

اثر بربرین بر بقای سلول‌های سرطانی خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئیدی مزمن در *In vitro*

فرحناز قهرمان‌فرد^۱ (M.D)، آرش آقاییگی^۳ (M.D)، احسان منوچهری^{۱،۲،۳} (M.Sc)، مهنوش پاشایی^۱ (M.Sc)، مجید میرمحمدخانی^۴ (M.D)، مهدیه شکراللهی باروق^۱ (M.Sc)، فاطمه پاک^۱ (Ph.D)، محمد فرانش^۵ (M.D)، پرویز کوخایی^۶ (Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات سرطان، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۳- گروه پزشکی داخلی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۴- مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، بخش پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۵- مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان، انستیتو غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۶- آزمایشگاه ایمنولوژی و ژن‌درمانی، مرکز سرطان کارولینسکا، بیمارستان دانشگاه کارولینسکا، استکهلم، سوئد

چکیده

هدف: لوسمی لنفوئید مزمن (Chronic lymphocytic leukemia, CLL) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های لنفوئیدی در کشورهای غربی است. به‌طور عموم افراد مسن از طریق تجمع و تکثیر لنفوسیت‌های B که دارای مارکرهای CD19⁺، CD20⁺ و CD5⁺ و CD23⁺ هستند، درگیر می‌کند. بربرین از جمله ترکیبات طبیعی با ساختار ایزوکوئیلون آلکالوئید است که دارای توانایی بالقوه ضد سرطانی می‌باشد. در شرایط آزمایشگاهی بربرین در رده‌های سلول‌های سرطانی باعث کاهش بقا و افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. در این مطالعه به بررسی اثر بربرین بر میزان بقا و آپوپتوز در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) بیماران CLL و افراد نرمال در حضور یا عدم حضور و همچنین مقایسه با داروی فلودارابین در هر دو گروه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۱۲ بیمار CLL و ۶ فرد سالم را با استفاده از تکنیک فایکول جدا کرده و سلول‌های PBMC در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با محیط کشت RPMI1640 به همراه AB⁺serum با دوزهای ۵ تا ۲۰۰ میکرومولار بربرین و غلظت ۱ میکرومولار از فلودارابین کشت داده شدند. میزان بقا و میان آپوپتوز این سلول‌ها را با استفاده از تکنیک MTT و Annexin V/7AAD (فلوسایتومتری) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده بیانگر کاهش میزان بقا در PBMC های بیماران CLL مجاور شده با بربرین با $P < 0.05$ نسبت به سلول‌های بیمارانی که با این دارو مجاور نشده است. مقایسه میزان بقای PBMC بیماران CLL مجاور شده با بربرین و فلودارابین تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقایسه میزان بقای PBMC افراد سالم مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های مجاور نشده تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$). افزایش میزان آپوپتوز در PBMC بیماران CLL که در مجاور بربرین بوده است، نسبت به سلول‌هایی که در مجاورت دارو نبوده است ($P < 0.05$) در حالی که این اثر را در PBMC افراد سالم مشاهده نشده است ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: بربرین موجب کاهش بقا و افزایش آپوپتوز سلول‌های PBMC بیماران CLL شد. این اثر در PBMC افراد سالم مشاهده نشد. از طرفی عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر فلودارابین بعنوان داروی استاندارد و بربرین، نشان می‌دهد که بربرین می‌تواند یک کاندیدای مناسب با عوارض کم‌تر نسبت به فلودارابین برای تحقیقات بالینی معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی: سرطان خونی لنفوسیتی مزمن، بربرین، فلودارابین، آپوپتوز، Annexin 5A

لوسمی لنفاوی مزمن (CLL) Chronic Lymphocytic Leukemia معمول‌ترین بدخیمی خونی در کشورهای غربی

مقدمه

کم‌تر برای بیماران (با توجه به این‌که درمان‌های فعلی اثرات جانبی زیادی دارند) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

خون محیطی (۶ میلی‌لیتر خون در لوله هپارینه) از ۱۲ فرد بیمار CLL Indolent که شامل ۶ زن و ۶ مرد با متوسط سن ۶۰ سال بودند، جمع‌آوری گردید. این بیماران قبل از انجام طرح شیمی‌درمانی دریافت نکرده بودند. بیماری آن‌ها توسط معاینات بالینی توسط انکولوژیست و شاخص‌های ایمونوفنوتیپی تأیید شده توسط سازمان جهانی بهداشت نظیر CD19، CD5 و CD23 مشخص گردید. خون محیطی ۶ فرد سالم اهداکننده که از لحاظ سنی مطابقت داده شده‌اند، نیز به عنوان گروه کنترل اخذ گردید. روش کار و نحوه انجام طرح توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان مورد تأیید قرار گرفته بود.

کشت و مواد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی [۱۵] در محیط کشت RPMI 1640 که با سرم انسانی AB+ غیرفعال شده و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر از پنی‌سیلین و استرپتوماسین غنی شده، کشت داده شده‌اند. انکوباسیون سلول‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دی‌اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انجام شد. پنی‌سیلین و استرپتوماسین از شرکت Gibco (Gibco, Grand Island, NY, USA) خریداری شد. سرم‌های AB+5 فرد از سازمان انتقال خون سمنان دریافت شد و پس از غیرفعال‌سازی در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، با یک‌دیگر در شرایط کاملاً استریل مخلوط و تقسیم گردید و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در ساخت محیط کشت غنی شده به کار می‌رفت. پودر MTT به کار رفته شده از شرکت Carl routh خریداری گردید. کیت مربوط به تست آپوپتوز Annexin V از شرکت Biolegned خریداری شد.

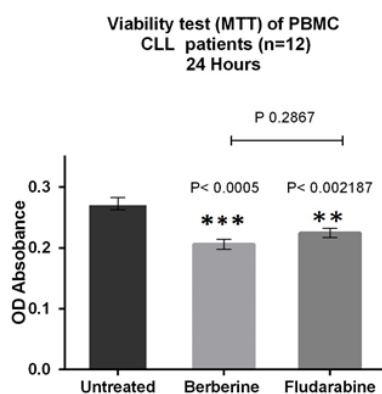
تست سنجش میزان بقا (MTT Assay)، سنجش میزان بقای سلول‌های کشت داده شده با استفاده از روش رنگ‌سنجیو اندازه‌گیری میزان احیا (MTT) انجام شد. تعداد

است که به صورت عمده بزرگسالان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. CLL با تجمع B-cells با ظاهر بالغ در خون محیطی شناخته شده است که دارای مارکرهای سطحی CD19+، CD5+ و بیان سطحی کم IgD، IgM، CD21، CD22 و CD79b در خون محیطی، مغز استخوان و گره‌های لنفاوی شناخته می‌شود [۲،۱]. این تجمع در CLL مربوط به نقص در مسیر آپوپتوزی داخلی و سیگنال‌های بقای محیطی از قبیل کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های ترشح شده از لنفوسیت‌های T و سایر سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین است. این سیگنال‌ها مسیرهای NF-kB و PI3K/Akt در CLL آغاز کرده و منجر به افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی نظیر اعضای خانواده Bcl-2 می‌شوند [۳].

رژیم‌های درمانی فعلی بر پایه آنالوگ‌های پورینی، عوامل آلکیل‌کننده و مونوکلونال آنتی‌بادی و یا ترکیبی از این موارد است. با این رژیم‌های درمانی پاسخ کلینیکی مشاهده می‌شود، اگرچه درمان قطعی امکان‌پذیر نیست [۴]. بنابراین جستجو برای یافتن عامل جدیدی ترکیب موجود بر پایه گیاهی که توانایی بالقوه برای بهبود بخشیدن به درمان CLL را داشته باشد، همواره مد نظر است [۵]. بربرینیک داروی قدیمی است که در حال حاضر نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیب شیمیایی این دارو ایزوکولونیل آلکالوئید است؛ امروزه توجهات زیادی به آلکالوئیدها به عنوان درمان برای بسیاری از بیماری‌ها از قبیل فشار خون بالا، دیابت، سندرم پلی‌کیستیک و کبد چرب شده است [۶]. شواهد و مدارک زیادی برای تأثیر پروآپوپتوتیک، ضد گسترش سرطان و ضد متاستازی بربرین در رده‌های سلولی سرطان‌های مختلف، لوسمی [۷]، لنفوما [۸]، سرطان سینه [۹، ۱۰]، سرطان کلورکتال [۱۰، ۱۱]، کارسینوما پروستات [۱۲، ۱۳] و سرطان ریه وجود دارد [۱۴]. در این مطالعه به بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطانی جدا شده از بیماران CLL پرداخته شد و میزان اثر آن بر روی کاهش میزان بقا و افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی به منظور یافتن ترکیب درمانی جدید با اثرات جانبی

نتایج

اثر کاهشی بربرین بر میزان بقای PBMCs بیماران CLL
 PBMCs بیماران CLL کاهش میزان بقای وابسته به زمان و دوز را بعد از مجاورت با غلظت‌های مختلف بربرین نشان دادند. میزان بقای PBMCs این بیماران و افراد سالم با دوزهای ۵ تا ۲۰۰ میکرومولار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط تکنیک MTT مورد بررسی قرار گرفت. مجاور کردن این سلول‌ها با بربرین در تمام غلظت‌ها و زمان‌ها باعث کاهش میزان بقا شده که کم‌ترین دوز که بیش‌ترین کاهش را در مقایسه با سلول‌های مجاور نشده و حتی در مقایسه با فلودارابین کنترل مثبت بود نشان می‌دهد، زمان ۲۴ ساعت با غلظت ۲۵ میکرومولار بود. این دوز و زمان مبنای آزمایش‌های بعدی بر روی دیگر بیماران بود. نتایج مجاورت بربرین با PBMCs بیماران کاهش معنی‌دار بقا در این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های مجاور نشدن را نشان داد ($P < 0.0005$). هیچ تفاوت معناداری بین اثر بربرین با فلودارابین به‌عنوان کنترل مثبت مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۱). سلول‌های افراد سالم که با بربرین مجاور شدند در مقایسه با سلول‌هاییکه مجاور نشدند (کنترل کاهش معناداری را در میزان بقا نشان ندادند ($P > 0.05$) (شکل ۲).



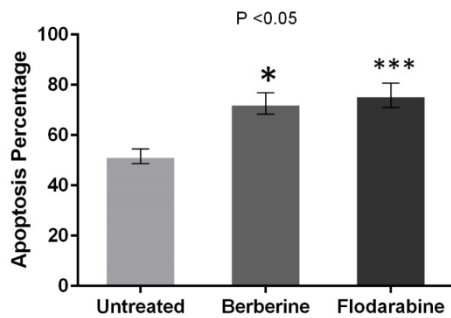
شکل ۱. بررسی اثر بربرین بر روی بقای PBMC بیماران CLL. بررسی اثر بربرین در مقایسه با سلول‌های غیر مجاور و همچنین سلول‌های مجاور شده با فلودارابین در PBMC بیماران CLL. نتایج کاهش معنادار بقای سلول‌های مجاور شده با بربرین را نسبت به سلول‌های مجاور نشده با (P) $P < 0.0005$ (value) نشان داد. میزان بقا در سلول‌های مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های مجاور شده با فلودارابین تفاوت معناداری ندارد ($P > 0.05$).

۱۵۰۰۰۰ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر (PBMCs) از هر دو گروه افراد بیمار و سالم در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از بربرین کشت داده شدند. از طرف دیگر سلول‌هایی از هر دو گروه بیمار و سالم که با سایتوکاین مجاور نشده بودند، به‌عنوان کنترل منفی و سلول‌هایی که در مجاورت غلظت ۱ میکرومولار از فلودارابین (غلظت فلودارابین موجود در خون بیماران که درمان می‌شوند) [۱۶]، به‌عنوان کنترل مثبت کشت داده شد. بعد از طی زمان انکوباسیون میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT را به خانه‌های پلیت‌های کشت داده شده اضافه گردید؛ محلول متوقف‌کننده واکنش stop solution را بعد از ۵ ساعت به خانه‌های پلیت مذکور اضافه کرده و میزان جذب را در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری گردید. تمامی تست با تکرارپذیری سه‌گانه انجام شد (Triplicate).

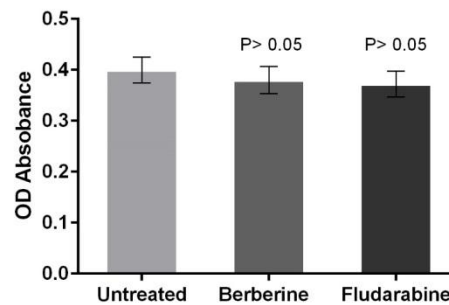
بررسی میزان آپوپتوز با روش Annexin V. بررسی میزان آپوپتوز القا شده توسط بربرین با استفاده از تکنیک Annexin V متصل شده به رنگ FITC و AAD ۷ انجام شد. میزان ۱۰۰ هزار سلول در هر ۳۰۰ میکرولیتر از محیط در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای انجام شد. بعد از زمان مجاورت و انکوباسیون با دارو، سلول‌ها بر طبق دستورالعمل کیت رنگ آمیزی شدند. به‌علاوه برای این‌که میزان دقیق آپوپتوز در لنفوسیت‌های B مشخص شود آنتی‌بادی CD19 نیز اضافه شد.

آنالیزهای آماری. تست‌های بررسی بقا MTT به صورت Triplicate انجام شده و تست‌های آپوپتوزی به صورت تک انجام شد. نتایج به دست آمده به صورت Mean±SEM نمایش داده شده و هم‌چنین معناداری نتایج با استفاده از آنالیز غیر پارامتریک من‌ویتنی مورد بررسی قرار گرفتند. این طرح تحقیقاتی با کد اخلاق ۱۰۳ در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

**Apoptosis percentage of B-cell in PBMCs
CLL patients (n=12)
48 Hours**



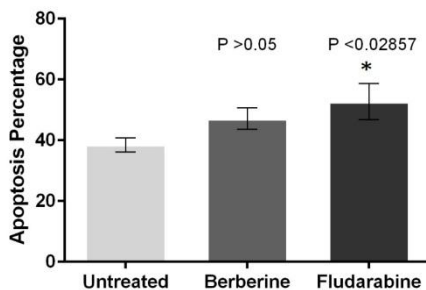
**Viability test (MTT) of PBMCs
Healthy donors (n=6)
24 Hours**



شکل ۳. بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز لنفوسیت‌های B موجود در PBMC بیمار CLL. بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز سلول‌های PBMC بیمار CLL و مقایسه آن با سلول‌های مجاور نشده سلول‌های مجاور شده با فلودارابین. بربرین باعث افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های PBMC نسبت به سلول‌های مجاور نشده گردید (P value < 0.05). اختلاف میزان آپوپتوز در اثر مجاورت با بربرین نسبت به فلودارابین قابل توجه و معنادار نبوده (P value > 0.05).

شکل ۲. بررسی اثر بربرین بر بقای سلول‌های PBMC افراد سالم. بررسی اثر بربرین در PBMC افراد سالم مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های PBMC مجاور نشده اثر معناداری را بر میزان بقا نشان نداد (P value > 0.05).

**Apoptosis of B-cell in PBMCs
Healthy donors (n=6)
48 Hours**



شکل ۴. بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز سلول‌های PBMC افراد سالم. بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های مجاور شده با بربرین و فلودارابین و مقایسه با سلول‌های مجاور نشده. مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های کنترل افزایش معناداری را نشان نمی‌دهد (P value > 0.05). مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های مجاور شده با فلودارابین نسبت به سلول‌های مجاور نشده افزایش معناداری را نشان می‌دهد (P < 0.05).

افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های PBMCs بیمار CLL. میزان حساسیت ۱۲ بیمار و ۶ فرد سالم در برابر بربرین با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری Annexin V/7AAD مورد سنجش قرار گرفت. همانند تست MTT غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت مورد سنجش قرار گرفت و غلظت ۲۵ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت بالاترین میزان القای آپوپتوز با کم‌ترین میزان دارو را نشان داد. بربرین همانند تست MTT وابسته به زمان و غلظت باعث افزایش آپوپتوز شد. بربرین اثر معناداری را بر روی افزایش میزان آپوپتوز در PBMCs بیمار CLL نسبت به سلول‌های مجاور نشده داشته است (P < ۰/۰۵) و در مقایسه با فلودارابین افزایش معناداری مشاهده نشد (P > ۰/۰۵). (شکل ۳). از طرف دیگر برخلاف فلودارابین که باعث افزایش معنادار آپوپتوز در PBMCs افراد سالم داشت (P < ۰/۰۵) بربرین افزایش معناداری در آپوپتوز این سلول‌ها را موجب نگردید (P > ۰/۰۵) (شکل ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

لوسمی لنفاوی مزمن از تجمع زیاد لنفوسیت‌های B غیر کارآمد با ظاهر بالغ و دارای CD5⁺, CD23⁺ در خون محیطی،

طحال و مغز استخوان شناخته می‌شود. نقص در آپوپتوز این سلول‌های بدخیم با پیشرفت بیماری و به احتمال با مقاومت این بیماری نسبت به شیمی‌درمانی در ارتباط است [۱۷]. تا آن‌جا که به انتخاب درمان مربوط می‌شود، داروهای زیادی در درمان CLL مؤثر هستند. قدیمی‌ترین آن‌ها کلرامبوسیل است که پاسخ نسبی ۶۰-۷۰٪ دارد اما پاسخ کامل و قطعی قابل توجهی ندارد. دیگر درمان مورد استفاده، فلودارابین است که یک آنالوگ پورینی است و مطالعات گسترده‌ای بر روی این دارو در درمان بیماران CLL انجام شده است. همچون تمام آنالوگ‌های پورینی فلودارابین اثر خود را با مهار DNA پلی‌مراز و ریبونوکلوئید ردوکتاز انجام داده و در نهایت منجر به آپوپتوز می‌شود. درمان با فلودارابین عموماً به خوبی تحمل می‌شود و اثر سمی عمده آن به صورت خونی و ایمنولوژیکی است. وقوع کم‌خونی همولیتیک اتوایمیون نیز باید از دیگر عوارض جانبی این دارو در نظر گرفته شود [۲]. با وجود تمام این تمهیدات و داروهای موجود، CLL همچنان یک بیماری علاج‌ناپذیر است و روش‌های نوآورانه جدید برای بهبود نتیجه درمان مورد نیاز است.

استفاده از طب مکمل و جایگزین به صورت گسترده‌ای در میان بیماران مبتلا به سرطان رایج شده است. در بسیاری از نظر سنجی‌ها، داروهای گیاهی از پر مصرف‌ترین درمان‌ها است. عموم مردم اعتقاد به این دارند که استفاده از درمان‌های گیاهی بسیار ایمن‌تر و با عوارض جانبی کم‌تر و همچنین باعث ایجاد وابستگی کم‌تری است. علاقه به اثرات دارویی مواد فعال زیستی در درمان سرطان و پیشگیری از آن در بیست سال گذشته به طور چشمگیری افزایش یافته است [۱۸]. بربرین به صورت گسترده‌ای به عنوان یک داروی ضد التهابی و ضد اسهال استفاده می‌شود و هم‌چنین دارای فعالیت ضد سرطان‌های متعدد در سلول‌های سرطانی مختلف و از طریق اشکال مختلف اثرات سیتوتوکسیک است، بدون این‌که آسیب قابل توجهی به سلول‌های طبیعی وارد نماید، بربرین به صورت بالقوه به عنوان یک داروی ضد سرطان محسوب می‌شود. این

دارو دارای عوارض جانبی بسیار کم‌تری نسبت به داروهای شیمی‌درمانی مرسوم از قبیل فلودارابین که خط اول درمان برای CLL است، می‌باشد. در این مطالعه، اثر آپوپتوزی و مهارتی برای بقا بربرین در سه زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و با غلظت‌های مختلف از ۱ میکرومولار تا ۲۰۰ میکرومولار مورد بررسی قرار گرفت و با فلودارابین با غلظت یک مولار مقایسه گردید. این میزان فلودارابین، با میزان موجود در خون افراد که درمان گرفته‌اند مطابقت دارد [۱۶]. ما دریافتیم در *In vitro* داروی بربرین توانایی القای آپوپتوز و هم‌چنین کاهش بقا را در سلول‌های این بیماران به صورت وابسته به دوز و زمان در PBMC بیماران CLL دارد. این مطالعه در نوع خود اولین مطالعه بر روی سلول‌های Primary (منظور همان سلول‌های خود بیماران بود ولی سل‌ل‌ل‌های مختلف دیگر قبلاً انجام شده بود) بوده و مطالعه مشابهی در هیچ یک از سرطان‌ها وجود ندارد و فقط بر روی سل‌ل‌ل‌ها و مدل‌های حیوانی کار شده است. در این مطالعه چندین مشاهده کلیدی وجود دارد: اول این‌که نشان داده شد که مجاور کردن PBMC بیماران CLL با داروی بربرین با دوز ۲۵ μmol با زمان ۲۴ ساعت با $P \text{ value} < 0.0005$ منجر به کاهش معنادار میزان بقا در این سلول‌ها می‌شود. از طرف دیگر با مقایسه اثر این دارو در بقای سلول‌های PBMC افراد CLL با اثر فلودارابین مشخص گردید که میزان بقا در هر دو دارو تقریباً به یک اندازه بوده و اختلاف معناداری بین اثر بربرین با فلودارابین در بقای این سلول‌ها وجود ندارد ($P \text{ value} > 0.05$). در مقایسه با این نتیجه بررسی اثر بربرین بر میزان بقا در PBMC افراد سالم که به عنوان کنترل سیتوتوکسیتی دارو و برای مقایسه اثر دارو در افراد سالم و بیمار استفاده شد، با همین دوز و همین زمان نتیجه آزمایش بیانگر اثر کم و ناچیز این دارو بر بقای PBMC افراد سالم نسبت به سلول‌هایی است که در مجاورت دارو قرار نگرفته است و اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P \text{ value} > 0.05$) اثری که داروی بربرین بر روی بقای سلول‌های افراد سالم دارد در مقایسه با اثر فلودارابین کم‌تر

دارای حساسیت غذایی توسط Nan Yang انجام شده بود هم‌راستا بود، بدین صورت که داروی بربرین اثری بر میزان بقای سلول‌های سالم که از طریق روش شمارش سلولی بررسی شده بودند، نداشت. هم‌چنین بربرین در سلول‌های این بیماران اثر قابل‌توجهی در افزایش میزان آپوپتوز نداشت [۱۹]. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر این دارو بر روی سرطان معده پرداخته شده است، اثر این دارو بر کاهش میزان Survivin که تبع آن به افزایش میزان آپوپتوز منجر شده [۲۰] و هم‌چنین این نتیجه با مطالعه‌های که به اثر بربرین در میزان بیان ژن Survivin در بیماران CLL دارد، هم‌راستا است [۲۱]. از طرف دیگر مطالعه اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطان معده (SW480) بیانگر این مطلب است که این دارو با اثر بر روی سیکل سلولی و توقف آن در فاز G0 باعث کاهش بقا در این سلول‌ها شده که خود نشان‌دهنده این می‌باشد که این دارو از روش‌های متفاوت اثر خود را بر روی سلول‌های سرطانی می‌گذارد [۲۲]. در مطالعه دیگری که بر روی کارسینومای پروستات انسانی LNCaP و DU145، انجام گردید نتایج به دست آمده در این مطالعه، با نتایج پژوهش ما هم‌خوانی داشت، که در پژوهش مذکور این دارو به صورت وابسته به دوز و زمان در این سلول‌ها ($P < 0.005$) باعث افزایش میزان آپوپتوز گردید. در همین مطالعه با بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های اپیتلیال پروستات انسانی سرطانی PWR-1E مشاهده گردید که این دارو باعث افزایش محسوسی در آپوپتوز نشده که همانند نتیجه مطالعه ما بر روی سلول‌های غیر سرطانی بود [۲۳]. هم‌چنین در مطالعه اثر آپوپتوزی بربرین در سلول‌های MCF-7 سرطان سینه، قطعات DNA Internucleosomal به‌وضوح در غلظت $25 \mu\text{mol}$ مشاهده شد که در نتیجه آپوپتوز تأخیری است و هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بود [۹]. هم‌چنین در مطالعه‌ای مشابه با بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطان متوجه اثر آپوپتوزی دارو در این سلول‌ها به واسطه کاهش میزان ژن Survivin و کاهش میزان COX-2 می‌شود [۲۴].

بوده و توکسیسیتی کم‌تری دارد. نتایج به‌دست آمده از کار ما با نتایج حاصل از کار Jeevitha B. Patil و همکارانش که بر روی سلول‌های بدخیمی سینه (MCF-7) و سلول‌های اپیتلیال انسانی (MCF-12F) با دوز $25 \mu\text{mol}$ انجام شده بود، در یک راستا بوده و این دارو باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی بدخیم شده درحالی‌که اثر سمی خاصی بر روی سلول‌های اپیتلیال غیر بدخیم ندارد [۹]. هم‌چنین نتایج مطالعه ما در مورد سلول‌های افراد نرمال با نتایج مطالعه Nan Yang که با اثردهی بربرین با دوزهای متفاوت بر روی PBMC افراد سالم انجام داده بود، مطابقت داشته و مؤید این مسئله است که بربرین بر روی سلول‌های نرمال اثر کشندگی خاصی نداشته و برای این سلول‌ها سمی نیست [۱۹]. پس از بررسی میزان بقا PBMC افراد مبتلا به CLL با استفاده از روش MTT، برای بررسی روش و نوع اثر مهاری که داروی بربرین می‌تواند بر روی این سلول‌ها داشته باشد، به بررسی تأثیر این دارو بر روی میزان آپوپتوز بربرین بر روی PBMC بیماران پرداخته شد و نتایج حاصله بیانگر این مطلب است که PBMC افراد مبتلا به CLL که در مجاورت با بربرین با غلظت $25 \mu\text{I}$ (دوز اپتیمم) قرار می‌گیرند، همان‌طوری که در نتایج مشاهده می‌گردد، آپوپتوز به میزان چشم‌گیری نسبت به سلول‌هایی که در مجاورت با دارو نبوده‌اند، ($P < 0.05$) افزایش پیدا کرده است. از طرف دیگر با اثر دادن بربرین بر روی PBMC افراد سالم که به منظور مقایسه اثر بربرین در افراد سالم و بیمار انجام گردید، مشاهده شد که این دارو تأثیر محسوس و زیادی در سلول‌های PBMC این افراد ندارد و در مقایسه با سلول‌هایی که با بربرین مجاور نبوده تفاوتی در آپوپتوز ایجاد نگردید. مقایسه نتایج آپوپتوز حاصل از بربرین و فلودارابین در افراد سالم نشان‌دهنده افزایش معنادار میزان آپوپتوز در این سلول‌ها توسط فلودارابین بوده ($P \text{ value} < 0.05$) در حالی آپوپتوز توسط بربرین در این سلول‌ها معنادار نیست. نتایج به دست آمده در این قسمت از مطالعه، با نتایج مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های PBMC افراد

[8] Letašiová S, Jantová S, Múčková M. Berberine—antiproliferative activity in vitro and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. *Cancer lett* 2006; 239: 254-262.

[9] Patil JB, Kim J, Jayaprakasha G. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. *Eur J Pharmacol* 2010; 645: 70-78.

[10] Wang L, Liu L, Shi Y, Cao H, Chaturvedi R, Calcutt MW, et al. Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor. *PLoS One* 2012; 7: e36418.

[11] Piyanuch R, Sukhthankar M, Wandee G, Baek SJ. Berberine, a natural isoquinoline alkaloid, induces NAG-1 and ATF3 expression in human colorectal cancer cells. *Cancer lett* 2007; 258: 230-240.

[12] Choi MS, Oh JH, Kim SM, Jung HY, Yoo HS, Lee YM, Moon DC, Han SB, Hong JT. Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2009; 34: 1221.

[13] Meeran SM, Katiyar S, Katiyar SK. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229: 33-43.

[14] Katiyar SK, Meeran SM, Katiyar N, Akhtar S. p53 cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo. *Mol Carcinog* 2009; 48: 24-37.

[15] Abdalla A, Kokhaei P, Hansson L, Mellstedt H, Österborg A. Idiotype vaccination in patients with myeloma reduced circulating myeloma cells (CMC). *Ann Oncol* 2008; 19: 1172-1179.

[16] Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, Wiestner A, Alizadeh AA, Arthur DC, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood* 2004; 104: 1428-1434.

[17] Palma M, Kokhaei P, Lundin J, Choudhury A, Mellstedt H, Österborg A. The biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2006; 17: x144.

[18] Scott EN, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Development of dietary phytochemical chemopreventive agents: biomarkers and choice of dose for early clinical trials. *Cancer Prev Res* 2009; 2: 525-530.

[19] Yang N, Wang J, Liu C, Song Y, Zhang S, Zi J, et al. Berberine and limonin suppress IgE production by human B cells and peripheral blood mononuclear cells from food-allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 113: 556-564. e4.

[20] Pandey A, Vishnoi K, Mahata S, Tripathi SC, Misra SP, Misra V, et al. Berberine and curcumin target survivin and STAT3 in gastric cancer cells and synergize actions of standard chemotherapeutic 5-fluorouracil. *Nutr Cancer* 2015; 67: 1295-1306.

[21] Jaafarinejad H, Ghanizadeh N, Ghahremanfard F, Barati M, Manouchehri Doulabi E, Kokhaei P. Effect of Berberine on the survivin gene expression in peripheral blood mononuclear cell of chronic lymphocytic leukemia patients in vitro. *Koomesh* 2017; 19: 227-232.

[22] Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 688: 14-21.

[23] Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 296-308.

[24] Pazhang Y, Ahmadian S, Javadifar N, Shafieezadeh M. COX-2 and survivin reduction may play a role in berberine-induced apoptosis in human ductal breast epithelial tumor cell line. *Tumor Biol* 2012; 33: 207-214.

با توجه به نتایج حاضر داروی بربرین باعث کاهش میزان بقا و افزایش آپوپتوز سلول‌های بیماران CLL شده بدون این‌که تأثیر محسوسی بر کاهش بقا و افزایش آپوپتوز این سلول‌ها در افراد سالم گردد و در مقایسه با فلودارابین که داروی مرسوم برای درمان CLL است، عمل‌کرد بهتری داشته است زیرا فلودارابین با افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های افراد سالم نشان می‌دهد که به صورت اختصاصی عمل نکرده و باعث اثرات مخرب برای روی سلول‌های سالم داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم پزشکی سمنان به خاطر تامین مالی جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند. مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه دوره دستیاری داخلی مصوب دانشگاه علوم پزشکی سمنان می‌باشد که نویسندگان از حمایت‌های آنان تشکر می‌نمایند. همین‌طور باید از زحمات بی‌شائبه سرکار خانم سلاخ که جهت تهیه و جمع‌آوری نمونه‌ها به ما کمک شایانی کردند تقدیر و تشکر کنیم.

منابع

- [1] Herishanu Y, Polliack A. Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. *Transfus Apher Sci* 2005; 32: 85-97.
- [2] Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2005; 16: 113-123.
- [3] Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 2014; 5: 309-325.
- [4] Battle TE, Arbiser J, Frank DA. The natural product honokiol induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood* 2005; 106: 690-697.
- [5] Angelo LS, Kurzrock R. Turmeric and green tea: a recipe for the treatment of B-chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1123-1125.
- [6] Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother Res* 2008; 22: 999-1012.
- [7] Lin CC, Kao ST, Chen GW, Ho HC, Chung JG. Apoptosis of human leukemia HL-60 cells and murine leukemia WEHI-3 cells induced by berberine through the activation of caspase-3. *Anticancer Res* 2006; 26: 227-242.

Effect of berberine on cancer cell viability of chronic lymphocytic leukemia patients *in vitro*

Farahnaz Ghahremanfard³ (M.D), Arash Aghabeigi³ (M.D), Ehsan Manouchehri^{1, 2, 6} (M.Sc.), Mehrnoosh Pashaei^{1, 2} (M.Sc.), Majid Mirmohammadkhani⁴ (M.D), Mahdieh Shokrollahi Barough¹ (M.Sc.), Fatemeh Pak¹ (Ph.D), Mohammad Faranoush⁵ (M.D), Parviz Kokhaei^{*1, 6} (Ph.D)

1- Cancer Research Center and Department of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2- Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3- Internal Medicine Department, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

4- Research Center for Social Determinants of Health, Department of Community Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

5- Pediatric Growth and Development Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6- Immune and Gene Therapy Lab, Cancer Centre Karolinska, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

(Received: 8 Mar 2016; Accepted: 12 Jun 2016)

Introduction: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world. CLL generally affects older people by the accumulation and proliferation of B lymphocytes with markers CD19+, CD20+, CD5+ and CD23+ specified. In this way, berberine, including natural compounds with isoquinoline alkaloids structure, that has a potential anti-cancer effect. Berberin decreased survival and increased apoptosis of cancer cell lines *in vitro*. In this study, the effect of berberine on cell survival and apoptosis in PBMC patients and healthy donors in the presence or absence of berberine and also comparison between berberine and fludarabine were investigated.

Materials and Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 12 patients and 6 healthy donors were isolated by using ficoll technique and PBMC cells seeded into the 96 well culture plate using medium RPMI1640+ AB+ serum with doses ranging from 5 to 200 μ M of Berberine. The survival and apoptosis percentage of these cells was measured by MTT and Annexin V/7AAD (Flowcytometry).

Results: Our results suggest a reduction in PBMC survival in CLL patients treated with berberine with $P < 0.05$ as compared to patients cells which not treated. Comparing PBMC survival treated with berberine to cells treated with fludarabine showed no significant change ($P > 0.05$). Correspondingly, increasing PBMC apoptosis in patients treated with berberine was observed rather than the cells were not adjacent to berberine ($P < 0.05$) and also compared with PBMC apoptosis treated with fludarabine which shown no significant difference ($P > 0.05$). However, we don't have this increasing in healthy donors.

Conclusion: Berberine leads to reduced viability and elevated levels of apoptosis in PBMCs of CLL Patients. Berberin showed no significant effects on PBMCs of healthy donor viability and apoptosis. Apoptosis induction by berberin is comparable to fludarabine as a standard treatment for CLL patients. Berberine might be a good candidate for clinical trial for CLL patients.

Keywords: B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia, Berberine, Fludarabine, Apoptosis, Annexin 5A

* Corresponding author. Tel: +98 23033451336
p_kokha@yahoo.com