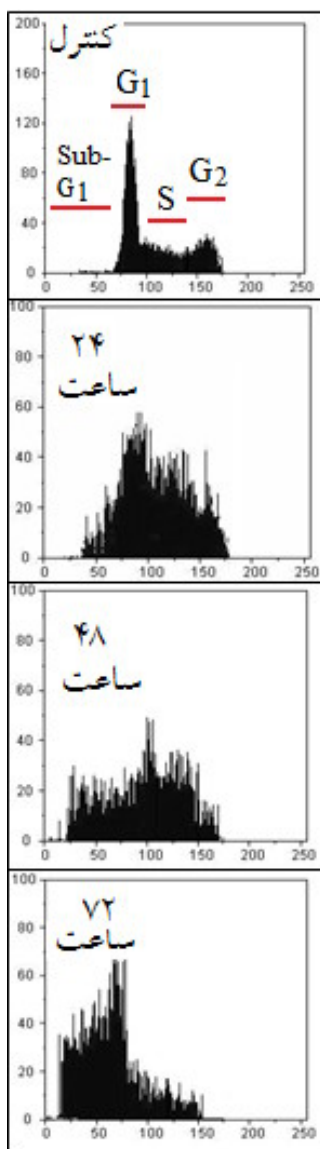
مثال در غلظت  $500 \mu\text{m}$  میزان مهار رشد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۷٪، ۳۸٪ و ۶۰٪ بوده است.



نمودار غلظت (میکروسکوپ) رشد سلول‌های KG1

سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ATP با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ۳ آزمایش مستقل  $\pm$  خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اعداد به دست آمده از نمودار برای غلظت‌های ATP از نظر آماری معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) می‌باشند. میزان خطای استاندارد در ۲۴ ساعت برای غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۲ و در ۴۸ ساعت ۰/۲، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۳ و ۰/۳ می‌باشد.

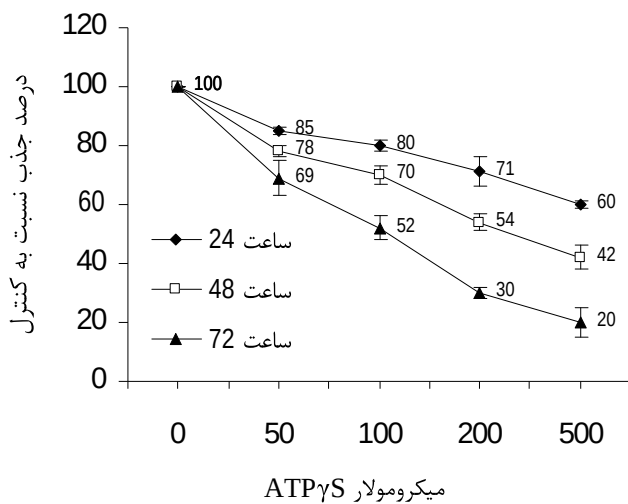
چون تغییر و مهار چرخه سلول عموماً پیش مقدمه اکثر فرآیندها از جمله مهار رشد و مرگ سلولی است، لذا در این مطالعه، اثرات ATP بر چرخه سلولی سلول‌های تیمار شده نیز بررسی گردید. نتایج نشان داد سلول‌های تیمار شده با ATP در غلظت  $500 \mu\text{m}$  با گذشت زمان در مقایسه با سلول‌های کنترل، توقف چشمگیر چرخه سلولی در مرحله S را نشان می‌دهد (شکل شماره ۱). این داده‌ها نشان داد ATP سبب توقف چرخه سلولی در مرحله S شده است. در ضمن از زمان ۲۴ ساعت به بعد جمعیتی از سلول‌ها در بازه قبل از مرحله  $G_1$  (sub- $G_1$  peak) مشاهده شدند. وجود این پیک نشان‌دهنده وقوع آپوتوز بود. بدین ترتیب نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های KG1 در اثر ATP همزمان با توقف چرخه سلولی دچار آپوتوز شده‌اند.



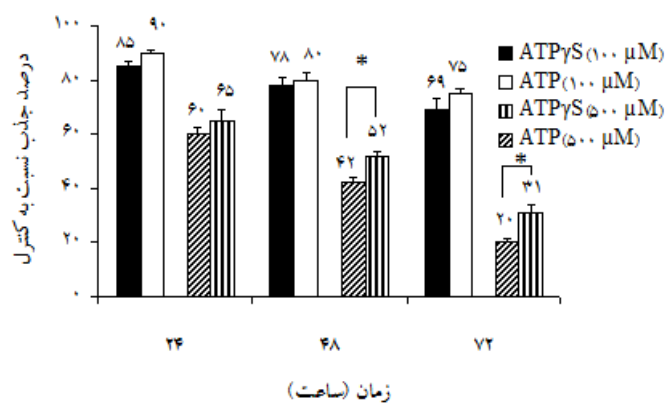
شکل شماره ۱: بررسی اثرات ATP بر چرخه سلولی KG1  
سلول‌های KG1 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت  $500 \mu\text{m}$  ATP تیمار شد و درصد سلول‌ها در هر مرحله چرخه سلولی به کمک دستگاه فلوسایتومتر مطابق روش بررسی محاسبه شد.

اگرچه داده‌های حاصل از بررسی محتوای DNA و چرخه سلولی به روش فلوسایتومتری (شکل شماره ۱) نشان داد که ATP به احتمال قوی سبب القای آپوتوز در سلول‌های KG1 می‌شود؛ ولی با این وجود، به منظور تأیید بیشتر موضوع از میکروسکوپ فلوروسنت نیز استفاده گردید. همان‌طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، در سلول‌های تیمار شده با ATP در زیر میکروسکوپ فلوروسنت نقاط روشنی دیده می‌شود که نشان‌دهنده وقوع آپوتوز است.

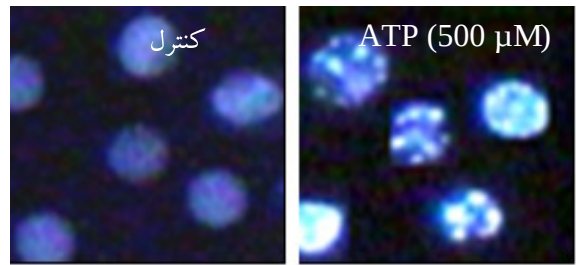
نوکلئوتیدها اثر قابل توجهی از خود نشان نمی‌دهند. این نتایج نشان می‌دهد قسمت عمده اثرات ATP در سلول‌های KG1، از طریق گیرنده P2X<sub>7</sub> صورت می‌گیرد.



نمودار شماره ۲: اثرات ATPγS بر روی تکثیر سلول‌های KG1 سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ATPγS با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ۳ آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. میزان خطای استاندارد در ۲۴ ساعت برای غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ به ترتیب ۰/۲، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ و در ۴۸ ساعت ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و در ۷۲ ساعت ۰/۳، ۰/۶، ۰/۲ و ۰/۵ می‌باشد.



نمودار شماره ۳: مقایسه اثرات ATP و ATPγS در سلول‌های KG1 سلول‌ها با غلظت‌های مشابه ATP و ATPγS با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ۳ آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اختلاف نشان داده شده با \* ( $p < 0.01$ ) از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. میزان خطای استاندارد در ۲۴ ساعت برای ATP (100 μM)، ATPγS (100 μM)، ATP (500 μM) و ATPγS (500 μM) به ترتیب ۰/۲، ۰/۳، ۰/۳ و ۰/۲ و در ۴۸ ساعت ۰/۳، ۰/۳، ۰/۳ و ۰/۳ و در ۷۲ ساعت ۰/۳، ۰/۳، ۰/۳ و ۰/۳ می‌باشد.



شکل شماره ۲: اثر آپوپتوزی ATP بر سلول KG1 توسط میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ‌آمیزی Hoechst

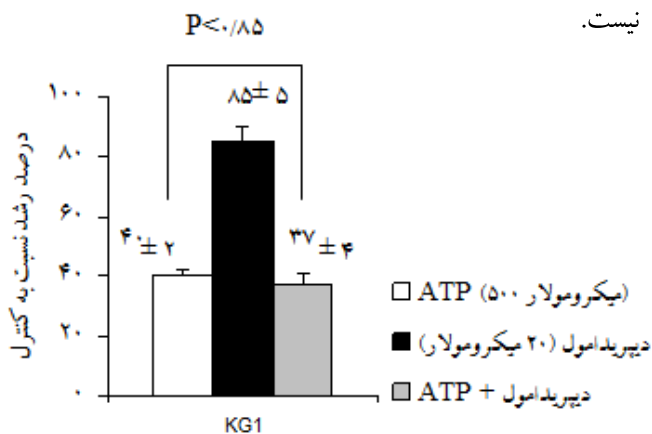
در تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنت، هسته سلول‌های آپوپتوز شده به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته به طور غیرمنظم و به صورت نقاط آبی درخشان مشاهده می‌شود.

همان‌طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود ATPγS در مقایسه با ATP، اثرات مهار رشدی مساوی و حتی بیشتری از خود نشان داده است. به عنوان مثال بعد از ۷۲ ساعت و براساس آزمون MTT میزان مهار رشد در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ μM ATPγS به ترتیب ۳۱٪، ۴۸٪، ۷۰٪ و ۸۰٪ می‌باشد که این میزان در مقایسه با غلظت‌های مشابه ATP در ۷۲ ساعت یعنی ۲۵٪، ۳۳٪، ۵۵٪ و ۶۰٪ مساوی یا بیشتر است (نمودار شماره ۳). این داده‌ها نشان داد اثرات ATP در سلول‌های KG1 به واسطه هیدرولیز آن نیست و احتمالاً از طریق گیرنده سطح سلولی P2X<sub>7</sub> می‌باشد. برای مشخص نمودن دقیق‌تر این فرضیه و تعیین این موضوع که اثر ATP واقعاً به واسطه نوکلئوتیدهای حاصل از تجزیه آن (AMP، ADP) یا آدنوزین نمی‌باشد آزمایشی طراحی گردید، تا اثرات AMP، ADP و آدنوزین بر روی این رده سلولی مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور اثر ATP، ADP، AMP و آدنوزین در ۲ محیط کشت متفاوت، یکی دارای سرم غیرفعال شده با حرارت (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum) یک ساعت در دمای ۵۹°C و دیگری دارای سرم فعال (حرارت نیافته) بر روی رده سلولی KG1، ارزیابی شد. خصوصیت محیط کشت غیرفعال شده با حرارت این است که آنزیم‌های هیدرولیزکننده ATP در آن فاقد فعالیت هستند و به این ترتیب اگر اثر ATP به واسطه تجزیه آن باشد در محیط کشت حاوی سرم غیرفعال شده با حرارت اثرات ATP کمتر خواهد شد (۶). همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود هم در محیط کشت حاوی سرم فعال و هم در محیط کشت حاوی سرم غیرفعال، فقط مولکول ATP دارای اثرات مهار رشدی قابل توجه بر سلول‌های KG1 می‌باشد و بقیه

## بحث

مطالعه حاضر به منظور بررسی مکانیسم‌های مولکولی اثرات سمی ATP بر یکی از رده‌های سلولی معروف لوسمی KG1 صورت گرفت. این رده سلولی به عنوان مدلی مناسب برای AML و مقاوم به دارو محسوب می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد ATP سبب مهار چرخه سلولی در مرحله S و القای آپوپتوز در رده سلولی KG1 می‌شود. تاکنون اثر مهار رشدی نوکلئوتیدهای آدنین دار در انواع مختلف رده‌های سلولی گزارش شده است. برای اولین بار Rapaport با بررسی اثرات ترکیباتی که سبب افزایش ذخیره ATP سلولی می‌شوند، نشان داد ATP با مهار همانندسازی DNA در سلول‌های سرطانی، سبب مهار رشد چند رده سلولی سرطان پانکراس، کلون، ملانوما، روده و سینه می‌شود (۱۲). همچنین نشان داده شد در سرطان ریه نیز ATP با غلظت‌های ۰/۵-۳mM سبب مهار رشد ۴ رده سلولی به صورت وابسته به غلظت می‌شود و این اثر مهار رشدی همراه با تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها می‌باشد (۱۳). اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ATP و آدنوزین بر روی رده سلولی TE-13 سرطان معده نیز مشاهده شده است (۱۴). همچنین بررسی‌ها بر روی رده سلولی HT-1376 سرطان مثانه، نشان داد ATP قادر به مهار رشد این رده سلولی در In vitro و In vivo می‌باشد (۱۵). در مطالعه حاضر، داده‌های حاصله مبنی بر تأثیر ATP بر توقف چرخه سلولی در مرحله S رده سلولی KG1، از این جنبه که می‌تواند بیانگر علت مهار رشد سلول‌های KG1 باشد، مهم است. چنین اثری از ATP قبلاً نیز در موارد متعددی گزارش شده است. تجمع ATP در داخل سلول و توقف چرخه سلولی در مرحله S مکانیسم پیشنهادی برای اثر مهار رشدی ATP در رده‌های سلولی CAPAN-1، BxPC، سرطان پانکراس، HT29 آدنوکارسینوما، کلون، Hs294T ملانوما، Hs584T سرطان سینه و Hs586INT سرطان روده می‌باشد (۱۲). Spungin و همکارانش نیز نشان دادند طولانی شدن مرحله S و توقف چرخه سلولی در این مرحله سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌شود (۱۶). در بررسی رده سلولی TE-13 سرطان معده مشاهده گردید که ATP در غلظت ۰/۱mM سبب توقف چرخه سلولی در مرحله S می‌شود (۱۴). همچنین با توجه به وجود ارتباط بین جمعیت سلول‌های موجود در مرحله S و پاسخ مثبت به شیمی درمانی، ATP می‌تواند به عنوان یک

همچنین به منظور اطمینان بیشتر، از مهارکننده دیپیریدامول (Dipyridamole) که برهم‌زننده عملکرد ناقلین غشایی آدنوزین در انتقال آن به داخل سلول می‌باشد، استفاده شد (۶). بدین منظور سلول‌های KG1 در سه گروه تیمار شده با  $20\mu\text{M}$  دیپیریدامول، تیمار شده با  $500\mu\text{M}$  ATP و تیمار شده با ترکیب  $20\mu\text{M}$  دیپیریدامول +  $500\mu\text{M}$  ATP، به مدت ۷۲ ساعت در معرض دارو قرار گرفتند. همان‌طور که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است، وجود دیپیریدامول و یا نبود آن در محیط هیچ تأثیری در اثرگذاری ATP بر سلول‌های KG1 ندارد که خود تأییدکننده آن است که مکانیسم عمل ATP به واسطه تجزیه آن به آدنوزین نیست.



نمودار شماره ۴: مقایسه اثرات ATP، دیپیریدامول و ترکیب ATP + دیپیریدامول

سلول‌ها با غلظت  $500\mu\text{M}$  ATP و  $20\mu\text{M}$  دیپیریدامول و ترکیب ATP و دیپیریدامول با فاصله زمانی ۷۲ ساعت تیمار شدند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ۳ آزمایش مستقل  $\pm$  خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اختلاف نشان داده شده از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول: مقایسه اثرات ATP، ADP، AMP و Ado (آدنوزین) بر سلول‌های KG1 در محیط کشت حاوی سرم فعال و غیرفعال

| نوکلتوتید               | محیط کشت فعال | محیط کشت غیرفعال |
|-------------------------|---------------|------------------|
| کنترل                   | ۰             | ۰                |
| ATP (۵۰۰) $\mu\text{M}$ | 60 ± 3        | 56 ± 4           |
| ADP (۵۰۰) $\mu\text{M}$ | 33 ± 2        | 34 ± 3           |
| AMP (۵۰۰) $\mu\text{M}$ | 34 ± 2        | 39 ± 5           |
| Ado (۵۰۰) $\mu\text{M}$ | 34 ± 2        | 35 ± 4           |

نفوذپذیری غشای سلولی می‌شود که می‌توان این مسأله را به گیرنده سطح سلولی P2X<sub>7</sub> نسبت داد (۲۱، ۲۲). در این مطالعه نشان داده شد که در مورد سلول‌های KG1، ATP از طریق گیرنده P2X<sub>7</sub> اثر خود را اعمال می‌کند. همان‌طور که در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌شود مساوی یا بیشتر بودن اثر ATP $\gamma$ S در قیاس با ATP، عدم تأثیر نوکلئوتیدهای ATP، ADP، AMP و آدنوزین (جدول) بر سلول‌های KG1 در محیط کشت غیرفعال‌شده با حرارت و بیان گیرنده سطح سلولی P2X<sub>7</sub> در این سلول‌ها تأیید کننده این مطلب است که ATP با تأثیر گذاری بر گیرنده P2X<sub>7</sub> اثر خود را القا می‌کند (۲۳).

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد ATP قادر به مهار رشد و القای آپوپتوز همزمان با توقف چرخه سلولی در مرحله S بوده و این اثر به‌طور عمده به‌واسطه گیرنده P2X<sub>7</sub> می‌باشد. این اثرات به همراه فقدان اثرات جانبی خاص توسط ATP که در مطالعات انسانی ثابت شده است، احتمالاً ATP را به‌عنوان داروی قوی و مؤثر در درمان AML معرفی می‌نماید. در عین حال تحقیقات بیشتر بر رده‌های سلولی دیگر به‌منظور اطمینان از اثر آن در درمان AML ضروری به‌نظر می‌رسد.

ترکیب قابل استفاده در کنار داروهای شیمی‌درمانی مورد توجه قرار گیرد. در واقع بیان این مطلب که سلول‌های مرحله S چرخه سلولی حساسیت بیشتری به داروهای شیمی‌درمانی دارند، می‌تواند منجر به جستجو برای یافتن ترکیباتی گردد که به Chemosensitive معروف بوده و سبب تجمع سلول‌های سرطانی در مرحله S قبل از شیمی‌درمانی می‌شوند (۱۷). داده‌های به دست آمده از فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلوروسنت در مطالعه حاضر نشان داد سلول‌های KG1 تیمار شده با ATP همزمان با مهار چرخه سلولی در مرحله S دچار آپوپتوز می‌شوند. القای آپوپتوز توسط ATP تاکنون در سلول‌های مختلفی گزارش شده است. به‌عنوان نمونه تاکنون وقوع آپوپتوز در سلول‌های بنیادی خونی موش (۱۸)، رده سلولی Li-7A سرطان کبد (۱۹) و موارد بسیار دیگر مشاهده شده است. از آنجایی که اختلال در فرآیند آپوپتوز عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به شمار می‌رود و مقاومت به آپوپتوز از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی در برابر شیمی‌درمانی است (۲۰)، لذا اثر ATP از این جنبه حایز اهمیت می‌باشد.

تاکنون مکانیسم‌های مختلفی در مورد نحوه اثر ATP ارائه شده است که مهم‌ترین آنها عبارتند از: ۱) سبب القای قحطی پیریمیدینی وابسته به آدنوزین می‌شود، ۲) ATP سبب افزایش

### References:

1. Ahmed N, Laverick L, Sammons J, Baumforth KR, Hassan HT. Effect of All-Trans Retinoic Acid on Chemotherapy Induced Apoptosis and Down-Regulation of Bcl-2 in Human Myeloid Leukaemia CD34 Positive Cells. *Leuk Res* 1999;23:741-749.
2. Pallis M, Fisher J, Truran L, Grundy M, Russell N, Burnett A. Reproducible Measurements of AML Blast P-Glycoprotein Function in 2 Center Analyses. *Blood* 2005;105:1367-1368.
3. Wang ZY. Ham-Wasserman Lecture: Treatment of Acute Leukemia by Inducing Differentiation Therapy and Apoptosis. *Hematology (Am Soc Hematol Edu Program)* 2003;1-13.
4. Coco FL, Nervi C, Avvisati G, Mandelli F. Acute Promyelocytic Leukemia: A Curable Disease. *Leukemia* 1998;12:1866-80.
5. Agteresch HJ, Dagnelie PC, Berg J, Wilson JHP. Adenosine Triphosphate, Established and Potential Clinical Applications. *Drugs* 1999;58:211-232.
6. Schneider C, Wiendl H, Ogilvie A. Biphasic Cytotoxic Mechanism of Extracellular ATP on U-937 Human Histiocytic Leukemia Cells: Involvement of Adenosine Generation. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:190-205.
7. Haskell CM, Mendoza E, Pisters KM, Fossella FV, Figlin RA. Phase II Study of Intravenous Adenosine 5'-Triphosphate in Patients with Previously Untreated Stage IIIB and Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer. *Invest New Drugs* 1998;16:81-85.
8. White N, Burnstock G. P2 Receptors and Cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:211-7.

9. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The Cytotoxic and Anti-Proliferative Effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat Cells is Reduced by Guanosine. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:391-8.
10. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. 3-Hydrogenkwadaphnin Induces Monocytic Differentiation and Enhances Retinoic Acid-Mediated Granulocytic Differentiation in NB4 Cell Line. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:722-9.
11. Peck ML, Herschlag D. Adenosine 5'-O-(3-thio) Triphosphate (ATPg $\gamma$ S) Is a Substrate for the Nucleotide Hydrolysis and RNA Unwinding Activities of Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4A. *RNA* 2003;9:1180-87.
12. 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;114:279-83.
13. 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;60:196-203.
14. Wang MX, Ren LM, Shan BE. Inhibitory Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate on Growth of Esophageal Carcinoma Cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:5915-9.
15. Shabbir M, Ryten M, Thompson C, Mikhailidis D, Burnstock G. Purinergic Receptor-Mediated Effects of ATP in High-Grade Bladder Cancer. *BJU International* 2007;101:106-12.
16. Spungin B, Friedberg I. Growth Inhibition of Breast Cancer Cells Induced by Exogenous ATP. *J Cell Physiol* 1993;157:502-8.
17. De Nully Brown P, Jensen PO, Diamant M, Mortensen BT, Hovgaard D, Gimsing P, Nissen NI. S-Phase Induction by Interleukin-6 Followed by Chemotherapy in Patients with Refractory Multiple Myeloma. *Leuk Res* 1998;2:983-9.
18. 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;140:1009-18.
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;30:671-6.
20. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 2002;108:153-64.
21. Haskell CM, Wong M, Williams A, lee Y. Phase I Trial of Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Patients with Advanced Cancer. *Med Pediatr Oncol* 1996;27:165-73.
22. Morelli A, Ferrari D, Bolognesi G, Rizzuto R, Di Virgilio F. Proapoptotic Plasma Membrane Pore: P2X<sub>7</sub> Receptor. *Drug Development Research* 2001;52:571-8.
23. Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q, et al. Expression of P2X<sub>7</sub> in Human Hematopoietic Cell lines and Leukemia Patients. *Leuk Res* 2004;28:1313-22.



