ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic Effect of Telomerase Catalytic (hTERT) and Nucleotide (hTERC) Subunit Inhibitors on Acute Promyelocytic Leukemia Cells

Atieh Pourbagheri-Sigaroodi[1],
Ava Safaroghli-Azar[2],
Fahimeh Nemati Mansoor[3],
Davood Bashash[4]

[1] MSc in Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran
[2] MSc in Hematology, Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received August 26, 2017 ; Accepted May 7, 2018)

Abstract

Background and purpose: Telomerase activity has a major role in acute promyelocytic leukemia (APL). It also has a critical role in disease recurrence. This research aimed at studying the cytotoxic effects of telomerase inhibition using oligonucleotide-based molecule against human telomerase RNA template (hTERC antisense) and non-nucleoside small molecule targeting catalytic subunit (BIBR5132) on APL-derived cell line.

Materials and methods: To evaluate whether inhibition of telomerase using either hTERC antisense or BIBR5132 could exert cytotoxic effect in APL, NB4 cells were subjected to different concentrations of the inhibitors and subsequent cell viability, metabolic activity, induction of apoptosis were investigated using Trypan blue assay, MTT, and annexin/PI staining, respectively. Also, Caspase-3 enzymatic activity and transcriptional alteration of apoptosis-related target genes were investigated.

Results: We found that targeting telomerase using hTERC antisense (45 pmol/L) and BIBR1532 (75 µL) for 48 h reduced the survival rate of NB4 cells nearly by 30% and 40%, respectively and induced a caspase-3-dependent apoptosis. Our results also suggest that suppression of c-Myc and subsequent increment of Bax/Bcl-2 ratio coupled with decreased telomerase activity may be rational mechanisms for the cytotoxicity of both telomerase inhibitors against NB4 cells.

Conclusion: Current results clearly indicated that both BIBR1532 and hTERC antisense had anti-tumor activity against NB4 cells and anti-telomerase-based therapy may be an efficient treatment for acute promyelocytic leukemia.

Keywords: acute promyelocytic leukemia, apoptosis, NB4 cells, telomerase

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (159): 10-20 (Persian).

* **Corresponding Author: Davood Bashash-** Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۶ آبان سال ۱۳۹۷ (۲۰-۱۰)

اثر سایتوتوکسیک مهارکنندگان زیرواحد کاتالیتیکی (hTERT) و نوکلئوتیدی (hTERC) تلومراز در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد

عطیه پورباقری سیگارودی[۱]
آوا صفراوغلی آذر[۲]
فهیمه نعمتی منصور[۳]
داود بشاش[۴]

چکیده

سابقه و هدف: نقش مهم آنزیم تلومراز در پاتوژنز لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic leukemia) (APL) و هم چنین نقش این آنزیم ترنسکریپتاز معکوس در عود بیماری، ما را بر آن داشت تا اثر سایتوتوکسیک مهار تلومراز با کمک الیگونوکلئوتید مهارکننده زیرواحد نوکلئوتیدی (hTERC antisense) و مولکول کوچک مهارکننده زیرواحد کاتالیتیکی (BIBR1532) را در سلول های مشتق شده از APL مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهت بررسی این که آیا مهار تلومراز با کمک hTERC antisense و BIBR1532 می‌تواند اثر سایتوتوکسیک در APL داشته باشد، سلول‌های NB4 که رده سلولی مشتق شده از APL است، با غلظت‌های مختلف از مهارکنندگان تیمار شدند و سپس زنده‌مانی سلول‌ها، فعالیت متابولیک و القاء آپوپتوز به ترتیب با استفاده از روش‌های تریپان بلو، MTT و رنگ‌آمیزی Annexin/PI ارزیابی شد. هم چنین برای بررسی مکانیسم‌های مولکولی اثر مهارکنندگان، فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ و تغییرات رونویسی از ژن های مرتبط با آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که هدف قرار دادن تلومراز با استفاده از hTERC antisense در غلظت 45 pmol/L و BIBR1532 در غلظت 75 µL میزان بقاء سلول‌های NB4 را پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب به میزان تقریبی ۲۰ و ۴۰ درصد کاهش داده و آپوپتوز وابسته به کاسپاز را در این رده سلولی فعال می‌نماید. هم‌چنین، نتایج نشان دادند که مهار c-Myc و متعاقباً افزایش نسبت بیان Bax/Bcl-2 همراه با کاهش فعالیت تلومراز ممکن است مکانیسم دخیل در بروز اثر سایتوتوکسیک هر دو مهارکننده در سلول‌های NB4 باشند.

استنتاج: نتایج این مطالعه آشکار می‌کند که BIBR1532 و hTERC antisense دارای اثرات ضدلوسمیک در سلول‌های NB4 می‌باشد و درمآن ها برپایه مهار تلومراز می‌تواند برای درمان بیماران مبتلاء به APL مفید باشد.

واژه های کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آپوپتوز، رده سلولی NB4، تلومراز

مقدمه

تلاش‌ها برای گره‌گشایی ازمکانیسم‌های مولکولی که در پدیده مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی و بروز عود سرطان نقش دارند، با سرعت بسیار زیادی در حال پیشرفت می‌باشد و یافته‌های اخیر در این زمینه نشان می‌دهند که

مولف مسئول: داود بشاش- تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir
۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. کارشناسی ارشد خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. دانشیار، گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۶/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۶/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۲/۱۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

یکی از مهم‌ترین سازوکارهای دخیل در نامیرایی سلول‌های سرطانی و مقاومت نسبت به آپوپتوز فعالیت آنزیم تلومراز می‌باشد(۱). تلومراز یک آنزیم ترنسکریپتاز معکوس است که از یک بخش RNA (hTR یا hTERC) و یک بخش کاتالیتیک (hTERT) تشکیل شده است(۲). در اکثر سلول‌های سوماتیک انسانی، آنزیم تلومراز فاقد فعالیت می‌باشد؛ این درحالی است که اکثر سلول‌های سرطانی به دلیل بیان ژن hTERT و ژن‌های وابسته به آن هم چون فاکتور رونویسی c-Myc از فعالیت بالای آنزیم تلومراز برخوردار می‌باشند(۴،۳).

مطالعه پیشین نشان داده است که فعالیت نابه‌جای این آنزیم ترنسکریپتاز معکوس، چه از بدو به وجود آمدن سلول توموری و چه پس از مواجهه با داروهای شیمی‌درمانی، منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ گسترده‌ای می‌شود که از سلول‌های سرطانی در مقابله با اثرات سایتوتوکسیک داروهای شیمی‌درمانی محافظت کرده و مانع بروز آپوپتوز در آن‌ها می‌شود(۵). در بین لیست بلندبالای بدخیمی‌های انسانی که فعالیت آنزیم تلومراز نقش بسیار مهمی در پاتوژنز و هم‌چنین پیش‌آگهی بیماران ایفا می‌کند، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic leukemia)(APL) یکی از شناخته شده‌ترین بدخیمی‌ها می‌باشد. در سال ۲۰۰۸، غفاری و همکارانش نشان دادند که نه تنها فعالیت آنزیم تلومراز در ۹۰درصد از بیماران مبتلاء به این لوسمی بالا می‌باشد، بلکه بین میزان پاسخ به درمان بیماران مبتلاء به APL و فعالیت آنزیم تلومراز نیز ارتباط تنگاتنگی وجود دارد(۶). همچنین آن‌ها گزارش نمودند که میزان فعالیت این آنزیم ترنسکریپتاز معکوس در پیش‌سازهای بدخیم میلوئیدی می‌تواند به عنوان یک پارامتر پروگنوزی برای بیماران APL درنظر گرفته شود(۶). با توجه به نقش مهم این آنزیم به عنوان یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های سلول‌های سرطانی، استفاده از راه‌کارهای درمانی مبتنی بر مهار تلومراز به یکی از قابل بحث‌ترین استراتژی‌های درمانی به خصوص در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد تبدیل شده است. در حال حاضر داروهای متعددی با هدف مهار آنزیم تلومراز به وجود آمده‌اند که بر اساس نوع مهار این آنزیم به چهار دسته الیگونوکلئوتیدهای مهارکننده زیرواحد نوکلئوتیدی (hTERC)، آنالوگ‌های نوکلئوزیدی، مهارکنندگان غیرنوکلئوزیدی (مهارکنندگان زیرواحد کاتالیتیکی) و مهارکنندگان متفرقه تقسیم‌بندی می‌شوند(۷). در بین این مهارکنندگان، دو خانواده مهارکنندگان زیرواحد نوکلئوتیدی و کاتالیتیکی به دلیل اثرات ضدتوموری مطلوب در مطالعات پری‌کلینیکال و کلینیکال بیش از سایرین مورد توجه قرار گرفته‌اند(۸). تعداد بیشماری از مطالعات پری‌کلینیکال روی طیف وسیعی از سلول‌های سرطانی هم‌چون سرطان پروستات، مری، سر و گردن و سینه نیز بر کارایی این مهارکنندگان در کاهش پرولیفراسیون سلول‌های نئوپلاستیک تایید داشته‌اند(۱۲-۹). لازم به ذکر است که بررسی‌های صورت گرفته در خصوص درمان‌های ضدسرطانی مبتنی بر پایه مهار تلومراز نیز به صراحت اعلام کرده‌اند که در اثر مهار تلومراز با استفاده از تداخلات دارویی و یا ژنتیکی، مسیرهایی هم‌چون DNA damage response (DDR) و آپوپتوز فعال می‌شوند و در نتیجه آن‌ها و کوتاه شدن طول تلومر، میزان بقاء سلول سرطانی به صورت قابل توجهی کاهش می‌یابد(۱۳).

با وجود بررسی‌های متعدد در خصوص تاثیر ضدسرطانی داروهای مهارکننده تلومراز، هنوز مکانیسم عمل دقیق این مهارکننده‌ها و هم‌چنین تاثیرات سایتوتوکسیک آن‌ها در بدخیمی‌های هماتولوژیک به درستی مشخص نمی‌باشد و به مطالعات بیش‌تری احتیاج دارد. در این مطالعه، ما بر آن شدیم تا تاثیر ضدلوسمیک دو مهارکننده زیرواحد مختلف آنزیم تلومراز، BIBR1532 (مهارکننده زیرواحد کاتالیتیکی) و الیگونوکلئوتید hTERC antisense (مهارکننده آنتی‌سنس زیرواحد نوکلئوتیدی) را بر رده سلولی مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مورد بررسی قرار دهیم.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

مواد و روش ها

کشت و تیمار سلولی

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) (انستیتو پاستور) در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰درصد FBS، 100 U/ml پنی‌سیلین و 100 µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شدند. به‌علاوه، جهت اطمینان از صحت سلول‌های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RARα با استفاده از تکنیک RQ-PCR برای این سل لاین مورد بررسی قرار گرفت. جهت تیمار سلولی، سلول‌هایNB4 با غلظت‌های مختلف از مهارکننده غیرنوکلئوزیدی زیرواحد کاتالیتیکی (BIBR1532) و مهارکننده زیرواحد نوکلئوتیدی (hTERC antisense) تلومراز در مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. جهت جلوگیری از اثرات حلال روی میزان پرولیفراسیون و بقاء سل‌لاین، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به‌عنوان‌کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه‌گانه انجام شد.

آزمون بررسی میزان جذب سلولی تریپان بلو

به منظور بررسی تاثیر BIBR1532 و hTERC antisense بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های NB4 به تعداد 4.5×10^5 cell/ml در حضور دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط شده، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه آن را انکوباسیون شدند و سپس در چمبرهای مربوط به لام هماسیتومتر قرار داده شده و در زیر میکروسکوپ شمارش شدند. سلول‌هایی که این رنگ را جذب نمودند جزء سلول‌های مُرده و سلول‌هایی که هیچ رنگی را به خود جذب نکردند زنده محسوب شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه شدند:

میزان زنده‌مانی(درصد)= تعداد سلول‌های زنده÷تعداد کل سلول‌ها×(۱۰۰)

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay

برای ارزیابی تاثیر داروهای BIBR1532 و hTERC antisense بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد دارو اضافه و به مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر به سلول‌های داخل پلیت محلول MTT 5mg/ml (سیگما، آمریکا) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور g ۱۰۰۰به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری

به منظور بررسی تاثیر داروهای مهارکننده تلومراز بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، 5×10^5 سلول در هرچاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف از داروی BIBR1532 (۷۵-۱۰ میکرومولار) و hTERC antisense (۴۵-۵ پیکومولار) تیمار گردید. پس از شست وشوی سلول‌ها با بافر فسفات- سالین (PBS) و افزودن معرف‌های AnnexinV-FITC (Roche Applied Science، آلمان)، PI (Roche Applied Science، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (PartecPasIII، آلمان) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار FloMax 2.3 صورت گرفت.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳

برای بررسی این که آیا مرگ سلولی القاء شده توسط BIBR1532 و hTERC antisense در رده سلولی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

NB4 وابسته به کاسپاز می‌باشد، ما فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ را توسط کیت کاسپاز ۳ (سیگما) مورد ارزیابی قرار دادیم. این آزمون براساس تشخیص اسپکتوفتومتریک مولکول p-نیتروآنیلین (p-nitroanilim) (pNA) متصل به انتهای سوبسترای اختصاصی کاسپاز می‌باشد. به طور خلاصه، سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از BIBR1532 و یا hTERC antisense به مدت ۴۸ ساعت تیمار می‌شوند. پس از زمان مورد نظر و سانتریفوژ با دور g۶۰۰ برای مدت ۵ دقیقه، جهت لیز پلت سلولی، بافر لایزات به آن اضافه می‌شود مجدداً با دور g 20000 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌گردد. در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر، ۵ میکروگرم از سوپرناتانت با ۸۵ میکرولیتر بافر assay به همراه ۱۰ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز ۳ به مدت ۲ ساعت در پلیت ۹۶ خانه انکوبه می‌شود. شکست پپتید توسط کاسپاز ۳ منجر به آزاد شدن رنگ pNA می‌شود که با کمک اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۰۵ nm قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

آزمون TRAP

جهت بررسی این که آیا hTERC antisense و BIBR1532 قادر به مهار تلومراز می‌باشند؛ فعالیت آنزیماتیک این ترنسکریپتاز معکوس توسط کیت Telo TAGGG براساس دستورالعمل کیت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، پس از استخراج پروتئین سلولی توسط بافر لایز و سانترفیوژ آن، پروتئین استخراج شده توسط آزمون TRAP (Telomeric repeat amplification protocol) بررسی شد. محصولات تلومراز تکثیر شده به همراه باندهای ladder بر روی ژل ۸ درصد پلی‌آکریل‌آمید با کمک رنگ‌آمیزی نیترات نقره (سیگما) قابل مشاهده شدند. آنالیز تصویر ژل با کمک نرم‌افزار Quantity One و Multi-analyst (Bio-Rad Laboratories) انجام شد. درصد مهار تلومراز از طریق مقایسه فعالیت تلومراز سلول‌های تیمار شده با دارو و سلول‌های گروه کنترل محاسبه شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real-time PCR

Total RNA پس از مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها با داروها به وسیله کیت استخراج RNA (High pure RNA Isolation Kit, Roche) طبق پروتکل شرکت سازنده صورت پذیرفت. سپس به منظور بررسی خلوص RNA استخراج شده نسبت جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد به منظور ساخت cDNA، از کیت سنتز cDNA (revertAid first strand cDNA Synthesis Kit, Takara Bio) برطبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی هر یک از ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی و اختصاصیت توالی آن‌ها با Primer Blast در سایت NCBI مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول شماره ۱).

در ادامه، بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر با تکنیک Real-time PCR توسط دستگاه Light-cycler (Roche) مورد ارزیابی قرار گرفت و شرایط مربوط به سیکل‌های حرارتی شامل: مرحله فعال‌سازی (۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، در مرحله بعد دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اکستنشن (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) به تعداد ۴۰ سیکل،

جدول شماره ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Real-time PCR

ژن	آغازگر مستقیم (3'-5')	آغازگر معکوس (3'-5')	سایز (bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲
Bcl-2	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	۹۰
c-Myc	GTCAAGAGGCGAACACACAAC	TTGGACGGACAGGATGTATGC	162
Survivin	CCAGATGACGACCCCATAGAG	TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT	۱۵۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

می‌باشد. آنالیز منحنی ذوب نیز به منظور ارزیابی میزان اختصاصیت محصولات تولید شده صورت پذیرفت و در نهایت با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ میزان نسبی نسخه‌های mRNA بیان‌کننده ژن‌های مورد نظر محاسبه گردید.

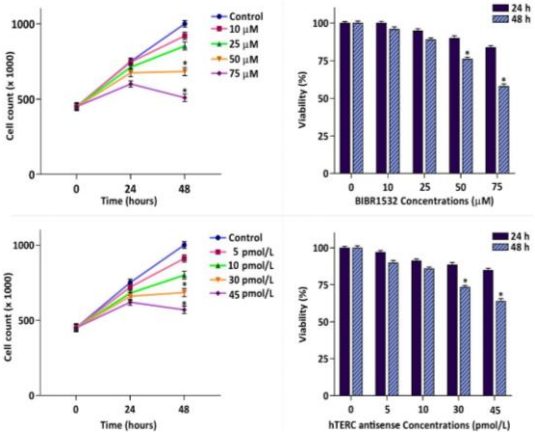
آنالیز آماری

به منظور تحلیل داده‌های به دست آمده از نسخه ۲۳ نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. داده‌های ارائه شده حاصل mean±SD نتایج به دست آمده از ۳ آزمون جداگانه می‌باشند. میزان اختلاف معنی‌دار بین داده‌های به دست آمده را به‌وسیله آزمون t (t-test) مورد ارزیابی قرار دادیم. میزان اختلاف معنی‌دار داده‌های تحلیل شده به صورت *، بیانگر $p < ۰/۰۵$ می‌باشد.

یافته ها

مهارکنندگان زیرواحد کاتالیتیکی و نوکلئوتیدی تلومراز میزان بقاء و پرولیفراسیون سلول‌های NB4 را کاهش می‌دهند

جهت بررسی تاثیر مهار آنزیم تلومراز در کاهش میزان بقاء و پرولیفراسیون سلول‌های مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیت حاد، بر آن شدیم تا سلول‌های رده سلولی NB4 را با دو مهارکننده مختلف تلومراز، مهارکننده زیرواحد کاتالیتیکی (BIBR1532) و مهارکننده زیرواحد نوکلئوتیدی (hTERC antisense) تیمار نماییم و سپس درصد زنده‌مانی و میزان تکثیر سلول‌ها را توسط تست تریپان‌بلو مورد ارزیابی قرار دهیم. نتایج به دست آمده حاکی از آن بودند که تیمار ۴۸ ساعته سلول‌ها با هر دو مهارکننده تلومراز به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها و هم‌چنین شمار سلول‌های زنده می‌گردد (تصویر شماره ۱). همان‌طور که نشان داده شده است، داروی BIBR1532 در دوزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار در طی ۴۸ ساعت توانست میزان بقاء سلول‌های NB4 را به ترتیب ۴، ۱۱، ۲۳/۸ و ۴۲درصد کاهش دهد. درخصوص hTERC antisense نیز نتایج حاکی از آن بود که اگرچه دوزهای پایین از مهارکننده (۵ و ۱۰ پیکومولار) تاثیر چندانی بر میزان بقاء سلول‌های NB4 نمی‌گذارد؛ تیمار سلول‌ها با دوزهای بالاتر (۳۰ و ۴۵ پیکومولار) از این الیگونوکلئوتید به صورت معناداری درصد زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد (تصویر شماره ۱).



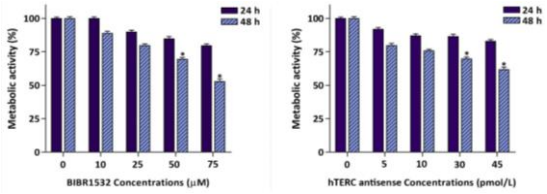
تصویر شماره ۱: کاهش درصد زنده مانی و شمار سلول های زنده متعاقب تیمار رده سلولی NB4 با مهارکنندگان تلومراز BIBR1532 و hTERC antisense. هر دو مهارکننده تلومراز به صورت وابسته به دوز و زمان میزان بقاء و تکثیر سلول های NB4 را کاهش دادند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و *p* value به دست آمده (*، بیانگر $p<۰/۰۵$) نشان گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

کاهش فعالیت متابولیک سلول های NB4 متعاقب مهار تلومراز

به منظور بررسی این که آیا مهار تلومراز در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) می‌تواند منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌ها شود؛ سلول‌های NB4 با دوزهای افزاینده از BIBR1532 و hTERC antisense تیمار شدند و سپس میزان فعالیت متابولیک آن‌ها توسط تست کالریمتری MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهند که مهار تلومراز خواه از طریق زیرواحد کاتالیتیکی و خواه از طریق زیرواحد نوکلئوتیدی با کاهش فعالیت متابولیکی به صورت وابسته به دوز و زمان همراه می‌باشد (تصویر شماره ۲). به طوری که تیمار سلول‌ها با بالاترین دوز از BIBR1532 (۷۵ میکرومولار) و hTERC antisense

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

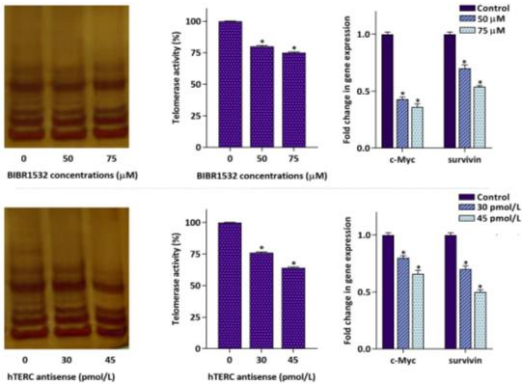
(۴۵ پیکومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب به میزان ۴۷ و ۳۸درصد کاهش می‌دهد و بدین ترتیب هر دو مهارکننده اثرات سایتوتوکسیک خود را در این رده سلولی اعمال می‌نمایند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: بررسی فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 پس از تیمار با دوزهای مختلف BIBR1532 و hTERC antisense. مهار تلومراز در رده سلولی NB4 خواه از طریق زیرواحد کاتالیتیکی و خواه از طریق زیرواحد نوکلئوتیدی منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌ها می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، بیانگر $p < ۰/۰۵$ نشان‌گر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

تیمار سلول‌های NB4 با BIBR1532 و hTERC antisense منجر به کاهش فعالیت آنزیم تلومراز به صورت وابسته به دوز می‌شود

جهت تعیین تاثیر BIBR1532 و hTERC antisense بر فعالیت تلومراز، ما سلول‌های NB4 را با غلظت‌های مختلف از دو مهارکننده تیمار نمودیم و سپس درصد مهار فعالیت آنزیم تلومراز توسط آزمون TRAP مورد ارزیابی قرار دادیم. تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های NB4 با مهارکننده کاتالیتیکی تلومراز در دوزهای ۵۰ و ۷۵ میکرومولار به صورت قابل توجهی از فعالیت آنزیم تلومراز جلوگیری می‌نماید (تصویر شماره ۳). مشابه رفتار BIBR1532، مهارکننده زیرواحد نوکلئوتیدی نیز توانست میزان فعالیت آنزیم تلومراز را در دوز ۴۵ پیکومولار از خود تقریباً حدود ۳۶درصد کاهش دهد (تصویر شماره ۳). در ادامه، به منظور تایید نتایج به دست آمده از آزمون TRAP در خصوص مهار تلومراز توسط هر دو دارو، میزان بیان دو ژن مهم در تنظیم فعالیت تلومراز، c-Myc و survivin نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از Real-time PCR نشان داد که میزان بیان هر دو ژن در پاسخ به BIBR1532 و hTERC antisense به صورت کاملاً معنی‌داری کاهش یافت (تصویر شماره ۳) که خود تاییدی بر مهار آنزیم تلومراز در سلول‌های مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می‌باشد.



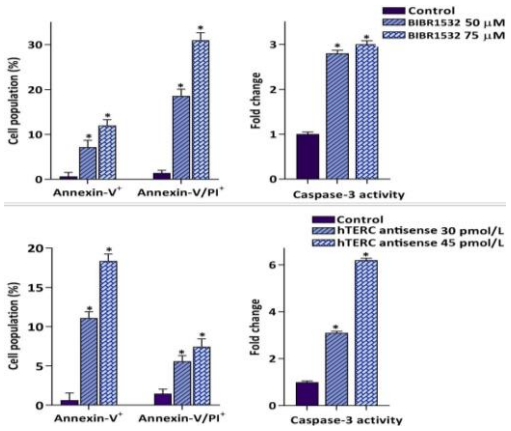
تصویر شماره ۳: بررسی فعالیت آنزیم تلومراز و ژن های کنترل‌کننده آن در رده سلولی NB4 پس از تیمار با BIBR1532 و hTERC antisense. هر دو دارو به صورت وابسته به دوز قادر به کاهش فعالیت آنزیم تلومراز در رده سلولی می‌باشند. جهت بررسی تاثیر مهارکنندگان بر بیان ژن های تنظیم‌کننده فعالیت تلومراز، سلول‌های NB4 با دوزهای ۵۰ و ۷۵ میکرومولار از داروی BIBR1532 و ۳۰ و ۴۵ پیکومولار از داروی hTERC antisense تیمار شدند و سپس بیان دو ژن c-Myc و survivin با تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، بیانگر $p < ۰/۰۵$ نشان‌گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

مهار تلومراز منجر به القاء آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۳ در سلول‌های NB4 می‌شوند

با توجه به این که داروهای ضدتوموری اثرات خود را یا از طریق فعال کردن مسیرهای آپوپتوزی و یا ایجاد توقف در چرخه سلولی اعمال می‌نمایند، بر آن شدیم تا تاثیر این مهارکنندگان تلومراز را بر القاء مرگ سلولی وابسته به آپوپتوز در رده سلولی NB4 توسط آزمون Annexin/PI assay مورد ارزیابی قرار دهیم. پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

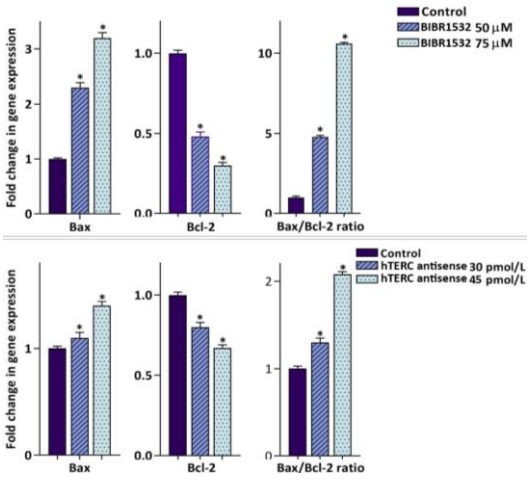
دارو میزان خروج فسفاتیدیل‌سرین در سطح سلول‌ها با روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از فلوسایتومتری، از افزایش آپوپتوز القاء شده متعاقب تیمار با هر دو مهارکننده حکایت دارد. هر دو دارو نه تنها باعث افزایش درصد سلول‌های Annexin-V مثبت شدند؛ بلکه درصد سلول‌های Annexin-V/PI مثبت را نیز افزایش دادند ($p<۰/۰۵$) (تصویر شماره ۴). در ادامه، جهت بررسی این که آیا آپوپتوز القاء شده توسط هر دو مهارکننده تلومراز از طریق فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ صورت می‌گیرد، سلول‌های NB4 را با دوزهای مشابهی که برای آزمون Annexin/PI assay استفاده شده بود، تیمار کردیم و پس گذشت ۴۸ ساعت میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ را توسط کیت Caspase-3 assay مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج این آزمون نیز نشان داد که مهار تلومراز در سلول‌های NB4 با فعال شدن وابسته به دوز آنزیم کاسپاز ۳ همراه است (تصویر شماره ۴) و احتمالاً هر دو مهارکننده تلومراز، آپوپتوز را در این رده سلولی از طریق مسیرهای وابسته به کاسپاز فعال می‌نمایند.



تصویر شماره ۴: القاء آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۳ در رده سلولی NB4 پس از تیمار با BIBR1532 و hTERC antisense. سلول ها با داروی BIBR1532 (۵۰ و ۷۵ میکرومولار) و داروی hTERC antisense (۳۰ و ۴۵ پیکومولار) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس القاء آپوپتوز و فعالیت‌آنزیماتیک کاسپاز ۳ مورد ارزیابی قرارگرفت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean±SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، بیانگر $p<۰/۰۵$) نشان گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

تیمار سلول‌های NB4 با BIBR1532 و hTERC antisense باعث افزایش بیان ژن های پروآپوپتوتیک و کاهش بیان ژن های آنتی‌آپوپتوتیک می‌شود

در این مطالعه به منظور بررسی این که آیا مرگ سلولی القاء شده توسط مهار تلومراز در رده سلولی NB4 با تغییر در فعالیت رونویسی ژن های مهم دخیل در آپوپتوز همراه می‌باشد؛ سلول‌ها برای مدت زمان ۴۸ ساعت با داروی BIBR1532 (۵۰ و ۷۵ میکرومولار) و داروی hTERC antisense (۳۰ و ۴۵ پیکومولار) تیمار شدند و سپس سطح بیان برخی از ژن آنتی‌آپوپتوتیک (Bcl-2) و پروآپوپتوتیک (Bax) به وسیله‌تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که مواجه سلول‌های NB4 با داروهای مهارکننده تلومراز با افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 همراه بوده است (تصویر شماره ۵). هم‌چنین، به دلیل افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول‌های مواجه شده با هریک از مهارکنندگان تلومراز نسبت به سلول‌های کنترل با افزایش همراه بوده که این مسئله نیز با افزایش میزان آپوپتوز خود را نشان داده است (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: تغییرات ژن های مرتبط با آپوپتوز پس از تیمار سلول های NB4 با BIBR1532 و hTERC antisense. هر دو مهارکننده تلومراز منجر به افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax و هم چنین کاهش ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 شدند. این دو دارو در نهایت با افزایش نسبت بیان ژن های Bax و Bcl-2 منجر به القاء آپوپتوز در این رده سلولی شدند. میانگین و انحراف

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، بیانگر $p < ۰/۰۵$) نشان گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو مهارکننده تلومراز قادر به کاهش میزان بقاء و پرولیفراسیون سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز می‌باشند. هم‌چنین هر دو دارو با مهار میزان فعالیت متابولیک سلولی می‌توانند اثرات سایتوتوکسیک خود را اعمال نمایند؛ به طوری که در تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های NB4 با BIBR1532 در دوز ۷۵ میکرومولار و hTERC antisense در غلظت ۴۵ پیکومولار میزان بقاء سلول‌های NB4 بیش از ۴۰درصد کاهش می‌یابد. مشابه چنین یافته‌ای در مطالعه‌ای روی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد نیز مشخص شده بود که مهار زیرواحد کاتالیتیکی تلومراز می‌تواند در کوتاه مدت منجر به کاهش میزان بقاء سلول‌های Pre-B ALL گردد(۱۴). هم‌چنین در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که مهار تلومراز نه تنها می‌تواند از میزان بقاء سلول‌های توموری بکاهد، بلکه قادر به تشدید اثرات سایتوتوکسیک داروهای شیمی‌درمانی نیز می‌باشد(۱۹-۱۵). بررسی میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌های NB4 و هم چنین بررسی فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ در تحقیق ما نشان داد که که مهار فعالیت آنزیم تلومراز خواه از طریق مهار زیرواحد کاتالیتیکی و خواه از طریق زیرواحد نوکلئوتیدی منجر به القاء آپوپتوز وابسته به مسیر کاسپاز ۳ در سلول‌های لوسمی پرومیولوسیتیک حاد می‌گردد. نتایج به دست آمده درمطالعه پیشین حاکی از آن بودکه در حدود ۹۰درصد از موارد لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL)، بیماران دارای طول TRF (Terminal restriction fragment) کوتاهی می‌باشند که نشان‌دهنده توانایی قابل توجه سلول‌های لوسمیک در تکثیر و پیشرفت بیماری می‌باشد(۶). لازم به ذکر است که میزان عود بیماری و از آن مهم‌تر بروز پدیده مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی در آن دسته از بیمارانی که فعالیت تلومراز بالاتری می‌باشند، بیش‌تر از سایر بیماران می‌باشد(۶). بر اساس این یافته‌ها، به نظر می‌رسد که بیماران مبتلاء به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد کاندیدهای مناسبی برای درمان‌هایی با اساس مهار تلومراز می‌باشند(۲۰).

در بین مولکول‌هایی که در تنظیم مرگ سلولی نقش دارند، فاکتور رونویسی c-Myc یکی از شناخته شده‌ترین مولکول‌هایی می‌باشد که علاوه بر این که قادر به کنترل پرولیفراسیون سلولی است، می‌تواند با تاثیر بر میزان رونویسی ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک هم‌چون survivin و Bcl-2 بروز آپوپتوز را در سلول‌ها نیز تنظیم نماید(۲۱). هم‌چنین، مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که فاکتور رونویسی c-Myc یک تنظیم‌کننده بسیار مهم تلومراز می‌باشد و از طریق مهار بیان ژن survivin می‌تواند منجر به افزایش فعالیت تلومراز در سلول‌های سرطانی گردد(۲۲). لازم به ذکر است که نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که مهار آنزیم تلومراز در سلول‌های NB4 نه تنها با کاهش بیان ژن‌های c-Myc و survivin همراه بود، بلکه منجر به افزایش نسبت ژن پروآپوپتوتیک Bax به ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 می‌گردد. بر همین اساس، یک تفسیر احتمالی از نتایج به دست آمده در این بررسی می‌تواند به این صورت باشد که احتمالاً هر دو مهارکننده BIBR1532 وhTERC antisense از طریق تغییر میزان بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های رده NB4 گشته و در نهایت اثر سایتوتوکسیک خود را از طریق فعال نمودن مرگ سلولی با واسطه آپوپتوز در این رده سلولی اعمال نموده است. نکته جالب توجه آن که اخیراً مشخص شده است‌که مهار مسیرهای مهم دخیل در پاتوژنز APL هم‌چون مهار مسیر پیام‌رسانیPI3K می‌تواند از طریق مهار آنزیم تلومراز باعث القا اثرات سایتوتوکسیک در رده سلولی NB4 گردد(۲۳)؛ هر چند که اثرات سایتوتوکسیک مستقل از مهار تلومراز نیز متعاقب مهار

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

PI3K در سلول‌های لوسمیک APL نیز گزارش شده است(۲۵،۲۴). درکل نتایج این بررسی نشان می‌دهد که مهار آنزیم تلومراز چه از طریق زیرواحد کاتالیتیکی و چه از طریق زیرواحد نوکلئوتیدی منجر به کاهش میزان بقا و پرولیفراسیون سلول‌های لوسمیک می‌شود. هم‌چنین، هر دو مهارکننده احتمالاً از طریق کاهش بیان c-Myc و برهمزدن تعادل بین میزان بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک منجر به بروز آپوپتوز در رده سلولی NB4 می‌گردد. با توجه به نقش ثابت شده تلومراز در میزان پاسخ به درمان بیماران مبتلاء به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد و هم چنین نتایج به دست آمده از این پژوهش، به نظر می‌رسد استفاده از مهارکنندگان تلومراز راهکار درمانی مناسبی جهت درمان این بیماران باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تامین بودجه تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Cech TR. Beginning to understand the end of the chromosome. Cell 2004; 116(2): 273-279.
2. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. Science 1995; 269(5228): 1236-1241.
3. Wojtyla A, Gladych M, Rubis B. Human telomerase activity regulation. Mol Biol Rep 2011; 38(5): 3339-3349.
4. Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc. An update. Mutat Res Res 2000; 462(1): 31-47.
5. Moriarty TJ, Dupuis S, Autexier C. Rapid upregulation of telomerase activity in human leukemia HL-60 cells treated with clinical doses of the DNA-damaging drug etoposide. Leukemia 2002; 16(6): 1112- 1120.
6. Ghaffari SH1, Shayan-Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Ann Oncol 2008; 19(11): 1927-1934.
7. De Cian A, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou JF, et al. Targeting telomeres and telomerase. Biochimie 2008; 90(1): 131-155.
8. Shay JW, Wright WE. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. Nature Reviews Drug Discov 2006; 5(7): 577-584.
9. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N, Kauffmann I, Priepke H, et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. EMBO J 2001; 20(24): 6958-6968.
10. Kondo Y, Koga S, Komata T, Kondo S. Treatment of prostate cancer in vitro and in vivo with 2-5A-anti-telomerase RNA component. Oncogene 2000; 19(18): 2205-2211.
11. Shammas MA, Koley H, Bertheau RC, Neri P, Fulciniti M, Tassone P, et al. Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo. Leukemia 2008; 22(7): 1410-1418.
12. Xiang-Kui F, Rui-Hua Y, Bao-Jiang L, Xiang- Ming C, LIN W, et al. Antisense oligodeoxynucleotide against human telomerase reverse transcriptase inhibits the proliferation of Eca-109 esophageal carcinoma cells. Exp Ther Med 2014; 8(4): 1247-1252.
13. Feldser DM, Hackett JA, Greider CW. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. Nat Rev Cancer 2003; 3(8): 623-627.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]

14. Bashash D, Ghaffari SH, Mirzaee R, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase inhibition by non-nucleosidic compound BIBR1532 causes rapid cell death in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. Leuk Lymphoma 2013; 54(3): 561-568.
15. Bashash D, Zareii M, Safaroghli-Azar A, Omrani MD, Ghaffari SH. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. Hematology 2017; 22(6): 1-11.
16. Ward RJ, Autexier C. Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. Mol Pharmacol 2005; 68(3): 779-786.
17. Meng E, Taylor B, Ray A, Shevde LA, Rocconi RP. Targeted inhibition of telomerase activity combined with chemotherapy demonstrates synergy in eliminating ovarian cancer spheroid-forming cells. Gynecol Oncol 2012; 124(3): 598-605.
18. Bashash D, Ghaffari SH, Zaker F, Kazerani M, Hezave K, Hassani S, et al. BIBR 1532 increases arsenic trioxide-mediated apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells: therapeutic potential for APL. Anticancer Agents Med Chem 2013; 13(7): 1115-1125.
19. Asghari-Kia L, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Momeny M, Hamidpour M, Ghaffari SH. Targeting human telomerase RNA component using antisense oligonucleotide induces rapid cell death and increases ATO-induced apoptosis in APL cells. Eur J Pharmacol 2017; 809: 215-223.
20. Shay JW, Keith WN. Targeting telomerase for cancer therapeutics. Br J Cancer 2008; 98(4): 677-683.
21. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. Mol Cell Biol 1999; 19(1): 1-11.
22. Endoh T, Tsuji N, Asanuma K, Yagihashi A, Watanabe N. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1-and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription. Exp Cell Res 2005; 305(2): 300-311.
23. Bashash D, Delshad M, Safaroghli-Azar A, Safa M, Momeny M, Ghaffari SH. Novel pan PI3K inhibitor-induced apoptosis in APL cells correlates with suppression of telomerase: An emerging mechanism of action of BKM120. Int J Biochem Cell Biol 2017; 91(Pt A): 1-8.
24. Bashash D, Safaroghli-Azar A, Delshad M, Bayati S, Nooshinfar E, Ghaffari SH. Inhibitor of pan class-I PI3K induces differentially apoptotic pathways in acute leukemia cells: Shedding new light on NVP-BKM120 mechanism of action. Int J Biochem Cell Biol 2016; 79: 308-317.
25. Bashash D, Safaroghli-Azar A, Dadashi M, Safa M, Momeny M, Ghaffari SH. Anti-tumor activity of PI3K-δ inhibitor in hematologic malignant cells: Shedding new light on resistance to Idelalisib. Int J Biochem Cell Biol 2017; 85: 149-158.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-25]