Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Increased survival rate in acute lymphoblastic leukemia treated with methotrexate by DR5 and Caspase-8 in hyperglycemic conditions

Kosar Kiafar[1], Mahtab Sayadi[1], Forouzan Karam[1], Behzad Mesbahzadeh[2]*

ABSTRACT

Background and Aims: Considering the drug resistance of chemotherapy in diabetic patients and the prevalence of acute lymphoblastic leukemia in them, the present study aimed to investigate the effect of hyperglucose condition on the expression of DR5 and Caspase-8 genes in lymphoblastic cells (NALM-6) and its relationship to the cells' response to methotrexate.

Materials and Methods: In this in vitro study, NALM-6 cells were cultured in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) containing antibiotics across four control groups: cells in the control group (C), cells treated with methotrexate (C+M), cells treated in an environment with high glucose concentration (G), and cells treated in an environment with high glucose concentration and methotrexate (G+M). The treated cells were subjected to hyperglucose conditions for 10 days in an environment with high glucose concentration. The survival rate of methotrexate-treated cells was evaluated by the MTT method, and then the relative expression of DR5 and Caspase-8 genes was measured by the RT-qPCR method. The statistical significance was defined as a P-value less than 0.05.

Results: The M group had 50% survival compared to the control group, and the G+M group had 58% survival compared to the control group. The expression of the DR5 gene in the group G+M compared to the G group was not significantly different ($P>0.05$); however, the expression of the caspase-8 gene in the G group was significantly lower compared to the control group ($P<0.01$) and also lower in the G group compared to the treated cells ($P<0.001$).

Conclusion: The findings indicated that the survival rate of NALM-6 cells in high concentrations of glucose after treatment with methotrexate was higher than the same condition in the control group, which indicates the effect of glucose resistance on drug treatment.

Citation: Kiafar K, Sayadi M, Karam F, Mesbahzadeh B. [Increased survival rate in acute lymphoblastic leukemia treated with methotrexate by DR5 and Caspase-8 in hyperglycemic conditions]. J Birjand Univ Med Sci. 2024; 31(3): 195-204. [Persian]

DOI 10.61186/JBUMS.31.3.195

Received: September 13, 2024 **Accepted:** November 30, 2024

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, Caspase-8, Diabetes, DR5, Methotrexate

[1] Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[2] Cardiovascular Diseases Research Center, Department of Physiology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Cardiovascular Diseases Research Center, Department of Physiology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
Tel: +989151635018 E-mail: mesbahmoeen@yahoo.com

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

مقاله اصیل پژوهشی

افزایش زنده‌مانی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد تحت درمان با متوترکسات به‌واسطه DR5 و کاسپاز–۸ در شرایط هیپرگلیسمی

کوثر کیافر[۱]، مهتاب صیادی[۱]، فروزان کرم[۱]، بهزاد مصباح زاده[۲*]

چکیده

زمینه و هدف: نظر به مقاومت دارویی شیمی درمانی در مبتلایان به دیابت و شیوع بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد در آن‌ها، هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر هیپرگلوکز بر بیان ژن های DR5 و Caspase-8 در سلول‌های لنفوبلاستیک (NALM-6) و ارتباط آن به پاسخ سلول‌ها نسبت به متوترکسات است.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی ابتدا سلول‌های NALM-6 در چهار گروه کنترل (C)، سلول‌های تیمار شده با متوترکسات (C+M)، سلول‌های تیمار شده در محیط با غلظت گلوکز بالا (G)، سلول‌های تیمارشده در محیط با غلظت گلوکز بالا و متوترکسات (G+M) در محیط RPMI 1640 و FBS 10% حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. میزان حیات سلول‌های تیمار شده با متوترکسات، به روش MTT بررسی و سپس با روش RT- qPCR بیان نسبی ژن‌های DR5 وCaspase-8 اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: گروه M درمقایسه با گروه C ۵۰٪ زنده‌مانی و گروه G+M در مقایسه با گروه کنترل ۵۸٪ زنده‌مانی داشتند. بیان ژنDR5 در گروه G+M در مقایسه با گروه G تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، اما بیان ژن کاسپاز–۸ درگروه G با گروه کنترل (P<۰/۰۱) و در گروه G در مقایسه با گروه سلول‌های تیمارشده (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد میزان زنده‌مانی سلول‌های (NALM-6) در غلظت بالای گلوکز بعد از تیمار با متوترکسات، بیش از حالت مشابه در گروه کنترل بوده که بیانگر اثر مقاومت‌زایی گلوکز بر درمان با دارو است.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Caspase-8، دیابت، DR5، متوترکسات

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۳؛ ۳۱ (۳): ۲۰۴-۱۹۵.

دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۳؟ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰

[۱] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند– دانشگاه علوم پزشکی بیرجند– دانشکده پیراپزشکی– گروه فیزیولوژی پزشکی

تلفن: ۰۹۱۵۱۶۳۵۰۱۸ پست الکترونیکی: mesbahmoeen@yahoo.com

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL[1]) یکی از شایع‌ترین سرطان‌های کودکان است. سالانه در ایالات متحده ۳۰۰۰ الی ۴۰۰۰ مورد جدید ثبت می‌گردد که دو سوم آن را کودکان تشکیل می‌دهند (۱). این لوسمی تقریباً ۲۵٪ سرطان‌های اطفال و نوجوانان را تشکیل می‌دهد و انواع مختلف دارند. ALL یکی از انواع این لوسمی ها می‌باشد که سرعت تکثیر در این سرطان بسیار بالاست و با اختلال تمایز، تکثیر و تجمع سلول‌های پیش‌ساز لنفوئیدی در مغز استخوان و قسمت‌های خارج از مغز استخوان شناخته می‌شود (۲). هنگامی که این بیماری ایجاد می‌گردد، سلول‌های نابالغ، بالغ نمی‌شوند. همین سلول‌های نابالغ جایگزین سلول‌های نرمال شده و از طریق جریان خون به اعضا و بافت‌های مختلف بدن مانند مغز، کبد، غدد لنفاوی و بیضه‌ها انتقال می‌یابند. اما حدود ۸٪ از بیماران ALL فاقد سلول‌های بلاست لوکمیک در گردش خون محیطی خود هستند (۳).

متوترکسات (MTX[2]) یکی از اولین داروهای شیمی درمانی سرطان می‌باشد و به‌طور گسترده در درمان سرطان خون و انواع تومورهای دیگر استفاده می‌شود. اثربخشی این دارو ناشی از جذب آسان آن توسط سلول‌ها، پلی‌گلوتامیلاسیون سریع و مهار آنزیم دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR[3]) می‌باشد که آنزیم کلیدی در تکثیر سلولی است. MTX عمدتاً توسط یک سیستم حمل و نقل فعال با واسطه حامل که بستر اصلی آن ۵-متیل تتراهیدروفولات است، وارد سلول‌ها می‌شود و گلوتامات‌های اضافی را به موقعیت گامای (γ) قسمت گلوتامات اضافه می‌کند (۴).

گلوکز با تضعیف سیستم ایمنی بدن باعث بروز برخی از سرطان‌ها مانند سرطان‌های پستان، روده و پروستات می‌شود. نکته مهم اینکه بعضی مواقع دیابت می‌تواند باعث بروز بیماری‌های اتوایمیون در بیماران دیابتی شود (۵).

لیگاند TRAIL یا عامل نکروز تومور (TNF)[4] مربوط به القای آپوپتوز، عضوی از خانواده پروتئین‌های TNF است که بهترین عملکرد مشخص شده آن القای آپوپتوز در سلول‌های توموری، آلوده یا تبدیل‌شده از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های خاص است. گیرنده مرگ ۵ (DR5[5]) که با نام‌های گیرنده TRAIL 2 (TRAILR2) و گیرنده فاکتور نکروز تومور عضو فوق‌خانواده B (TNFRSF10B)۱۰ نیز شناخته می‌شود، یک گیرنده سطح سلولی از ابرخانواده گیرنده TNF است که به TRAIL متصل شده و آپوپتوز را میانجی‌گری می‌کند. پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن عضوی از ابرخانواده گیرنده‌های TNF است و دارای دامنه مرگ درون سلولی است. این گیرنده می‌تواند توسط لیگاند القاکننده آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز تومور (TNFSF10/TRAIL/APO-2L) فعال شود و سیگنال آپوپتوز را انتقال دهد. موش‌ها دارای یک ژن همولوگ به نام tnfrsf10b هستند که روشن شدن عملکرد این ژن در انسان ضروری است. بیان بیش از حد گیرنده کموکاین CXCR4 در تومورهای جامد به شدت با پیش آگهی ضعیف و پیامد بالینی نامطلوب مرتبط است (۶).

کاسپاز ۸ (Caspase 8) یک پروتئین (آنزیم) است که توسط ژن «CASP8» کُد می‌شود. کاسپاز ۸ یکی از اعضای خانواده پروتئازهای سیستئین–اسید آسپارتیک است و در فرایند آپوپتوز نقش دارد. فعال‌سازی کاسپاز ۸ با واسطه DR5 می‌تواند منجر به برش و فعال‌سازی پروتئین BH3، BID شود و در نتیجه آپوپتوز با واسطه BAX/BAK را آغاز کند (۷). این مسیر گیرنده مرگ زمانی آغاز می‌شود که لیگاندهای مرگ، از جمله FasL و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)، به DR5 موجود در سطح سلول هدف متصل شوند. علاوه براین، کاهش بیان کاسپاز ۸، توسط متیلاسیون DNA و همچنین از طریق حذف ژن، منجر به مقاومت به آپوپتوز ناشی از داروهای شیمی درمانی می‌شود. بر اساس این نتایج ممکن است این فرضیه مطرح شود که این مسیر سیگنالینگ گیرنده مرگ در مقاومت به شیمی درمانی نقش دارد (۸). تغییر فعالیت مسیر فوق در شرایط افزایش گلوکز نشان می‌دهد مسیر ترجیحی القای آپوپتوز در شرایط هیپرگلوکز، مسیر سیگنالینگ ذاتی آپوپتوز بوده است (۹). با توجه به

[1] Acute Lymphoblastic Leukemia
[2] Methotrexate
[3] Dihydrofolate reductase
[4] Tumor Necrosis Factor
[5] Death receptor 5

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

مقاومت دارویی به شیمی‌درمانی در بیماران مبتلا به دیابت و همچنین مطالعاتی که نشان داده است افزایش DR5 و کاسپاز-۸ موجب بروز مقاومت به داروی شیمی درمانی می‌شود، این مطالعه به بررسی اثر افزایش گلوکز بر بیان این ژن‌ها در سلول‌های رده لوسمی لنفوبلاستیک (NALM-6) پرداخته و ارتباط آن به پاسخ سلول‌ها نسبت به متوترکسات بررسی شده است.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی مطابق با مصوبه اخلاق در پژوهش به شماره IR.BUMS.REC.1401.260 در دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، مورد تصویب کمیته اخلاق قرار گرفت.

کشت سلولی

رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. باتوجه به دستورالعمل موجود، سلول‌های Nalm-6 در محیط کشت RPMI 1640(Gibco™,United States) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (FBS) (Gibco™,United States)، یک درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) رشد داده شدند. فلاسک حاوی سلول در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ حاوی ۵٪ گاز CO2 کشت داده شد. پس از گذشت تقریبا ۴۸ ساعت، زمانی که تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلول‌ها صورت گرفت.

ایجاد شرایط هیپرگلوکز

پودر گلوکز (Roche,Germany) با وزن مولکولی ۱۸۰/۱۵۶ مورد استفاده قرار گرفت. براساس مطالعات قبلی، استوک ۱۰۰mM گلوکز با وزن مولکولی ۱۸۰/۱۵۶ g/mol محلول در محیط کشت RPMI1640 تهیه و در دمای ۴درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲-۱۰). پس از رشد سلول‌ها به مقداری که ٪۸۰-۷۰ فلاسک پر شده باشد، نیمی از سلول‌ها به فلاسک دیگری منتقل گردید و به مدت ۱۰ روز تحت شرایط هیپرگلوکز قرار گرفت (۱۳). بدین‌صورت که یک روز در میان سلول‌ها پاساژ داده شد و در هر پاساژ مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول گلوکز ساخته شده به فلاسک سلولی اضافه گردید. سلول‌ها در شرایط نگه‌داری که در بالا ذکر شد نگهداری شد.

تعیین میزان حیات سلولی با روشMTT

پس از بازه زمانی ۱۰ روزه، سلول‌ها به چهار گروه تقسیم شد، گروه سلول‌های کنترل (C)، گروه سلول‌های تیمار شده با متوترکسات (C+M)، گروه سلول‌های تیمار شده در محیط با غلظت گلوکز بالا (G)، گروه سلول‌های تیمار شده در محیط با غلظت گلوکز بالا و متوترکسات (G+M)، تعداد ۱۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال یافت و با غلظت ۳۰۰ nM متوترکسات به هر دو گروه تیمار شده و ۱۰۰ میلی‌مولار گلوکز به گروه سلول‌های تیمار شده در محیط با غلظت گلوکز بالا اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از این مدت، با اضافه‌کردن معرف MTT(۲۰µl) با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک، انکوباسیون پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انجام شد. سپس بدون خارج کردن محلول رویی و با اضافه کردن ۱۰۰µl از DMSO به هر چاهک و اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در ۵۷۰nm و ۶۳۰nm با استفاده از دستگاه خوانش پلیت، میزان حیات سلول‌ها تعیین گردید.

جداسازی RNA و سنتزcDNA

استخراج RNA کل از سلول‌های تیمار شده و کنترل با استفاده از معرف استخراج RNAX plus (Sinaclon,Tehran,Iran) طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیت سنتز cDNA (Parstous,Mashhad,Iran) برای ساخت DNA مکمل (cDNA) استفاده شد.

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

بررسی بیان ژن با استفاده از RT-qPCR

پرایمرهای PCR برای ژن‌های DR5 و Caspase-8 و همچنین ژن خانه دار GAPDH به عنوان کنترل داخلی توسط شرکت بتا ژن گستر تهیه گردید. دستگاه ABI Real-time PCR برای اجرای RT-qPCR تحت شرایط زیر استفاده شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تا حداکثر ۴۰ سیکل (n=۳). به دنبال نرمال‌سازی GAPDH ژن کنترل داخلی و تغییرات کمی نسبی ژن‌های هدف با استفاده از $2^{-\Delta\Delta CT}$ مقادیر بیان mRNA محاسبه شد.

تجزیه وتحلیل آماری

برای نتایج زنده‌مانی سلول‌ها از نرم‌افزار Excel جهت رسم نمودارها و از تست‌های آماری one-way ANOVA و t-student test برای ارزیابی تفاوت‌ها بین گروه‌ها با نرم‌افزار Graphpad نسخه Prism ۷ استفاده شد. نتایج RT-qPCR پس از آنالیز در نرم‌افزارهای اختصاصی مانند Rest با انجام تست آماری t-test گزارش شد. سطح معنی‌داری آماری نیز به صورت مقدار P کمتر از ۰/۰۵ تعریف شد.

یافته‌ها

افزایش گلوکز در محیط موجب اثر مهاری بر اثرگذاری MTX می¬شود.

سلول‌های Nalm-6 پس از تکثیر و گذشت ۱۰ روز در محیط با غلظت بالای گلوکز (mM50) همراه با داروی متوترکسات با غلظت 14) (300 (nM تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه برای مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. غلظت استفاده شده IC50 یعنی غلظتی از دارو که ۵۰٪ رشد سلول را نسبت به کنترل متوقف می‌کند. در نتیجه اثر گلوکز در زنده‌مانی رده سلولی Nalm-6 در حضور غلظت تعیین‌شده متوترکسات با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، گروه سلول‌های بدون گلوکز تیمارشده با دارو در مقایسه با گروه کنترل ۵۰٪ زنده‌مانی و سلول‌های گروه هیپرگلوکزی تیمارشده با دارو در مقایسه با گروه کنترل ۵۸٪ زنده‌مانی را نشان دادند. در نتیجه زنده‌مانی سلول‌های گروه گلوکزی تیمارشده با دارو اندکی افزایش یافت.

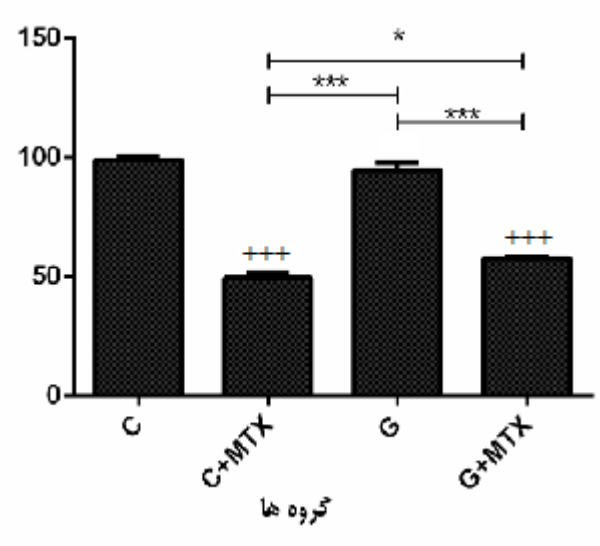
گلوکز بر بیان کمی ژن DR5 در رده سلولی Nalm-6 گیرنده MTX در مقایسه با گروه کنترل اثر ندارد.

بر اساس شکل ۲، بیان ژن DR5 در گروه هیپرگلوکز در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۱)؛ اما بیان این ژن در گروه سلول‌های گلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات در مقایسه با گروه هیپرگلوکز تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

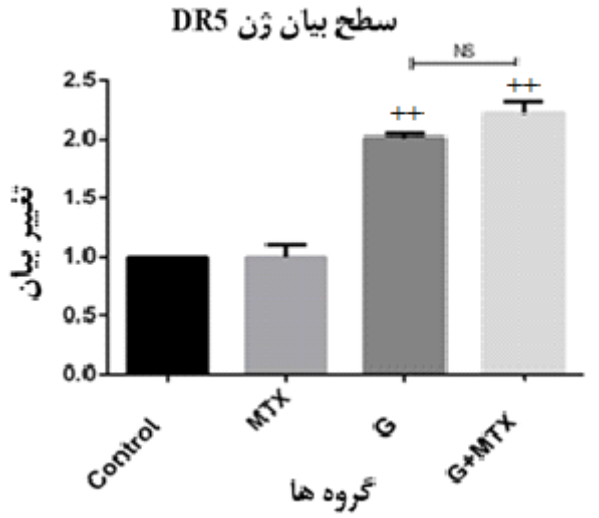
گلوکز بر بیان کمی ژن کاسپاز-۸ در رده سلولی Nalm-6 درمان شده با MTX در مقایسه با گروه کنترل اثر کاهشی دارد.

براساس شکل ۳، بیان ژن کاسپاز-۸ در گروه هیپرگلوکز در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۱). همچنین در گروه سلول‌های گلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات در مقایسه با گروه سلول‌های غیرگلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۰۱). همچنین بیان ژن کاسپاز-۸ در دو گروه هیپرگلوکز و گروه سلول‌های گلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

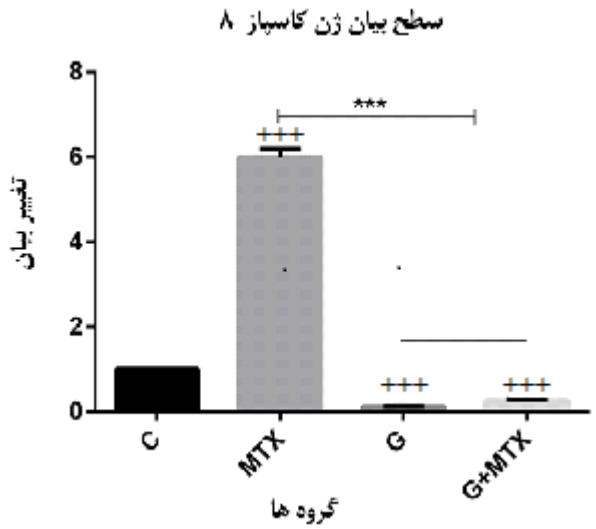
[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]



شکل ۱- نمودار زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 در شرایط هیپرگلوکز و شرایط غیرگلوکزی تحت تأثیر دوز IC50 داروی متوترکسات با روش MTT زنده‌مانی سلول‌های کنترل تیمارشده با داروی متوترکسات با دوز (۲۰ mg/mL) به مدت ٤٨ ساعت ۵۰٪ بود. زنده‌مانی سلول‌های گلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات با دوز IC50 به مدت ٤٨ ساعت ۵۸٪ بود. P<۰/۰۰۱ +++ در مقایسه با گروه کنترل.
P<۰/۰۵ *، P<۰/۰۰۱ *** مقایسه با گروه متوترکسات.



شکل ۲- نمودار مقدار بیان ژن DR5 در چهار گروه شامل گروه سلول‌های غیرگلوکزی (کنترل) (Control)، گروه سلول‌های غیرگلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات (MTX)، گروه سلول‌های گلوکزی (G) و گروه سلول‌های گلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات (G+MTX). P<۰/۰۰۱ ++ در مقایسه با گروه کنترل.



شکل۳- مقدار بیان ژن کاسپاز-۸ در چهار گروه شامل گروه سلول‌های غیرگلوکزی (کنترل) (C)، گروه سلول‌های غیرگلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات (MTX)، گروه سلول‌های گلوکزی (G) و گروه سلول‌های گلوکزی تیمارشده با داروی متوترکسات (G+MTX). P<۰/۰۰۱ +++ در مقایسه با گروه کنترل. P<۰/۰۰۱ *** مقایسه با گروه متوترکسات.

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

بحث

امروزه با وجود پیشرفت‌های درمان سرطان، شیمی درمانی یکی از بهترین گزینه‌های موجود است؛ به‌طوری‌که در حال حاضر ۹۰ درصد از شکست‌های این درمان مربوط به متاستاز سرطان‌های مرتبط با مقاومت دارویی است (۱۵). متابولیسم گلوکز در پیشبرد سرطان، پاسخ به درمان و ایجاد مقاومت درمانی نقش اساسی ایفا می‌کند (۱۶). ارتباط با سرطان‌های هماتولوژیک اخیراً نشان داده شده که دیابت با لنفوم غیرهوچکین[1] (NHL) و لوسمی مرتبط است (۱۷). طبق مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱، شیوع دیابت درALL ، AML[2]، NHL و مالتیپل میلوما[3] (MM) به ترتیب، ۱۹/۷٪، ۲۱/۳٪، ۱۲/۵٪ و ۱۲/۰۰٪ بود (۱۸). عوامل زیادی مسئول ارتباط دیابت با سرطان در نظر گرفته می‌شوند؛ شرایطی مانند هیپرانسولینمی، هیپرگلیسمی و التهاب در پیشرفت دیابت به سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۹). به نظر می‌رسد حتی بین میزان هیپرگلیسمی و درصد بقای بیماران به‌طور بالقوه همبستگی وجود دارد (۲۰). از تغییرات متابولیسم گلوکز در محیط توموری می‌توان به افزایش جذب گلوکز، گلیکولیز شدت یافته، کاهش فسفریلاسیون اکسیداتیو و تجمع لاکتات اشاره کرد (۲۱).

در این مطالعه اثر افزایش گلوکز بر زنده‌مانی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد در غلظت IC50 متوترکسات به عنوان داروی منتخب در درمان این بیماری بررسی گردید. نتایج به دست آمده نشان دهنده افزایش زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی NALM6 بود. در این راستا، Biernacka و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ با هدف بررسی میزان مقاومت به شیمی درمانی در سلول‌های سرطانی پروستات در شرایط هیپرگلوکز انجام دادند، گزارش کردند که گلوکز بالا موجب مهار آپوپتوز سلول‌های سرطانی پروستات در برابر رژیم دارویی دوستاکسل می‌شود که این امر ممکن است با افزایش بیان IGFBP2[4] مرتبط باشد، به‌طوری که پس از خاموش شدن IGFBP2 با RNA مداخله‌گر کوچک[5] (siRNA)، هیپرگلیسمی به سلول‌های توموری، مقاومت در برابر داروهای شیمی درمانی را القا نکرد (۲۲).

در مطالعه حاضر نیز اثر افزایش گلوکز بر سطح بیان ژن‌های DR5 و کاسپاز-۸ در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6) در پاسخ به داروی متوترکسات بررسی شد. در این مطالعه میزان زنده‌مانی سلول‌های NALM-6 در گروه سلول‌های بدون گلوکز تیمارشده با دارو کمتر از گروه سلولی در معرض هیپرگلوکز تیمار شده با دارو بود و این درحالی است که در مطالعه مروری سیستماتیک که توسط Slotervaart و همکاران باهدف بررسی تأثیر هیپرگلیسمی بر اثربخشی شیمی درمانی انجام شد، گزارش گردید که هیپرگلیسمی اثر ضدپرولیفراتیو شیمی درمانی را در آزمایشات پیش بالینی کاهش داده، اما نتایج به‌طورکلی متناقض هستند و نیاز به مطالعات بالینی گسترده‌تری وجود دارد (۲۳).

در مطالعات مختلف نشان داده شده است که شرایط دیابتی با افزایش بیان نسبی خانواده گیرنده‌های مرگ مانند DR5 همراه است (۲۴). در این مطالعه افزایش بیان DR5 با مرگ سلولی در هر دو گروه کنترل گلوکزی و گروه دارو و گلوکز در راستای افزایش آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی همراه بود که این کاهش در گروه گلوکز به تنهایی معنادار نبود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که علاوه بر بیان این گیرنده‌ها در شرایط هایپرگلوکز فاکتورهای دیگری نیز در تحریک مسیرهای القا مرگ دخیل باشند.

همچنین در مطالعه ما، در گروه هیپرگلوکز پس از درمان با متوترکسات، بیان ژن DR5 در مقایسه با قبل از درمان، تفاوت چشمگیری وجود نداشت. در همین راستا، در مطالعه‌ای توسط Viengthong و همکاران بر روی ۱۱ رده سلولی ALL انجام شد، نشان داده شد که در سلول‌های تحت تیمار با MTX، برخلاف تیمار با Adriamycin و Etoposide، سطح بیان ژن DR5 دستخوش تغییر نشده است (۲۵).

با توجه به موضوع بالا، به بررسی پروتئین کاسپاز ۸ پرداخته شد، در گروه هیپرگلوکز نسبت به گروه کنترل، بیان ژن کاسپاز-۸ به‌طور چشمگیری پایین‌تر بود و پس از تیمار با متوترکسات نیز بیان این ژن افزایش چشمگیری نداشت؛ درحالی که در گروه غیرگلوکزی

[1] Non-Hodgkin lymphoma
[2] Acute Myeloid Leukemia
[3] Multiple myeloma
[4] Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2
[5] short interfering RNA

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

تحت تیمار با متوترکسات به‌طور چشمگیری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود که این امر به نوعی نشان دهنده تأثیر سوء گلوکز بر اثرگذاری متوترکسات می‌باشد.

در مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۲۰۱۱ توسط Ehrhardt و همکاران برروی سلول‌های تومور اولیه از کودکان مبتلا به ALL انجام گرفت نیز مشخص شد در زیر گروه ALL اولیه یعنی سلول‌هایی با بیان کم کاسپاز-۸، متوترکسات (MTX) بیان این ژن را افزایش داد (۲۶).

در مطالعه ما در محیط هیپرگلوکزی نسبت به گروه کنترل غیرگلوکزی، میزان بالاتر بیان mRNA ژن کاسپاز-۸ مشاهده گردید، این درحالی است که در یک مطالعه آزمایشگاهی که توسط MISHRA و همکاران در مورد اثر هیپرگلیسمی بر فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز انجام شد، مشاهده شد که در سلول‌های مزانژیال انسان، گلوکز تأثیری در فعال‌سازی کاسپاز-۸ (عامل کلیدی مسیر سیگنالینگ آپوپتوز گیرنده مرگ) برخلاف کاسپاز-۹ (عامل کلیدی مسیر سیگنالینگ آپوپتوز ذاتی) نداشته که به نوعی نشان می‌دهد مسیر ترجیحی القای آپوپتوز در شرایط هیپرگلوکز، مسیر سیگنالینگ ذاتی آپوپتوز بوده است (۹).

در مرحله تیمار با متوترکسات مشاهده شد که میزان بیان این ژن بعد از تیمار، کاهش قابل توجهی داشته، از طرف دیگر در گروه غیرگلوکزی تیمارشده با متوترکسات افزایش قابل‌توجه بیان کاسپاز-۸ حادث گردید که به نوعی نشان دهنده تنزل اثربخشی مطلوب متوترکسات در محیط هیپرگلوکز می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشاهده گردید میزان زنده‌مانی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6) در حضور گلوکز بعد از تیمار با متوترکسات، بالاتر از حالت مشابه در گروه کنترل بوده و در عین اثربخشی مطلوب متوترکسات بر افزایش بیان mRNA ژن کاسپاز-۸ و کاهش این اثر در محیط هیپرگلوکز؛ در محیط های مختلف از نظر حضور گلوکز، اثر واضحی از این داروی شیمی درمانی بر افزایش و یا تغییر بیان ژن DR5 مشاهده نگردید. باتوجه به اهمیت ایجاد مقاومت به شیمی درمانی در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد در زمینه دیابت، نیاز به درک گسترده‌تر مکانیسم‌های ایجاد مقاومت دارویی، جهت ارتقاء روش‌های درمانی و بهبود کیفیت زندگی بیماران وجود دارد.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان بررسی ارتباط سطح بیان ژن‌های DR5 و کاسپاز-۸ با پاسخ داروی متوترکسات در شرایط هایپرگلوکز در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6) ، در مقطع دکترای عمومی پزشکی در سال ۱۴۰۲ با کد پروپوزال ۴۵۶۸۳۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بیرجند اجرا شده است.

بدین وسیله بر خود لازم می‌دانیم از تمام عزیزانی که در اجرای این مطالعه یاریمان کردند، تقدیر و تشکر نماییم.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه انجام شده مطابق با مصوبه اخلاق در پژوهش به شماره IR.BUMS.REC.1401.260 در دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، مورد تصویب کمیته اخلاق قرار گرفت.

حمایت مالی

مطالعه انجام شده با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، انجام شد.

مشارکت نویسندگان

مصباح‌زاده، کیافر، صیادی و کرم اکثر آزمایش‌ها را انجام داده و تجزیه و تحلیل نموده و در نوشتن مقاله نقش مهمی داشتند. همه نویسندگان نسخه نهایی را خوانده و تأیید کردند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

منابع

1. Inaba H, Pui C-H. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. J Clin Med. 2021;10(9):1926. DOI: 10.3390/jcm10091926
2. Ge Z, Song C, Ding Y, Tan B-H, Desai D, Sharma A, et al. Dual targeting of MTOR as a novel therapeutic approach for high-risk B-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2021; 35(5):1267-78. DOI: 10.1038/s41375-021-01132-5
3. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine: 18th ed. New York: McGraw Hill; 2015.
4. Torrente Castells E, Barbosa de Figueiredo RP, Berini Aytés L, Gay Escoda C. Clinical features of oral lichen planus. A retrospective study of 65 cases.Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010; 15(5): e685-90. 2010. DOI: 10.4317/medoral.15.e685
5. Szablewski L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. Int Immunopharmacol. 2014; 22(1): 182-91. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.06.033
6. Nengroo MA, Maheshwari S, Singh A, Verma A, Arya RK, Chaturvedi P, et al. CXCR4 intracellular protein promotes drug resistance and tumorigenic potential by inversely regulating the expression of Death Receptor 5. Cell Death Dis. 2021; 12(5): 464. DOI: 10.1038/s41419-021-03730-8
7. De Vries J, Wammes L, Jedema I, Van Dreunen L, Nijmeijer B, Heemskerk M, et al. Involvement of caspase-8 in chemotherapy-induced apoptosis of patient derived leukemia cell lines independent of the death receptor pathway and downstream from mitochondria. Apoptosis. 2007; 12:181-93. DOI: 10.1007/s10495-006-0526-6
8. Disperati P, Suarez-Saiz F, Gronda M, Minden MD, Schimmer A. Silencing of Caspase 8 Expression in Leukemia Cells and Patient Samples. Blood. 2004; 104(11): 2050. DOI: 10.1182/blood.V104.11.2050.2050
9. Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. Kidney Int. 2005; 67(1): 82-93. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00058.x
10. Morresi C, Cianfruglia L, Sartini D, Cecati M, Fumarola S, Emanuelli M, et al. Effect of high glucose-induced oxidative stress on paraoxonase 2 expression and activity in Caco-2 cells. Cells. 2019; 8(12): 1616. DOI: 10.3390/cells8121616
11. Saengboonmee C, Seubwai W, Pairojkul C, Wongkham S. High glucose enhances progression of cholangiocarcinoma cells via STAT3 activation. Sci Rep. 2016; 6(1): 18995. DOI: 10.1038/srep18995
12. Fiorello ML, Treweeke AT, Macfarlane DP, Megson IL. The impact of glucose exposure on bioenergetics and function in a cultured endothelial cell model and the implications for cardiovascular health in diabetes. Sci Rep. 2020; 10(1): 1-12. DOI: 10.1038/s41598-020-76505-4
13. Shahraki S, Bahraini F, Mesbahzadeh B, Sayadi M, Sajjadi SM. Glucose increases proliferation and chemoresistance in chronic myeloid leukemia via decreasing antioxidant Properties of ω-3 polyunsaturated fatty acids in the presence of Iron. Mol Biol Rep. 2023; 50(12): 10315-24. DOI: 10.1007/s11033-023-08891-7
14. Moridi N, Najafzadeh M, Sayedi M, Sajjadi SM. Astaxanthin Co-treatment with Low Dose Methotrexate Increases the Cell Cycle Arrest and Ameliorates the Methotrexate-induced Inflammatory Response in NALM-6. Int J Mol Cell Med. 2024; 13(2): 133-46. DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.13.2.133
15. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. Adv Pharm Bull. 2017; 7(3): 339. DOI: 10.15171/apb.2017.041
16. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? Trends Biochem Sci. 2016; 41(3): 211-8. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001
17. Wang Z, Phillips LS, Rohan TE, Ho GY, Shadyab AH, Bidulescu A, et al. Diabetes, metformin use and risk of non-Hodgkin's lymphoma in postmenopausal women: A prospective cohort analysis in the Women's Health Initiative. Int J Cancer. 2023; 152(8): 1556-69. DOI: 10.1002/ijc.34376

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]

18. Zhao JZ, Lu YC, Wang YM, Xiao BL, Li HY, Lee SC, et al. Association between diabetes and acute lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia, non-Hopkin lymphoma, and multiple myeloma. International Journal of Diabetes in Developing Countries. 2021:1-9. DOI:10.1007/s13410-021-01021-8

19. Ahmad I, Suhail M, Ahmad A, Alhosin M, Tabrez S. Interlinking of diabetes mellitus and cancer: An overview. Cell Biochem Funct. 2023. 41(5): 506-6. DOI: 10.1002/cbf.3802

20. Erickson K, Patterson RE, Flatt SW, Natarajan L, Parker BA, Heath DD, et al. Clinically defined type 2 diabetes mellitus and prognosis in early-stage breast cancer. J Clin Oncol. 2011;29(1):54. DOI: 10.1200/JCO.2010.29.3183

21. Ma L, Zong X. Metabolic symbiosis in chemoresistance: refocusing the role of aerobic glycolysis. Front Oncol. 2020;10:5. DOI: 10.3389/fonc.2020.00005

22. Biernacka K, Uzoh C, Zeng L, Persad R, Bahl A, Gillatt D, et al. Hyperglycaemia-induced chemoresistance of prostate cancer cells due to IGFBP2. Endocr Relat Cancer. 2013; 20(5): 741-51. DOI: 10.1530/ERC-13-0077

23. Gerards MC, van der Velden DL, Baars JW, Brandjes DP, Hoekstra JB, Vriesendorp TM, et al. Impact of hyperglycemia on the efficacy of chemotherapy—A systematic review of preclinical studies. Crit Rev Oncol Hematol. 2017; 113: 235-41. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.03.007

24. Kageyama S-i, Yokoo H, Tomita K, Kageyama-Yahara N, Uchimido R, Matsuda N, et al. High glucose-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells involves up-regulation of death receptors. Cardiovas Diabetol. 2011; 10: 1-11. DOI:10.1186/1475-2840-10-73

25. Lam V, Findley HW, Reed JC, Freedman MH, Goldenberg GJ. Comparison of DR5 and Fas expression levels relative to the chemosensitivity of acute lymphoblastic leukemia cell lines. Leuk Res. 2002; 26(5): 503-13. DOI: 10.1016/s0145-2126(01)00162-x

26. Ehrhardt H, Wachter F, Maurer M, Stahnke K, Jeremias I. Important role of caspase-8 for chemosensitivity of ALL cells. Clin Cancer Res. 2011; 17(24): 7605-13. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-11-0513

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.3.195]