نقش ارسنیک در القای آپوپتوزیس از مسیر Fas در بیماران لوسمی حاد پرومیلوسیتی با جابه‌جایی کروموزومی(۱۷-۱۵)t

***علیرضا ارجمند** I

دکتر فرهاد ذاکر II

دکتر کامران علی‌مقدم III

دکتر اردشیر قوام‌زاده IV

لیلی معزی V

چکیده

لوسمی حاد پرومیلوسیتی یکی از زیر گروه‌های لوسمی حاد میلوییدی است که در ۱۵-۱۰٪ بیماران رخ می‌دهد. حدود ۳۰-۲۰٪ از این بیماران که تحت درمان استاندارد با آل‌ترانس رتینوییک اسید(ATRA) قرار می‌گیرند، در کم‌تر از ۱ سال دچار عود می‌شوند. تری‌اکسید ارسنیک(ATO) به تنهایی می‌تواند سبب القای پس‌رفت کامل بیماری، حتی در بیماران مقاوم به درمان یا دچار عود شود. مطالعات محققان در جهت مشخص کردن مکانیسم‌های عمل‌کرد این پاسخ‌های بالینی نشان داد که ارسنیک به طور مشخص مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی به خصوص القای تمایز با دوز پایین و القای آپوپتوزیس با دوز بالا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تاکنون بررسی آپوپتوزیس به طور مستقیم در سلول‌های این بیماران صورت نگرفته است و برخلاف مطالعات انجام شده روی رده‌های سلولی لوسمیک که به طور عمده نشان دهنده عدم تغییر بیان Fas/Apo 1 به عنوان یکی از گیرنده‌های کلاسیک آپوپتوزیس در طول درمان با ATO هستند، تغییر در بروز این گیرنده آپوپتوزیس به طور مستقیم در بیماران بررسی نشده است. در تحقیق حاضر به منظور بررسی الگوی آپوپتوزیس در سلول‌های بدخیم این بیماران، از یک روش فلوسایتومتری ۳ رنگ و تک لیزری جهت شناسایی سلول‌های لوسمیک آپوپتوتیک استفاده شد؛ به طوری که در جمعیت ناهمگن سلول‌های مغز استخوان بیماران، با استفاده از روش Annexin V و 7-AAD جمعیت‌های اولیه و انتهایی آپوپتوزیس شناسایی شد و در پانل دیگری نیز بیان Fas/Apo I در جمعیت لوسمیک مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، بیش‌ترین میزان آپوپتوزیس در هفته‌های اول تا دوم درمان شناسایی می‌شود و بیان Fas در سلول‌های بدخیم این بیماران در زمانی که آپوپتوزیس القا می‌گردد، نشان دهنده شرکت این گیرنده در القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – لوسمی حاد پرومیلوسیتی ۲ – تری‌اکسید ارسنیک ۳ – آپوپتوزیس ۴ – Fas/Apo 1 ۵ – فلوسایتومتری

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه آقای علیرضا ارجمند جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد خون‌شناسی به راهنمایی دکتر فرهاد ذاکر و مشاوره دکتر کامران علی‌مقدم، سال ۱۳۸۲. هم‌چنین این مقاله در همایش بین‌المللی ژنتیک سرطان در تهران سال ۱۳۸۲ ارائه شده است. این مطالعه تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است(شماره ثبت: ۲۳۰/۱۰۸۷).

I) کارشناس ارشد خون‌شناسی، مرکز تحقیقات خون‌شناسی و انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان شریعتی، بزرگراه جلال‌آل‌احمد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.(*مولف مسئول)

II) استادیار خون‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.

III) استادیار و فوق‌تخصص بیماری‌های خون و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

IV) استاد و فوق‌تخصص بیماری‌های خون و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

V) کارشناس ارشد خون‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

مقدمه

لوسمی حاد پرومیلوسیتی(APL) یکی از زیر گروه‌های لوسمی حاد میلوییدی(AML) بوده که در آن اغلب سلول‌های مغز استخوان بیماران را پرومیلوسیت‌های بدخیم با شاخص جابه‌جایی کروموزومی(۱۵؛۱۷) تشکیل می‌دهد. معرفی آل‌ترانس رتینوییک اسید(ATRA) در سال ۱۹۸۷ و استفاده از آن در ترکیب با شیمی درمانی بر پایه آنتراسایکلین، موفقیت در درمان را به ۷۰٪ و بیش‌تر رسانده و حیات ۵ ساله را نسبت به روش آنتراسایکلین یا ترکیب آن با سیتارابین حداقل ۲ برابر افزایش دهد.[۱]

درمان با ATRA به تنهایی یا به صورت ترکیبی در پس‌رفت بیماری یا حداقل نگه‌داری آن مؤثر است اما بدون اثرات جانبی نیست. یکی از اثرات نامطلوب و جدی این دارو سندرم رتینوییک اسید می‌باشد که با علائمی مانند لوکوسیتوز ناگهانی همراه با اختلال تنفسی، تب با دلیل نامشخص، ارتشاح و ادم ریه، کاهش فشار خون، احتباس پرده جنب و قلب و از کار افتادگی حاد کلیه خود را نشان داده و سبب مرگ این بیماران می‌شود.[۲و ۳] از سوی دیگر عدم پاسخ مجدد به درمان و بازگشت بیماری در تعدادی از بیماران به علت قطع ادامه درمان با ATRA، موجب شد تا مطالعات گسترده‌ای در جهت تعیین نقش ارسنیک تری‌اکسید(ATO) و تأثیر آن که نخستین بار توسط چینی‌ها ارائه شده بود، صورت گیرد. در نهایت وجود مطالعات تأیید کننده همراه با ارائه مکانیسم‌های احتمالی آن سبب شد تا این ترکیب به عنوان دارویی مناسب در درمان بیماران APL در موارد مقاوم یا عود مجدد مورد استفاده قرار گیرد.[۴، ۵و ۶]

از جمله مکانیسم‌های تایید شده اثر این ترکیب بر رده سلولی HL۶۰ و NB۴. القای تمایز با غلظت پایین(۰/۵-۰/۱ میکرومول) و القای آپوپتوز با غلظت بالا(۲-۰/۵ میکرومول) می‌باشد.[۷، ۸و ۹] با وجود تحقیقات گسترده انجام شده و نیز تحقیقاتی که در حال انجام شدن است، مسیر القای آپوپتوز در سلول‌های پرومیلوسیت توسط این دارو به طور کامل روشن نمی‌باشد. تاثیر مستقیم ارسنیک در کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و به دنبال آن رهاسازی سیتوکروم C و تشکیل کمپلکس با Apaf-1 ودر نهایت فعال شدن کاسپاز ۹، نشان داده شده است. فعال شدن کاسپاز ۸ که به دنبال اثر این دارو سبب کاهش پتانسیل غشای میتوکندری از طریق فعال کردن Bid(فرم فسفوریله Bad) و در نتیجه طی شدن مسیر فوق می‌گردد، یادآور مسیر غیرمستقیم فعال شدن آن یعنی مسیر Fas نیز می‌باشد.[۱۰، ۱۱و ۱۲] اگر چه معادل میزان In vitro این دارو در مقداری که تجویز می‌شود آپوپتوز را القا می‌کند، با توجه به شرایط متغیر حاکم بر سیستم In vivo، نمی‌توان نتایج In vitro را به سادگی به آن نسبت داد. از سوی دیگر شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک در محیط In vivo که به طور مرتب توسط سیستم رتیکولواندوتلیال از بدن حذف می‌شوند، یکی از مسایل جذاب ایمنولوژی بوده و شاید به همین دلیل مطالعه در زمینه اثر این دارو در القای In vivo آپوپتوزیس وجود ندارد بنابراین استفاده از روش حساس Annexin V و استفاده هم زمان آن با ۷-AAD جهت شناسایی سلول‌های لوسمیک وارد شده به مرحله آپوپتوز در جمعیت هتروژن نمونه‌های به دست آمده از مغز استخوان بیماران، با استفاده از روش فلوسایتومتری ۳ رنگ، از نکات تکنیکی قابل توجه این تحقیق می‌باشد. از دیدگاه مشابه، می‌توان در مورد تغییرات بروز Fas در سلول‌های بدخیم این بیماران نیز سخن گفت. در مطالعات قبلی نقش این دارو در بروز مولکول Fas که یکی از گیرنده‌های کلاسیک سطح سلولی در القای آپوپتوز می‌باشد، به صورت ضد و نقیض گزارش شده است. در مقابل گزارش‌های عمده‌ای که نقشی برای Fas قایل نیستند[۱۱، ۱۲و ۱۳] و نیز گزارش‌های جدیدی که شرکت این گیرنده در القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را تحت تاثیر این دارو می‌دانند، وجود دارند.[۱۴] این یافته نمی‌تواند به تنهایی بیان کننده اتفاقاتی باشد که در محیط بدن صورت گرفته و بررسی بروز این مولکول در جمعیت سلول‌های نابالغ پرومیلوسیتی(CD۳۳) در محیط in vivo در جهت تایید نتایج فوق، ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به مطالب ذکر شده، در مطالعه حاضر همراه با بررسی آپوپتوز در جمعیت سلول‌های بدخیم نمونه مغز

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

استخوان بیمارانی که تحت درمان با تری‌اکسید ارسنیک بودند، تغییر بروز این مولکول نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه ۳ بیمار از بین بیماران مبتلا به APL که به تازگی شناخته شده بودند و با روش RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction) از نظر جابه‌جایی کروموزومی t(۱۵؛۱۷) تایید شده و تحت درمان قبلی با ارسنیک قرار نگرفته بودند، با داشتن آگاهی کامل از مطالعه، مورد بررسی(Case series) قرار گرفتند. نمونه آسپیره شده از مغز استخوان بیماران از شروع درمان به مدت ۳۰ روز و در ۳ نوبت در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد و پس از تهیه اسمیر جهت مطالعه میکروسکوپی، با روش رایت ـ گیمسا رنگ‌آمیزی گردید و سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از روش فایکول جداسازی شدند. بررسی آپوپتوزیس در جمعیت هتروژن نمونه‌های مغز استخوان طبق روش قبلی[۱۵] و براساس خاصیت اتصال Annexin V کونژوگه با فلوروکروم به فسفاتیدیل سرین سطح سلول‌های آپوپتوتیک انجام شد و شناسایی جمعیت‌های اولیه و انتهایی آپوپتوتیک طبق مطالعات مشابه[۱۶و ۱۷] و براساس میزان جذب رنگ هسته صورت گرفت. به طور خلاصه می‌توان گفت فسفاتیدیل سرین که در حالت طبیعی همراه با فسفاتیدیل اتانول آمین به طور فعال توسط آنزیم Filipase در سمت داخلی غشا نگه داشته می‌شود، در مراحل ابتدایی آپوپتوز به سمت خارجی غشا حرکت می‌کند.[۱۸] پروتئین Annexin V در حضور کلسیم با میل ترکیبی بالایی توانایی اتصال به این فسفولیپید را داشته و می‌تواند به عنوان یک شاخص جهت شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک به کار رود. بدین ترتیب Annexin V کونژوگه با یک فلوروکروم در کنار رنگ ۷-AAD (۷-Amino Actinomycin D) که با نواحی C-G دو رشته DNA باند می‌شود، می‌تواند جهت افتراق آپوپتوز از نکروز یا مرحله انتهایی آپوپتوز مورد استفاده قرار گیرد.[۱۹، ۲۰و ۲۱] حساسیت این روش به دلیل افتراق سلول‌های آپوپتوتیک از نکروتیک، آسان‌تر بودن روش آن نسبت به روش‌هایی مانند ارزیابی فعالیت کاسپازها و بررسی پتانسیل غشای میتوکندری، شناسایی این پدیده در مراحل ابتدایی آن نسبت به روش‌هایی مانند DNA Ladder و TUNEL(Terminal oxynucleotide teransferase dUTP Nick End Labeling) و بررسی آن در in vivo به صورت تزریق عروقی Annexin کونژوگه با Biothine در مدل‌های حیوانی، از مزایای این روش بوده و موجب شده است تا امروز به عنوان یکی از بهترین روش‌های ارزیابی آپوپتوز به کار رود.[۲۲] برای انکوباسیون سلول‌ها با آنتی‌بادی و Annexin در ۲ پانل جداگانه مربوط به بررسی آپوپتوز و Fas، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و ایزوتیپ کنترل آن‌ها از شرکت DAKO، Annexin V از شرکت IQ product، رنگ‌آمیزی ۷-AAD از شرکت ICN و مواد لازم جهت ساخت بافر کلسیم از شرکت Merck صورت گرفت:

- پانل آپوپتوز: جهت بررسی آپوپتوز در جمعیت سلول‌های بدخیم و افتراق مراحل ابتدایی و انتهایی آن با روش فلوسایتومتری ۳ رنگ، ۵۰ میکرولیتر از FITC-CD۳۳ با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی در مقابل ایزوتیپ کنترل IgG1-FITC مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ و تاریکی انکوبه گردید. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ٤۰۰G و تعویض محلول رویی با بافر کلسیم که شامل کلرور کلسیم، کلرور سدیم، بافر HEPES و آب مقطر با PH برابر ۷/٤ بود، رسوب سلولی در این بافر حل شد و انکوباسیون روی یخ و در تاریکی به مدت ۲۰ دقیقه با Annexin V-PE ادامه یافت. در پایان با استفاده از محلول ۷-AAD با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر کلسیم، انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ای پایان یافته و نمونه بلافاصله به دستگاه داده شد.

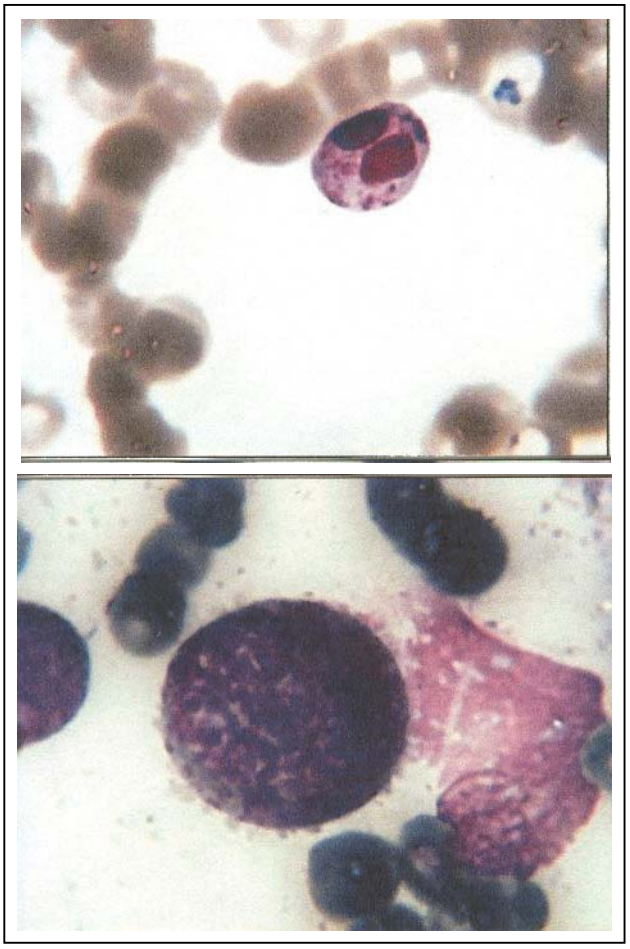
ـ پانل Fas: جهت بررسی بروز Fas(CD۹۵) در جمعیت سلول‌های $CD۳۳^{+}$ با روش فلوسایتومتری ۲ رنگ، مخلوطی از آنتی‌بادی‌های CD۹۵-PE و CD۳۳-FITC و نیز IgG1-FITC/IgG1-PE به عنوان ایزوتیپ کنترل منفی آن‌ها به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر یک با ۱۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

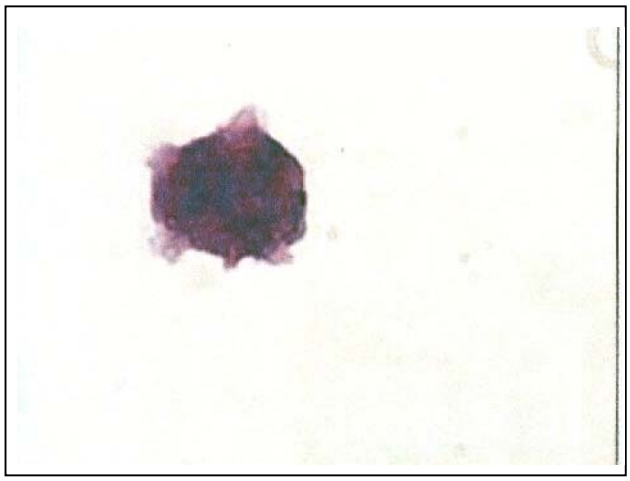
سوسپانسیون سلولی جدا شده با روش فایکول با شمارش ۴۰۰۰ در میکرولیتر مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ و در تاریکی انکوبه گردید.

نتایج

مطالعه میکروسکوپی نمونه‌های مغز استخوان، یک روند بلوغ در سلول‌های پرومیلوسیتی را نشان داد به طوری که پس از ۲۰-۱۵ روز میزان پرومیلوسیت‌ها به طور قابل توجه‌ای کاهش و سلول‌های بالغ مانند میلوسیت، متامیلوسیت و باند به طور چشم‌گیری افزایش یافته بود. سلول‌های آپوپتوتیک نیز در مطالعه میکروسکوپی اسلایدهای خون محیطی، مغز استخوان و نمونه‌های جدا شده با فایکول به خوبی شناسایی شدند.(تصویر شماره ۱- الف، ب و ج).



تصویر شماره ۱: مشاهده سلول‌های آپوپتوتیک **الف:** در نمونه خون محیطی، **ب:** در نمونه مغز استخوان



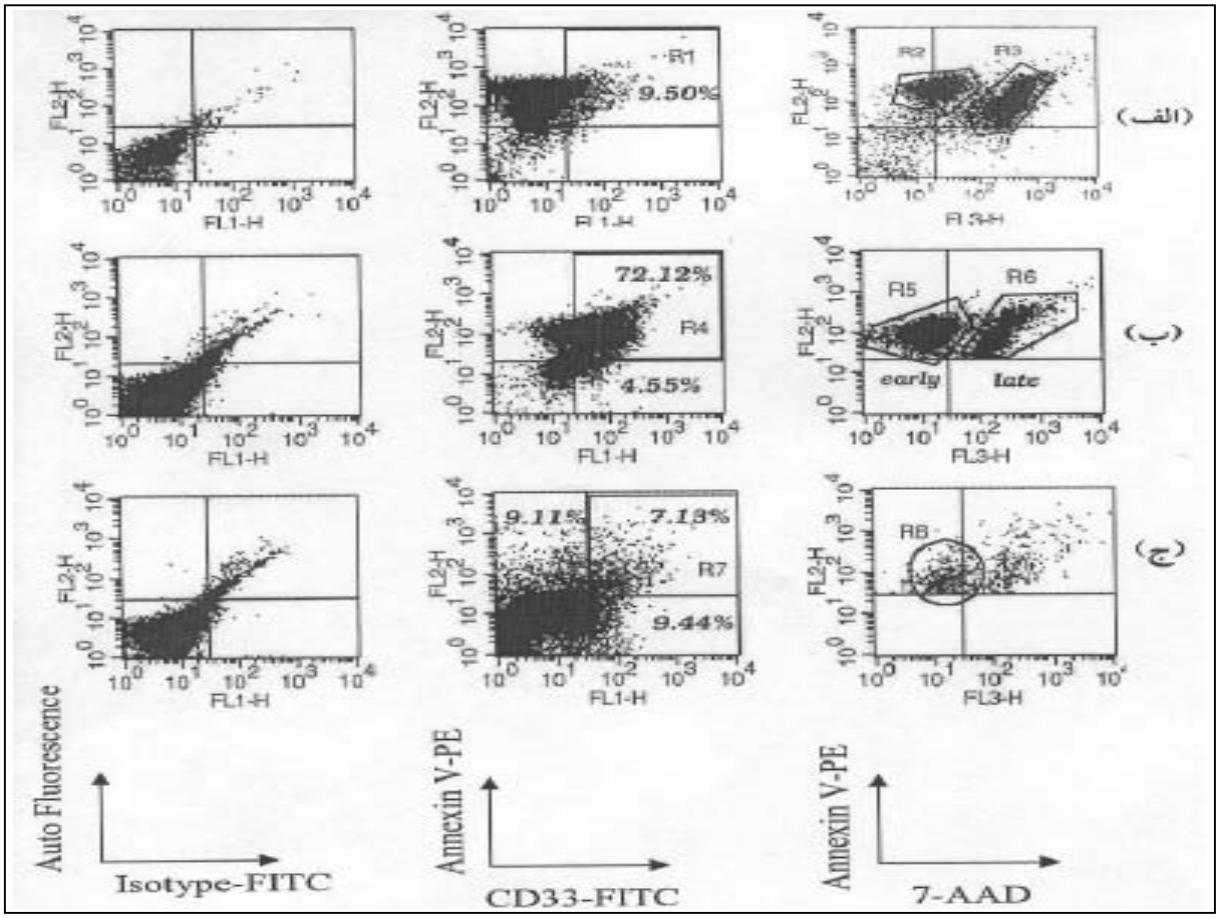
تصویر شماره ۱-ج: مشاهده سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه مغز استخوان جدا شده با فایکول

در مطالعه فلوسایتومتری جهت محاسبه درصد آپوپتوز، ابتدا در پانل FL۱-FL۲ سلول‌های dual positive که نماینده سلول‌های بدخیم وارد شده به فاز آپوپتوز بودند انتخاب شدند(gatting) ودر پانل FL۲-FL۳ جهت تفکیک مراحل ابتدایی و انتهایی آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفتند.

اگر چه جمعیت اولیه آپوپتوز در تعدادی از نمونه‌ها به داخل ناحیه انتهایی آپوپتوزیس وارد شده بود، برحسب نوع مطالعه انجام شده در محیط In vivo و نیز مدت زمان عبور سلول از مرحله ابتدایی($Annexin^{+}$-$7AAD^{-}$) به مرحله انتهایی($Annexin^{+}$-$7AAD^{+}$) آپوپتوز که تنها در عرض ۱ ساعت می‌تواند صورت گیرد و حتی کل روند آپوپتوزیس از یک میتوز هم سریع‌تر رخ دهد، اولین جمعیت، سلول‌های وارد شده به فاز آپوپتوز در مراحل اولیه به اختصار اولیه(early) و جمعیت دوم که از نظر شدت فلورسانس 7AAD بیش‌تر بود، سلول‌های وارد شده به فاز آپوپتوز در مراحل انتهایی آن(late) نامیده شد(تصویر شماره ۲).

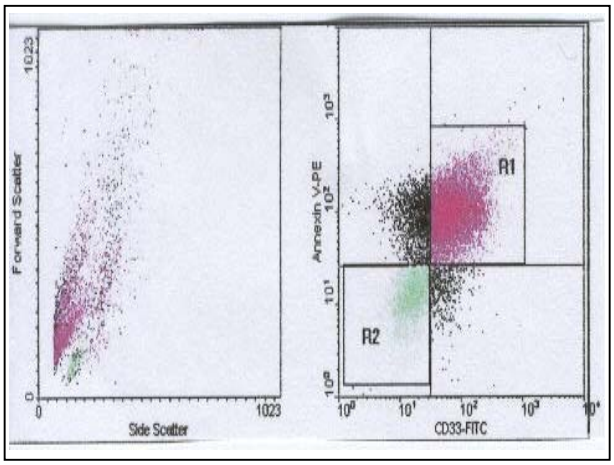
نتایج به دست آمده از مجموع درصد سلول‌های اولیه و انتهایی آپوپتوزیس در بیماران، وقوع آپوپتوزیس بالا در اوایل و اواسط درمان را نشان داد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]



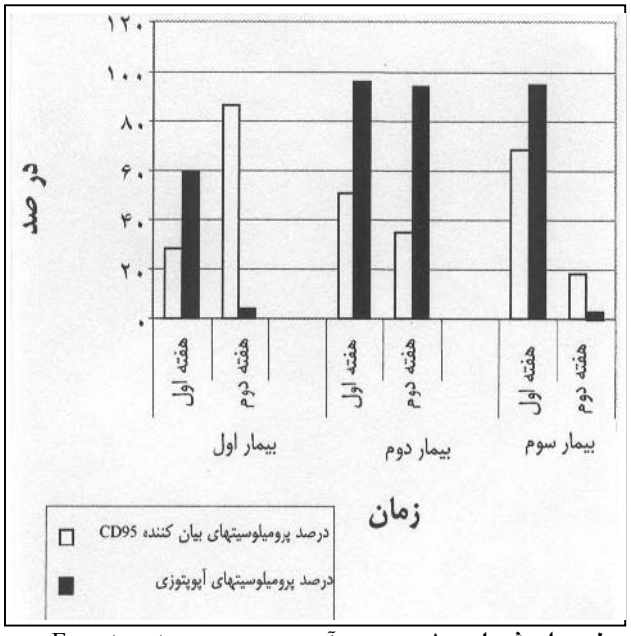
تصویر شماره ۲- شیوه انتخاب جمعیت سلول‌های بدخیم وارد شده به فاز آپوپتوز در نمونه‌های متوالی مغز استخوان در ابتدای درمان(الف)، وسط درمان(ب)، آخر درمان(ج) و شناسایی ۲ جمعیت ابتدا و انتهای آپوپتوز به طور عمده در اوایل درمان. ستون چپ نشان دهنده ایزوتیپ کنترل آنتی‌بادی است.

القای انتخابی آپوپتوزیس با انتخاب(gatting) ۲ جمعیت $CD۳۳^{+}$-$Annexin^{+}$ و $CD۳۳^{-}$-$Annexin^{-}$ و شناسایی جمعیت‌های مربوطه در نمودار نقطه‌ای(Dot Plot) آن مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود القای آپوپتوزیس در جمعیت بدخیم و نه در جمعیت لنفوسیتی سلول‌های مغز به خوبی اثر انتخابی این دارو را روی سلول‌های بدخیم نشان می‌دهد. در پانل Fas نیز درصد سلول‌های Dual positive که نماینده سلول‌های CD۳۳+ و CD۹۵+ هستند، محاسبه شد و با روند آپوپتوزیس مورد مطالعه قرار گرفت. در ۲ بیمار تغییرات بیان Fas در جمعیت سلول‌های بدخیم، همگام با تغییرات آپوپتوزیس هماهنگی داشت و تنها در یکی از بیماران این تغییرات هماهنگ با تغییرات آپوپتوزیس نبود(نمودار شماره ۱).



تصویر شماره ۳- اثر انتخابی ارسنیک در القای آپوپتوزیس. انتخاب ۲ جمعیت آپوپتوتیک و غیرآپوپتوتیک در نمودار الف و شناسایی آن‌ها با تعریف ۲ ناحیه ذکر شده در نمودار Dot plot همان نمونه. در نمودار ب. ارسنیک به طور انتخابی سلول‌های بدخیم را وارد فاز آپوپتوز کرده و اثری بر سلول‌های دیگر نداشته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]



نمودار شماره ۱- بررسی آپوپتوزیس و تغییرات بیان Fas در بیماران مورد مطالعه در هفته‌های اول و دوم

بحث

الگوی آپوپتوز القایی توسط ارسنیک در بیماران APL، در مطالعات قبلی وجود نداشت و از آن جا که نقش آن در القای آپوپتوز In vivo مشکوک به یک نتیجه کاذب in vitro بوده و تنها نقش القای تمایز برای آن مطرح شده است[۲۳]، بررسی القای آپوپتوز In vivo ارسنیک ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر شرایط متغیر و متفاوت هر سیستم In vivo، بررسی آپوپتوز در این سیستم را به مطالعه‌ای پیچیده تبدیل کرده است. تزریق Annexin V کونژوگه با Biothine به موش و شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک با streptavidine کونژوگه با فلوروکروم[۲۴] و تزریق Annexin V کونژوگه با مواد رادیواکتیو و ردیابی آن‌ها در بدن موش[۲۵] از جمله مطالعات In vivo آپوپتوز هستند که قابل اجرا در انسان نمی‌باشند.

مشاهده سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی و نیز شناسایی مراحل ابتدایی و انتهایی آپوپتوزیس با روش حساس Annexin V و AAD-۷ در نمونه‌های مغز استخوان بیماران نشان دهنده نقش قطعی ATO در القای آپوپتوزیس می‌باشد.

روند بالای آپوپتوزیس در اوایل درمان، زمانی که درصد سلول‌های بدخیم افزایش می‌یابد و شناسایی آپوپتوز واضح در جمعیت سلول‌های بدخیم (نه جمعیت لنفوسیتی)، به طور مناسبی مطالعات In vitro اثر انتخابی ارسنیک در القای آپوپتوزیس[۲۵] را تایید می‌کند. کاهش سطح گلوتاتیون احیا به دلیل کاهش سطح آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سلول‌های پرومیلوسیت نسبت به سایر سلول‌ها[۲۶] و روند بالای تکثیر سلولی در سلول‌های پرومیلوسیتی نسبت به میلوسیت‌ها و سلول‌های طبیعی[۲۷] از دلایل احتمالی اثر انتخابی ارسنیک بر این سلول‌ها می‌باشد. ذکر این نکته لازم است که این مطلب به معنای رد اثرات نامطلوب ATO بر سلول‌های بنیادی خون‌ساز نبوده و خود نیاز به مطالعه دیگری دارد.

به طور کلی آپوپتوز براساس محرک یا القا کننده آن، از مسیرهای مختلفی به وقوع می‌پیوندد. امروزه ۲ مسیر اصلی القای آپوپتوز شناسایی شده است که یکی از آن‌ها با فعال کردن گیرنده‌های مرگ Fas و TNFR شروع شده و موجب فراخوانی مولکول کمکی FADD می‌شود که به دنبال آن FADD نیز همراه با فراخوانی پروکاسپاز ۸، آن را در محل کمپلکس گیرنده به کاسپاز ۸ فعال تجزیه می‌کند. مسیر دیگری که توسط طیف وسیعی از محرک‌ها می‌تواند القا شود و با درگیری میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم C در سیتوپلاسم همراه باشد، پدیده‌ای است که توسط اعضای خانواده Bcl۲ کنترل می‌شود.

سیتوکروم C رها شده از میتوکندری به دنبال اتصال با Apaf-۱، سبب فعال شدن پروکاسپاز ۹ می‌شود و کاسپازهای فعال ۸ و ۹ با انتقال پیام به کاسپازهای موثری مانند کاسپازهای ۳ و ۶ و ۷ آن‌ها را فعال می‌کنند.

مکانیسم مولکولی آپوپتوز القایی ارسنیک هم‌چنان مورد بحث است. ارسنیک در زمان کوتاهی موجب کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم C به سیتوپلاسم می‌شود و بدین ترتیب از طریق مکانیسم دوم سبب القای آپوپتوز می‌گردد. از آن جا که افزایش سطح کاسپازهای فعال ۸ و ۳ در اثر آپوپتوز القایی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

با ارسنیک نشان داده شده و مسیر Fas یکی از مسیرهای فعال شدن کاسپاز ۸ می‌باشد. این مسئله قابل پیش‌بینی است که این دارو از این مسیر سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در این سلول‌ها گردد در حالی که بروز کاسپاز ۸ فعال از طریق مسیر Fas الزامی نبوده و مکانیسم‌های پیچیده دیگری مانند اتصال همزمان TNFR-ICD۳۰(Tumor Necrosis Factor Receptor Type) با لیگاندهای مربوطه، شیمی درمانی و پرتوتابی نیز می‌توانند سبب فعال شدن آن گردند.[۱۱و ۱۲] از سوی دیگر نتایج بالینی متفاوت حاصل از پاسخ به درمان این بیماران نیز نشان دهنده ماهیت هتروژن این بیماری است به طوری که بعضی از بیماران همراه با دادن پاسخ مناسب به درمان، به پس‌رفت کامل رفته و در مقابل تعدادی هم دچار عوارض جانبی مرگ‌بار می‌شوند که خود می‌تواند توجیهی برای بیان تفاوت Fas در این بیماران باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که Fas در القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط ATO با الگوی متفاوتی شرکت می‌کند بنابراین با ارزیابی تغییرات سطح mRNA سلولی یا بررسی ژنومیک بیان این گیرنده همراه با مولکول‌های موثر دیگری مانند FADD با روش‌هایی مانند Micro array، شاید بتوان چگونگی نقش این گیرنده در آپوپتوزیس القایی ارسنیک را شناسایی کرد.

به طور خلاصه براساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت که ارسنیک تری‌اکسید به صورت انتخابی در سلول‌های بدخیم بیماران APL سبب القای آپوپتوز می‌شود اما شرایط فیزوپاتولوژیک، فارماکوکینتیک و فارماکوژنتیک اختصاصی مربوط به هر بیمار و ماهیت هتروژنسیتی این بیماری، تصویر متفاوتی از دخالت گیرنده Fas در القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را نشان می‌دهد که شناسایی آن نیازمند مطالعات وسیع‌تری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت تامین بودجه، دانشگاه تربیت مدرس و سرکار خانم حیات کارشناس مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت همکاری در انجام شدن فلوسایتومتری تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- Zhu Chen, Zhen YI wang, Sj Chen. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. Pharmacol. Ther 1997; 76: 141-9.

2- Slack JL, Waxman S, Tricot G, Tallman MS, Bloomfield CD.Advances in the management of acute promyelocytic leukemia and other hematologic malignancies with arsenic trioxide. Oncologist 2002; Suppl 1: 1-13.

3- Waxman S, Anderson KC. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. Oncologist 2001; Suppl 2: 3-10.

4- Antman KH. Introduction: The history of Arsenic cancer therapy. Oncologist 2001; 6: 1-2.

5- Cohen MH, Hirschfeld S, Flamm Honig S, Ibrahim A, Johnson JR, O'Leary JJ, et al. Drug approval summaries: arsenic trioxide, tamoxifen citrate, anastrazole, paclitaxel, bexarotene. Oncologist 2001; 6(1): 4-11.

6- Zhen Yi, Zhu C. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukemia. The lancet oncology 2000; 1: 101-6.

7- Kitamura K, Yoshida H, Ohno R, Naoe T. Toxic effects of arsenic(As3+) and other metal ions on acute promyelocytic leukemia cells. Int J Hematol 1997; 65(2): 179-85.

8- Guo-Qiang C, Xue-Geng S, Wei T, Shu-Min X, Jun Zu, Xun C, et al. Use of Arsenic trioxide(As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia(APL): I. As2O3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. Blood 1997; 89: 3345-53.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

9- Maurizio G, Marcel HM, Mounira K, Chelbi A, Gerard B, Michel L, et al. Combined Arsenic and retinoic adic treatment enhances differentiation and apoptosis in Arsenic-resistant NB4 cells. Blood 1998; 91: 4300-10.

10- Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN. Arsenic induces apoptosis of multidrug resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-xL. Blood 2000; 95(3): 1014-1022.

11- Kitamura K, Minami Y, Yamamoto K, Akao Y, Kiyoi H, Saito H, et al. Involvement of CD95-independent caspase 8 activation in arsenic trioxide-induced apoptosis. Leukemia 2000; 14(10): 1743-50.

12- Miller WH Jr. Molecular targets of Arsenic trioxide in malignant cells. Oncologist 2002; 7 (Suppl 1): 14-9.

13- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of Arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood 1996; 88(3): 1052-61.

14- Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S. Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system. Oncol Rep 2003; 10(3): 705-9.

15- Herault O, Colombat P, Domenech J, Degenne M, Bremond JL, Sensebe L, et al. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. Br J Haematol 1999; 104(3): 530-7.

16- Lecoeur H, De Oliveira Pinto LM, Gougeon ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. J Immunol Methods 2002; 265: 81-96.

17- Economides A, Schmid I, Anisman posner DJ, Plaeger S, Bryson YJ, Uittenbogaart CH. Apoptosis in cord blood T lymphocytes from infants of human immunodeficiency virus infected mothers. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5(2): 230-4.

18- Martin SJ, Reutelingsperger CP, Mc Gahon AJ, Rader JA, Van Schie RC, Laface DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Ab1. J Exp Med 1995; 182(5): 1545-56.

19- Schwartz LM, Ashwel JD. Methods in cell biology. Apoptosis. 1st ed. CA USA; Academic pess; 2001. P. 20-187.

20- Vermes I, Haanen C, Reutelinsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods 2000; 21, 243(1-2): 167-90.

21- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 1992; 148(7): 2207-16.

22- Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry 1998; 31(1): 1-9.

23- Zhu J, Lallemand Breitenbach V, de The H. Pathways of retinoic acid or Arsenic trioxide-induced PML/RAR alpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. Oncogene 2001; 20(49): 7257-65.

24- Blankenberg FG, Katsikis P, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, et al. In vivo detection and imaging of phsphatidylserine

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

expression during programmed cell death. Proc. Nact. Acad. Sci. USA 1998; 95: 6349-54.

25- Yongkui Jing,. Jie Dai, Ruth ME, Chalmers redman, William G. Tatton, Samuel Waxman. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide dependent pathway. Blood 1999; 94: 2102-11.

26- Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of Arsenic trioxide. Cancer Res 2002; 62(14): 3893-903.

27- Halicka HD, Smolewski P, Darzynkiewicz Z, Dai W, Traganos F. Arsenic trioxide arrests cells early in mitosis leading to apoptosis. Cell Cycle 2002; 1(3): 201-9.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

Evaluation of Apoptosis Induced by Arsenic Trioxide Through Fas Pathway in Acute Promyelocytic Leukemia Patients with t(15,17) Translocation

***A.R. Arjmand, MSc** [I] **F. Zaker, Ph.D.** [II] **K. Alimoghadam, MD** [III]
A. Ghavamzadeh, MD [IV] **L. Moezzi, MSc** [V]

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a sub-type of acute myelogenous leukemia (AML) which occurs in about 10-15% of patients with AML. Approximately 20-30% of these patients, who are treated with the current standard All trans retinoic Acid(ATRA) and anthracyclines-based chemotherapy regimen, suffer relapse in less than a year. Arsenic trioxide (ATO), as a single agent, can induce complete remission even in refractory and relapsed patients with few adverse effects. Studies conducted by investigators to elucidate the mechanisms of action underlying these clinical responses have shown that Arsenic apparently affects numerous intracellular signal transduction pathways and causes many alterations in cellular function among which differentiation induction with low dose and apoptosis induction with high dose are the most prominent mechanisms. Despite previous in vitro studies, which mostly revealed that Fas/Apo 1 expression is unchanged during ATO treatment, in vivo expression of this classical receptor for apoptosis induction has not been evaluated yet. In order to study the apoptotic pattern in leukemic cells of these patients, a single-laser triple-color flowcytometric method was conducted by Annexin V and 7AAD technique, to detect leukemic apoptotic cells in a heterogeneous population of bone marrow samples. Fas/Apo 1 expression was also evaluated in promyelocyte population cells in a dual color panel. A substantial apoptosis was selectively detected in promyelocytic cells during the first and the second weeks following treatment and the concurrent Fas expression indicated its involvement in apoptosis induced by arsenic trioxide.

Key Words: 1) Acute Promyelocytic Leukemia 2) Arsenic Trioxide 3) Apoptosis 4) Fas/Apo 1 5) Flowcytometry

---

This article is a summary of the thesis by A.R. Arjmand for MSc degree in Hematology under supervision of F. Zaker, Ph.D. and consultation with K. Alimoghadam, MD(2003). This article was also pesented in the International Congress of Genetic of Cancer in Tehran(2003). This study was also conducted under financial support of Tehran University of Medical Sciences.(No.230/1087)
I) *MSc in Hematology. Hematology Oncology & BMT Research Center. Shariati Hospital, Jalale-Al-e-Ahmad Highway, Tehran University of Medical Sciences and Health Services.Tehran, Iran (*Corresponding Author)*
II) *Assistant Professor of Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services.Tehran, Iran.*
III) *Assistant Professor of Hematology & Oncology. Tehran University of Medical Sciences and Health Services.Tehran, Iran.*
IV) *Professor of Hematology & Oncology. Tehran University of Medical Sciences and Health Services.Tehran, Iran.*
V) *MSc in Hematology. Tehran University of Medical Sciences and Health Services.Tehran, Iran.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]