مقاله پژوهشی

مهار مسیرهای سیگنالی فاکتورهای رشد توسط داروی ایماتینیب مسیلات در سلول‌های لایدیگ نرمال موشی

سیدمحمدرضا هاشم‌نیا[۱]، فاطمه خردمند*[۲]، فرزانه نوری[۳]، شیوا روشن میلانی[۴]

تاریخ دریافت 1392/04/18 تاریخ پذیرش 1392/06/28

چکیده

پیش زمینه و هدف: تکثیر سلول‌های سرطانی ممکن است از فسفوریلاسیون غیر طبیعی مسیرهای سیگنالی پایین دست گیرنده‌های تیروزین کینازی چون گیرنده‌های فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت α (PDGFR-α) و (PDGFR-β) β ناشی شود. به دلیل نقش حیاتی این مسیرها در سلول‌های طبیعی، درمان سرطان‌ها با داروهای مهار کننده تیروزین کینازی مانند ایماتینیب مسیلات اغلب منجر به اختلالات عملکرد سلول‌های طبیعی همانند سلول‌های لایدیگ می‌شود. هدف این تحقیق بررسی میزان آپوپتوز و فسفوریلاسیون PDGFR-α و PDGFR-β در سلول‌های لایدیگ نرمال موشی در مواجهه با داروی ایماتینیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های لایدیگ موشیTM3 با غلظت‌های ۰، ۲،۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرو مول داروی ایماتینیب به مدت ۲، ۴ و ۶ روز تیمار گشتند. میزان آپوپتوز و فسفوریلاسیون گیرنده‌های PDGF به ترتیب با روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز۳ و ایمونواسی فلورسانس بررسی گردید. جهت تحلیل داده‌ها از تست‌های ANOVA و t-test استفاده شد.

یافته‌ها: میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α در گروه تیمار شده با دارو (۰/۲۱±۰/۰۸) و گروه کنترل (۰/۳۵±۰/۱۳) تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) و با افزایش دوز دارو میزان فسفوریلاسیون کاهش بیشتری می‌یافت (P<۰/۰۵). میزان آپوپتوز و فسفوریلاسیون PDGFR-β در بین دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری نداشت، هر چند که با افزایش مدت زمان مواجهه میزان PDGFR-β نیز کاهش بیشتری نشان داد (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: داروی ایماتینیب با مهار مسیرهای سیگنالی پایین دست فاکتورهای رشد خصوصاً مهار فسفوریلاسیون PDGFR-α در سلول‌های لایدیگ نرمال ممکن است باعث اختلال در رشد این سلول‌ها گردد. به نظر می‌رسد که این دارو تأثیری در فعال سازی مسیرهای آپوپتوزی این سلول‌ها ندارد.

کلید واژه‌ها: آپوپتوز، ایماتینیب مسیلات، سلول‌های لایدیگ، گیرنده‌ی فاکتور رشد مشتق از پلاکت

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره نهم، ص ۷۱۸-۷۱۱، آذر ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۱۶۶۶۰

Email: fkheradmand@yahoo.com

مقدمه

در سرطان‌ها روندهای تکثیر سلولی، تمایز، تهاجم و متاستاز از فسفریلاسیون غیرطبیعی پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالی تیروزین کینازهایی چون فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت α (PDGFα) و (PDGFβ) β، Abl-bcL و c-kit ناشی می‌شود. اما از آنجا که این مسیرهای سیگنالی در سلول‌های طبیعی نیز عملکردهای حیاتی مهمی را میانجی گری می‌نمایند، درمان سرطان‌ها با داروهایی چون داروهای مهار کننده تیروزین کیناز اغلب منجر به اختلالات عملکرد سلول‌های طبیعی می‌شود(۱, ۲).

داروی ایماتینیب یکی از اولین داروهای مهار کننده تیروزین کینازی است که با اتصال به جایگاه ATPازی کینازهای فوق‌الذکر، اتصال طبیعی ATP را مهار کرده و گیرنده‌های تیروزین کینازی PDGF و C-Kit را مهار می‌نماید(۳).

---

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[۲] استادیار، دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی تغذیه ی آبزیان، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی

[۴] استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

PDGF ها عضو خانواده میتوژن‌ها هستند و مانند دیگر عضوهای این خانواده روندهای تمایز، تکثیر و مهاجرت را در سلول‌ها میانجی‌گری می‌کنند. PDGF ها از دو زنجیر پلی پپتیدی دیمر تشکیل شده‌اند و شامل انواع مختلف (AA-BB-AB-CC-DD) با تمایل اتصالی نسبی به سه نوع گیرنده(ββ-βα-αα) می‌باشند(۴, ۵). سلول‌های لایدیگ جنینی و بالغ هر دو نوع از گیرنده‌های PDGF و تمام لیگاندهای آن‌ها را بیان می‌نمایند که همگی نقش بسیار مهمی در تکثیر و تکامل سلول‌های لایدیگ بالغ و ترشح تستسترون ایفا می‌نمایند(۶, ۷). در واقع این فاکتورهای و گیرنده‌های تیروزین کینازی آن‌ها به عنوان یک عامل کلیدی برای تکامل سلول‌های اسپرماتوگونی و لایدیگ بیضه در موش‌های صحرائی نابالغ معرفی شده‌اند(۳).

مطالعات انجام شده نشان داده است که مهار این مسیرهای سیگنالی در سلول‌های لایدیگ (که یکی از عوارض جانبی داروی ایماتینیب می‌باشد) منجر به توقف پیام‌رسانی‌های لازم برای رشد و تکامل بیضه‌ها می‌شود، به‌طوری‌که در مواجهه‌ی کوتاه مدت موش‌های صحرائی نر با ایماتینیب اختلال در روند اسپرم سازی روی می‌دهد(۳, ۸). با این حال مطالعات متناقضی از اثر ایماتینیب روی تعداد اسپرم‌ها گزارش شده است که شمارش طبیعی اسپرم‌ها (۹)، تا بروز الیگواسپرمی (۱۰) به دنبال مصرف ایماتینیب را شامل می‌شوند. Basciani و همکارانش نیز با بررسی اثرات ضد سرطانی ایماتینیب در تومورهای سلول‌های لایدیگ این دارو را به عنوان داروی مناسبی برای درمان این تومورها عنوان نمودند(۱۱).

سلول‌های لایدیگ نقشی غیر مستقیم ولی بسیار اساسی در اسپرم سازی و باروری ایفا می‌کنند و از آنجا که حفظ قدرت باروری در مصرف کنندگان این داروها که عموماً در سنین باروری هستند، حائز اهمیت می‌باشد، مطالعه‌ی تأثیر این دارو بر سلول‌های لایدیگ شاید بتواند زمینه مطالعات آتی در صدد یافتن دوزهای مطلوب درمانی باشد. از آنجا که در بررسی‌های انجام گرفته تأثیر ایماتینیب بر سلول‌های لایدیگ نرمال گزارش نشده است، در این مطالعه اثرات ایماتینیب بر میزان فسفوریلاسیون گیرنده فاکتور رشد مشتق از پلاکت آلفا و بتا و میزان آپوپتوز در سلول‌های لایدیگ موشی کشت داده شده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

کشت سلول:

سلول‌های لایدیگ موشیTM3 از گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F12)(PAA, UK) حاوی ۲/۵درصد سرم جنینی گاوی (PAA, UK) و ۵درصد سرم اسبی (PAA, UK)، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین کشت داده شده و در انکوباتور با میزان رطوبت ۹۰درصد، CO2 ۵درصد و دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲۴ ساعت تعویض شد. پاساژ سلول‌ها هر دو الی سه روز و با محلول تریپسین-EDTAانجام می‌شد. شمارش سلول‌ها با کمک لام نئوبار صورت گرفت. در تمامی آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵درصد بود. بعد از دو بار پاساژ دادن سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه(در هر خانه ۳۰۰۰ سلول) منتقل شدند. (به استثنای آزمایش تعین فعالیت کاسپاز۳ که فقط در فلاسک‌های T25 انجام شد). سلول‌ها بعد از گذراندن ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۰، ۲،۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرو مول دارو به مدت ۲، ۴و ۶ روز تیمار شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز۳:

میزان آپوپتوز با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز۳ با استفاده از کیت کالریمتری Caspase-3/CPP32 (BioVision, Inc., USA) اندازه‌گیری گردید. اساس این روش تشخیص توالی‌های خاص اسیدهای آمینه در سوبسترا توسط کاسپازها می‌باشد. سوبستراها یک تتراپپتید می‌باشند که با ماده رنگی پارانیتروآنیلین (p-NA) نشان‌دار شده‌اند. p-NAدر اثر واکنش کاسپازها با سوبسترا، از آن جدا می‌شود و تولید رنگ زرد می‌کند که توسط دستگاه الایزا، جذب نوری آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر محاسبه می‌شود. میزان تولید رنگ در اثر شکسته شدن سوبسترا متناسب با فعالیت آنزیمی کاسپاز در نمونه مورد نظر است. برای انجام این آزمایش بعد از اتمام زمان تیمار، سلول‌ها به ۵۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده سلول منتقل شده و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در روی یخ، به مدت ۱ دقیقه درg ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرو گرم از مایع رویی در ۵۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده رقیق گشته و ۵۰ میکرولیتر بافر واکنشگر 2X به همراه ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی کاسپاز(DEVD-pNA) به چاهک‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، سپس جذب نوری آن محاسبه گردید.

ایمونواسی‌های گیرنده‌های فاکتور رشد مشتق از پلاکت آلفا و بتای فسفوریله:

ایمونواسی‌های PDGFR-α و PDGFR-β برای اندازه‌گیری میزان فسفریلاسیون سطوح ریشه‌های تیروزینی برای گیرنده‌های آلفا(Y742) و بتا(Y1021) طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شدند(R&D Systems, MN 55413, USA).

به طور خلاصه به دنبال تحریک، سلول‌ها در چاهک‌ها ثابت و

نفوذپذیر شدند. هدف اندازه‌گیری فسفوریلاسیون پروتئین‌ها توسط شیوه لیبلینگ ایمونوانزیماتیک دوبل بوده و فلوروسانس پروتئین فسفوریله نسبت به توتال پروتئین در هر چاهک طبیعی نشان داده شد. سلول‌ها به طور همزمان با دو آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند: یک آنتی‌بادی ویژه‌ی فسفوPDGFR-β و آنتی‌بادی نرمال که پروتئین توتال(فسفریله و غیرفسفوریله) را شناسائی می‌کند. دو آنتی‌بادی ثانویه که با هورسرادیش پراکسیداز (HRP) یا آلکالین پراکسیداز (AP) نشان‌دار شده‌اند، دو سوبسترای فلوروژنی برایHRP یاAP مورد استفاده در تشخیص را به صورت طیفی متمایز می‌کنند. سنجش در این دو طول موج با دستگاه فلورسانس پلیت ریدر (Biotek synergy HT Highland park, P. O. Box 998 Winooski, vermont 05404-0998 USA). انجام گرفت. سلول‌ها به صورت سه تکرار در هر دوز کشت داده شدند.

تمامی داده‌ها با برنامه نرم افزاری SPSSتجزیه و تحلیل گردید مقایسه داده‌ها ابتدا با تست Kolmogorov - simirnov انجام شد و چون p>۰/۰۵ و توزیع نرمال بود، در نتیجه از تست‌های one way ANOVA و t-test جهت تحلیلشان استفاده گردید.

یافته‌ها

بررسی میزان آپوپتوز سلولی گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل توسط ایماتینیب:

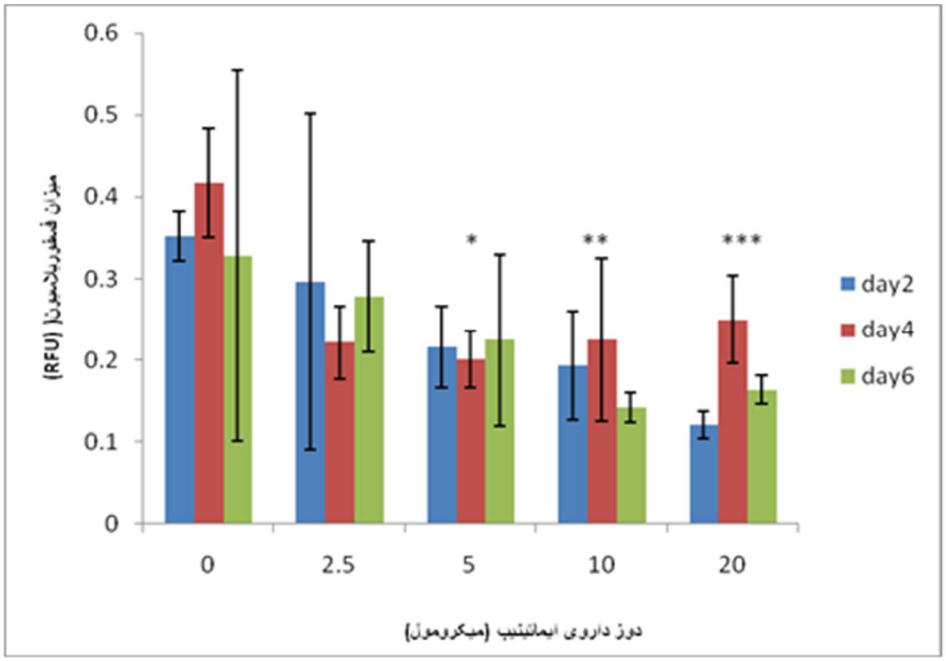
بر اساس آزمون t-test میزان آپوپتوز بین گروه‌های تیمار شده (۰/۰۰۸±۰/۰۰۱) و گروه کنترل (۰/۰۰۹±۰/۰۰۲) تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد(P=۰/۸۲۲). همچنین بر اساس تست ANOVA تغییرات میزان آپوپتوز با افزایش دوز دارو (P=۰/۵۱۳) (جدول ۱). و نیز افزایش مدت زمان تیمار (P=۰/۱۲۵) تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

جدول شماره (۱): میانگین فعالیت آنزیم کاسپاز۳ و میزان فسفوریلاسیون گیرنده‌های آلفا و بتای PDGF در مواجهه با دوزهای مختلف ایماتینیب در سلول‌های TM3

مارکر	دوز دارو (microgram)	تعداد	Mean±SD	P value
caspase3	۰	۹	۰/۰۰۹±۰/۰۰۲	۰/۵۱۳
	۲/۵	۹	۰/۰۰۹±۰/۰۰۲	
	۵	۸	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱	
	۱۰	۸	۰/۰۰۸±۰/۰۰۲	
	۲۰	۸	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰	
PDGFRalpha	۰	۶	۰/۳۵۳±۰/۱۳۹	۰/۰۰۷
	۲/۵	۹	۰/۲۶۵±۰/۱۱۵	
	۵	۹	۰/۲۱۳±۰/۰۶۱	
	۱۰	۹	۰/۱۸۶±۰/۰۷۰	
	۲۰	۷	۰/۱۷۶±۰/۰۵۹	
PDGFRbeta	۰	۹	۱/۷۵±۰/۴۴۸	۰/۲۲۵
	۲/۵	۹	۱/۹۰±۰/۸۰۸	
	۵	۸	۱/۶۹±۰/۵۱۶	
	۱۰	۹	۱/۸۲±۰/۶۴۸	
	۲۰	۸	۱/۲۶±۰/۵۲۰	

بررسی میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل توسط ایماتینیب:

میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α بین گروه‌های تیمار شده (۰/۲۱۲±۰/۰۸۴) و گروه کنترل (۰/۳۵۳±۰/۱۳۹) تفاوت آماری معنی‌داری را بر اساس آزمون t-test نشان داد (P=۰/۰۰۲). با افزایش دوز دارو نیز میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α کاهش معنی‌داری را نشان داد(P=۰/۰۰۷) (نمودار ۱، جدول ۱).



نمودار شماره (۱): مقایسه میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α در سلول‌های مواجهه یافته با ایماتینیب طی روزها و دوزهای مختلف. * P<0.05 بر اساس تست Tukey بین دوزهای کنترل(صفر) و پنج، **P<0.05 بر اساس تست Tukey بین دوزهای کنترل(صفر) و ۱۰، *** P<0.05 بر اساس تست Tukey بین دوزهای کنترل(صفر) و ۲۰

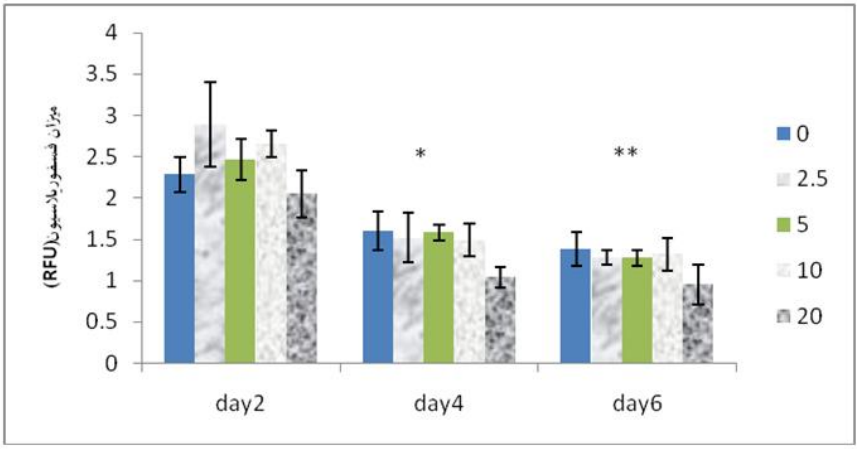
افزایش مدت زمان مواجهه تأثیر معنی‌داری بر میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α نداشت (P=۰/۶۷۴)، جدول ۲).

جدول شماره (۲): میانگین فعالیت کاسپاز۳ و میزان فسفوریلاسیون گیرنده‌های PDGF طی روزهای مختلف مواجهه با دوزهای مختلف ایماتینیب در سلول‌های TM3

مارکر	تعداد روزهای مواجه با دارو	تعداد	Mean±SD	Pvalue
caspase3	۲	۱۵	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱	۰/۱۲۵
	۴	۱۲	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱	
	۶	۱۵	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱	
PDGFRalpha	۲	۱۳	۰/۲۳۵±۰/۱۱	۰/۶۷۴
	۴	۱۳	۰/۲۵۲±۰/۰۹	
	۶	۱۴	۰/۲۱۵±۰/۱۰	
PDGFRbeta	۲	۱۳	۲/۵۱±۰/۳۹۸	۰/۰۰۰
	۴	۱۵	۱/۴۵±۰/۲۷۸	
	۶	۱۵	۱/۲۴±۰/۲۱۷	

بررسی میزان فسفوریلاسیون PDGFR- β گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل توسط ایماتینیب:

مطابق آزمون t-test میزان فسفوریلاسیون (PDGFR- β) بین گروه‌های تیمار شده (۱/۶۸±۰/۶۵۹) و گروه کنترل (۱/۷۵±۰/۴۴۸) تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۷۵۲). به همین ترتیب، بر اساس آزمون ANOVA میزان فسفوریلاسیون PDGFR-β با افزایش دوز مورد مواجهه ارتباط آماری معنی‌داری نشان نداد(P=۰/۲۵۵)، جدول ۱). اما افزایش مدت زمان مواجهه باعث کاهش معنی‌دار میزان فسفوریلاسیون PDGFR-β گشت(P=۰/۰۰۰). به طوری که در روز دوم مواجهه‌ی سلول‌ها با ایماتینیب بیشترین میزان فسفوریلاسیون PDGFR-β (۲/۵۱±۰/۳۹۸) و در روز ششم کمترین میزان فسفوریلاسیون (۱/۲۴±۰/۲۱۷) وجود داشت و در روز چهارم میزان فسفوریلاسیون(۱/۴۵±۰/۲۷۸) در حد بینابینی بود (نمودار ۲، جدول ۲).



نمودار شماره (۲): مقایسه میزان فسفوریلاسیونPDGFR-β در سلول‌های مواجهه یافته با ایماتینیب طی روزها و دوزهای مختلف. *P<0.05 بر اساس تست Tukey بین دوزهای ۲ و ۴، **P<0.05 بر اساس تست Tukey بین دوزهای ۲و۶

بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصله از این مطالعه میزان فسفوریلاسیون PDGFR-α با افزایش دوز دارو و میزان فسفوریلاسیون PDGFR-β با افزایش مدت زمان کاهش نشان داد اما ایماتینیب تأثیری بر میزان آپوپتوز نداشت. در همین راستا McGary و همکارانش با روش ایمونو هیستوشیمی مهار فسفوریلاسیون PDGFR-α و PDGFR-β را در سلول‌های تومور ملانومای موشی نشان دادند(۱۲). همچنین Kiichiro Beppu و همکارانش مهار PDGFR-β توسط ایماتینیب را در سلول‌های نوروبلاستومای انسانی به وسیله روش وسترن بلات و ایمونو هیستوشیمی تایید نموده‌اند(۱۳). از آنجایی که گیرنده‌های فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت آلفا و بتا برای تمایز، مهاجرت و تحریک رشد سلولی مورد نیاز می‌باشند، ایماتینیب با مهار اتو فسفوریلاسیون این گیرنده‌ها باعث می‌شود که سلول‌ها رشد و تقسیم سلولی سریع و نرمالشان را نداشته باشند.

Nurmio و همکارانش نیز نشان دادند که تزریق داخل معده‌ای ایماتینیب در موش‌های صحرایی‌های نابالغ باعث کاهش تکثیر سلول‌های جنسی و القای آپوپتوز در آن‌ها شده، ولی بر سلول‌های سرتولی تأثیری نداشته و این دارو از طریق کاهش شدید سطوح mRNA کد کننده‌ی لیگاندها و گیرنده‌های PDGF پیام‌های مربوطه را مهار می‌کند(۸). با این حال این گروه در مطالعه دیگری نشان دادند که بعد از مواجهه موش‌های صحرایی نر۷-۵ روزه با ایماتینیب و رسیدن آن‌ها به بلوغ، وقتی که جفت گیری با رت‌های ماده طبیعی صورت گرفت، در فرزندان آن‌ها وزن بیضه‌ها در گروه ایماتینیب کاهش یافته ولی سایر مشخصات شامل طول طناب سمینیفر، بافت بینابینی و سلول‌های لایدیگ با گروه کنترل تفاوتی نداشته و سطوحmRNA مربوط به لیگاندها و گیرنده‌های PDGF (α و β) تغیری را نشان نداند(۳). البته این گروه از دانشمندان میزان فسفوریلاسیون گیرنده‌ها را مورد بررسی قرار نداده‌اند. در همین راستا Basciani و همکارانش گزارش کرده‌اند که ایماتینیب باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی لایدیگ موش و نیز تومورهای سلول‌های لایدیگ انسانی و همچنین فسفوریلاسیون گیرنده‌های PDGF و افزایش آپوپتوز در آن‌ها می‌گردد که البته اثرات ایماتینیب با قطع مصرف آن قابل برگشت است(۱۱). مطالعه دیگری توسط همین محققین روی سلول‌های زایا و سرتولی نرمال موش‌های ۱۸روزه رویانی تا ۵ روزه بعد از تولد نشان داد که ایماتینیب از طریق مهار تکثیر و القای آپوپتوز باعث کاهش تعداد گونوسیت‌ها و میزان فسفوریلاسیونPDGFR-β می‌شود (۱۴).

مطالعه‌ی حاضر که بر سلول‌های لایدیگ نرمال موشی متمرکز شده است با گزارشات قبلی مبنی بر اینکه درمان با ایماتینیب منجر به مهار رشد سلولی می‌شود سازگاری دارد. با این حال در این مطالعه میزان آپوپتوز سلولی در سلول‌های نرمال لایدیگ تحت تأثیر ایماتینیب دچار تغییر نگردید. با توجه به اینکه گیرنده‌های فاکتور رشد مشتق از پلاکت در یکی از مسیرهای پیام رسان پایین دستشان آپوپتوز را مهار می‌کنند و ایماتینیب این گیرنده‌ها را مهار می‌کند، بنابراین انتظار می‌رفت که میزان آپوپتوز سلولی افزایش یابد. با این حال عدم افزایش آپوپتوز در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل افزایش فعالیت مسیرهای متفاوت از مسیر ختم شونده به مرگ سلولی مانند پلی(ADP-ribose) پلیمراز اکتیویتی(۱۵) و یا

مهار مسیر اتوفاژی باشد(۱۶). در تائید این ادعا Masayuki و همکارانش گزارش کرده‌اند که ایماتینیب در سلول‌های لوسمی با تحریک مسیر مرگ سلولی برنامه ریزی شده‌ی شبه نکروز (مسیر سرین پروتئازOmi/HtrA2) و نه مسیر آپوپتوز باعث از بین رفتن سلول‌ها می‌گردد(۱۷) ضمناً همچنان که در مطالعه‌ی Basciani و همکارانش اشاره شده، ایماتینیب باعث افزایش برگشت پذیر آپوپتوز می‌گردد که شاید در مطالعه‌ی ما با مدت زمان مواجهه ارتباطی داشته باشد. مسئله‌ی دیگر مربوط به تفاوت نوع سلول‌های مورد مطالعه می‌باشد چرا که در مطالعه‌ی Basciani آپوپتوز سلول‌های سرطانی لایدیگ مورد بررسی قرار گرفته که دارای مسیرهای تیروزین کینازی فعال‌تری هستند در حالی که در مطالعه‌ی ما سلول‌های نرمال مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این مسئله شاید نشان از تأثیرپذیری کمتر سلول‌های نرمال از منظر القای آپوپتوز در مواجهه با داروی ایماتینیب باشد که باید توسط مطالعات کامل‌تر و با مقایسه‌ی مسیرهای پیام رسان متعدد و مسیرهای مرگ سلولی در بین سلول‌های نرمال و سرطانی مورد بررسی بیشتری قرار بگیرد.

تقدیر و تشکر

نتایج گزارش شده در این مطالعه حاصل پایان نامه دانشجوئی است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه جهت حمایت مادی و معنوی از پژوهش حاضر و تمامی اساتید گرامی که ما را در اتمام این پروژه کمک نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Manley P, Cowan-Jacob S, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, et al. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. Eur J Cancer 2002;38 (19-27): 5.
2. Prasad A, Ramnarayan K, Bairy K. Effect of imatinib on histological parameters in male swiss albino mice. int j pharm sci rev res 2010;4(2): 117-22.
3. Mirja N, Kallio J, Jorma T, Kirsi J. Adult reproductive functions after early postnatal inhibition by imatinib of the two receptor tyrosine kinases, c-kit and PDGFR , in the rat testis. Reprod Toxicol 2008;25: 442-6.
4. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. FEBS J 2005;272(22):5723–41.
5. Syed Shoaib AA, Anam B, Ziaur R, Muhammad I, Jafri S. Investigating the potential role of platelet derived growth factor (PDGF). Biotechnology and Molecular Biology 2011;6: 133-41.
6. Lucio G, Alessandra E, Emmanuele AJ, Eleonora C, Marella M, Mario A, et al. Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. J Cell Biology 1995;131: 1105-21.
7. Stefania M, Sabrina B, Mario A, Giovanni S, Lucio G. PDGF and the testis. Trends Endocrinol Metab 2002;13 (1): 11-7.
8. Mirja N, Jorma T, Farasat Z, Anna-Maria A, Jorma P, Olle S, et al. Inhibition of tyrosine kinases PDGFR and C-Kit by imatinib mesylate interferes with postnatal testicular development in the rat. Int J andrology. 2007;30: 366-76.
9. Martee LH, John MF. Imatinib Treatment: Specific Issues Related to Safety, Fertility, and Pregnancy. Leukemia 2003;40(2): 21-5.
10. Seshadri T, Seymour JF, McArthur GA. Oligospermia in a patient receiving imatinib therapy for the hypereosinophilic syndrome. N Engl J Med 2004;351(20):2134–5.
11. Sabrina B, Marina B, Stefania M. Imatinib Mesylate Inhibits Leydig Cell Tumor Growth□: Evidence for In vitro and In vivo Activity Imatinib Mesylate. Cancer Res 2005: 1897-903.
12. McGary EC, Onn A, Mills L, Heimberger A, Eton O, Thomas GW, et al. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor receptor phosphorylation of melanoma cells but does not affect tumorigenicity in vivo. J Invest Dermatol 2004;122(2):400–5.

13. Beppu K, Jaboine J, Merchant MS, Mackall CL, Thiele CJ. Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. J Natl Cancer Inst 2004;96(1):46–55.
14. Sabrina B, Gabriele DL, Susanna D, Marina B, Mario A, Stefania M, et al. Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta-Subtype Regulates Proliferation and Migration of Gonocytes. Endocrinology 2008;149(12): 6226-35.
15. Moehring A, Wohlbold L, Aulitzky WE, van der Kuip H. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activity in imatinib mesylate-induced cell death. Cell Death Differ 2005;12(6):627–36.
16. Takashi S, Keishi F, Oliver Bo, Yasuhiko A, Kouzo M, Naoki S, et al. Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. Int J Cancer 2009;124: 1060-71.
17. Okada M, Adachi S, Imai T, Watanabe K, Toyokuni S, Ueno M, et al. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. Blood 2004;103(6):2299–307.

Original Article

INHIBITION OF GROWTH FACTOR SIGNALING PATHWAYS BY IMATINIB MESYLATE IN MOUSE NORMAL LEYDIG CELLS

Seyyed Mohammad Reza Hashemnia[1], Fatemeh Kheradmand[2], Farzaneh Noori[3], Shiva Roshan-Milani[4]*

Received: 9 Jul, 2013; Accepted: 20 Sep, 2013

Abstract

***Background & Aims*:** Cancer cells proliferation may be mediated by abnormal phosphorylation of signaling pathways downstream of tyrosine kinase receptors such as Platelet derived growth factor receptor α (PDGFR-α) and β (PDGFR-β). We aimed to study the phosphorylation level of PDGFR-α and PDGFR-β and apoptosis in mouse normal leydig cells being exposed to Imatinib.

***Materials & Methods*:** The mouse TM3 leydig cells were treated with 0, 2.5,5,10 and 20 μM Imatinib for 2, 4, and 6 days. The apoptosis and phosphorylation level of PDGFRs were assessed by caspase-3 activities colorimetric and fluorescence immunoassay methods, respectively. For statistical analysis, one-way ANOVA and T-test were performed.

***Results*:** Phosphorylation level of PDGFR-α in the treated (0.21±0.001) and control cells (0.35±0.13) was significantly different ($P<0.05$), and its level decreased with increasing drug dosage ($P<0.05$). PDGFR-β level and apoptosis had no significant differences between groups, although PDGFR-β level decreased significantly with increasing exposure duration ($P<0.05$).

***Conclusion*:** By inhibition of signaling pathways downstream of growth factors specifically PDGFR-α phosphorylation blockage in normal leydig cells, Imatinib may interfere with cellular growth. It seems that this drug has no effect on apoptotic pathways.

***Keywords*:** Apoptosis, Imatinib mesylate, Leydig cells, Platelet derived growth factor receptor

***Address*:** Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia Iran **Tel**: (+98) 9143416660
***E-mail*:** f_kheradmand@umsu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(9): 718 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc Student in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Celluiar and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Assistant professor of Nutritional Physiology Aquaculture, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran*
[4] *Assistant Professor of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*