

Original Article

Study of cytotoxicity and cell death of an active compound from prazinoic acids in chronic myeloid leukemia K562 cell line

Halimeh Beignezhad¹, Mehdi Mohammadzadeh², Majid Mahdavi^{3*}, Hossein Mostafavi⁴

¹Msc Student of Biochemistry, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran

²Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran

³Department of Biology, School of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴Department of Organic Chemistry and Biochemistry, School of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: maj.mahdavi@gmail.com, majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

Received: 6 May 2017 Accepted: 24 July 2018 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):14-21

Abstract

Background: Nowadays, more than 100 types of cancer are known worldwide, which leukemia is one of the most common type. Chronic myeloid leukemia (CML) is one of the most recognized forms of leukemia, accounting for between 15% and 20% of total leukemia. Efforts to find new synthetic compounds are one of the basic strategies for finding new drugs for CML treatment. The purpose of this study was to investigate the effects of growth suppression and induction of apoptosis (family of pyrazinoic acid) on the cancer cell line of K562 leukemia.

Methods: In this study, the effect of a certain concentration of 2-oxo-1, 2-diphenylethyl-pirazine-2-carboxylate (2 DP.P) was evaluated on the growth, cell cycle and induction of apoptosis of K562 cells using various techniques. MTT test was used to investigate the effects of 2-DP.P on cell viability. For this purpose, 5×10^4 of K562 cells were cultured at concentrations of 25-100 μ M from the 2-DP.P for 24, 48 and 72 hours intervals. Electrophoresis, fluorescence microscopy and flow cytometry were used for analysis of apoptosis.

Results: The 2-DP.P inhibited dose and time dependently growth in K562 cells. IC₅₀ of the compound was calculated 25 μ M. Also, data from fluorescence microscopy, DNA fragmentation and cell cycle analysis confirmed the reduction of viability and induction of apoptosis by the compound.

Conclusion: due to the effects of growth inhibition and induction of apoptosis by the 2-DP.P, this compound can be suggested as a new and effective compound for further studies in treating patients with leukemia.

Keyword: Apoptosis, 2-DP.P, Cytotoxicity, K562 cell.

How to cite this article: Beignezhad H, Mohammadzadeh M, Mahdavi M, Mostafavi H. [Study of cytotoxicity and cell death of an active compound from propionic acids in chronic myeloid leukemia K562 cell line]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):14-21. Persian.

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ترکیب فعالی از خانواده ی پیرازینوئیک اسیدها بر سمیت و مرگ سلولی در رده ی سلولی لوسمی میلوئید مزمن K562

حلیمه بیگ نژاد^۱، مهدی محمد زاده^۲، مجید مهدوی^{۳*}، حسین مصطفوی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۴ گروه شیمی آلی و بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسوول: ایمیل: maj.mahdavi@gmail.com و majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۲۱-۱۴

چکیده

زمینه: امروزه بیش از ۱۰۰ نوع سرطان در دنیا شناخته شده است که از میان آن ها لوسمی یا سرطان خون یکی از شایع ترین سرطان ها است. لوسمی میلوئید مزمن (CML) از شناخته شده ترین اشکال لوسمی می باشد که ۱۵ تا ۲۰ درصد کل لوسمی ها را شامل می شود. امروزه تلاش ها برای یافتن ترکیبات سنتزی جدید یکی از استراتژی های پایه جهت یافتن داروهای جدید برای درمان CML است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ترکیبی از خانواده پیرازینوئیک اسیدها بر روی رده سلولی سرطانی لوسمی K562 می باشد.

روش کار: در بررسی حاضر، اثر غلظت معینی از ترکیب *2-DP.P* (2-*oxo-1,2-diphenylethyl pyrazine-2-carboxylate*) بر روی رشد، چرخه سلولی و القای آپوپتوز سلول های K562 با استفاده از تکنیک های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی اثرات ترکیب *2-DP.P* بر میزان زیستایی سلول، آزمون MTT به کار گرفته شد. بدین منظور تعداد 5×10^4 از سلول های K562 در غلظت های ۲۵-۱۰۰ میکرومولار از ترکیب *2-DP.P* در فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. و برای آنالیز آپوپتوز سلولی، الکتروفورز، میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتومتری استفاده شدند.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب *2-DP.P* باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول های K562 میشود. *IC50* ترکیب ۲۵ میکرومولار محاسبه شد. همچنین، داده های حاصل از میکروسکوپ فلورسانس، آزمون قطعه قطعه شدن DNA و سیکل سلولی، کاهش زیستایی و مرگ سلولی از نوع آپوپتوز را توسط این ترکیب تایید کرد.

نتیجه گیری: به طور کلی با توجه به اثرات مهار رشد و القای آپوپتوز توسط ترکیب *2-DP.P* می توان این ترکیب را به عنوان ترکیبی جدید و موثر برای مطالعات بیشتر در درمان بیماران لوسمی پیشنهاد کرد.

کلیدواژه ها: آپوپتوز، 2-DP.P، سمیت، رده سلولی K562

نحوه استناد به این مقاله: بیگ نژاد ح، محمد زاده م، مهدوی م، مصطفوی ح. اثر ترکیب فعالی از خانواده ی پیرازینوئیک اسیدها بر سمیت و مرگ سلولی در رده ی سلولی لوسمی میلوئید مزمن K562. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۱(۲): ۲۱-۱۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سرطان نام گروهی از بیماری‌های مرتبط به هم می‌باشد که در همه‌ی آن‌ها رشد بی‌رویه و گسترش غیرطبیعی سلول‌ها را داریم (۱و۲). امروزه بیش از صد نوع مختلف سرطان در دنیا شناخته شده است که لوسمی یا سرطان خون یکی از انواع مهلک و شایع آن‌ها می‌باشد (۳و۴). لوسمی میلوئیدی مزمن که ۱۵-۲۰ درصد از انواع لوسمی‌ها را شامل می‌شود، یک اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خون ساز است که منجر به تظاهر کروموزوم فیладельیا (t 9:22) یا ژن bcr-abl در سلول‌های آسیب دیده می‌شود. این کروموزوم موجب ساخته شدن آنزیمی به نام تیروزین کیناز در مغز استخوان می‌شود که این آنزیم به نوبه خود موجب تبدیل تعداد بسیار زیادی سلول بنیادی به گلبول‌های سفید (گرانولوسیت‌ها یا بلاست‌ها) می‌شود. این پروتئین هیبریدی، آپوپتوز را مهار می‌کند و همچنین کلید فرمان تقسیم سلولی را همیشه در حالت «روشن» نگه می‌دارد و بدین ترتیب، تقسیم سلولی بطور غیرقابل‌کنترلی انجام می‌شود. افزایش تعداد گلبول‌های سفید و سلول‌های نابالغ مثل میلوئوسیت‌ها در خون محیطی از جمله تظاهرات بیماری است. تعداد پلاکت‌ها معمولاً افزایش یافته، امکان وجود بازوفیلی و بزرگی طحال نیز شایع می‌باشد (۵و۶). این بیماری به طور معمول افراد میانسال را درگیر می‌کند و ۱۵-۲۰٪ از لوسمی‌های بزرگسالان می‌باشد. میزان بروز آن تا اواسط دهه‌ی پنجم زندگی به کندی می‌باشد، ولی در بین ۴۰-۵۰ سالگی میزان بروز به سرعت افزایش می‌یابد. این بیماری شامل سه فاز مزمن، تسریع شده و بلاستیک می‌باشد. ۸۵٪ از بیماران در فاز مزمن تشخیص داده می‌شوند و بعد از ۳-۵ سال به سمت فاز تسریع شده و بحران بلاستیک پیشرفت می‌کنند. پس از مرحله بلاستیک بیماران بین ۳-۶ ماه زنده می‌مانند (۷).

تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است مانند درمان با شیمی درمانی، درمان با اینترفرون الفا و پیوند مغز استخوان. یکی از روش‌های درمانی استفاده از ترکیبات سنتتیک شیمیایی می‌باشد. با توجه به فاکتور مقاومت دارویی در رده‌های سرطان سلول‌های خونی، تلاش‌های گسترده‌ای برای یافتن داروهای شیمیایی خاص جهت مهار رشد و از بین بردن این سلول‌های بدخیم به کار رفته است. تاکنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی به چشم می‌خورد. خصوصاً که افزایش یافته‌های ما در مورد دانش بیولوژی تومور، مکانیسم‌های عمل داروها را برای ما روشن‌تر کرده است. این موضوع همچنین پایه‌ای برای طراحی منطقی‌تر داروهای ضد سرطان بوده است (۸).

پیرازین‌ها ترکیبات نیتروژن دار آروماتیک هستند که توسط یک ساختار حلقه‌ای شامل چهار کربن با دو نیتروژن در موقعیت ۱ و ۴ مشخص می‌شوند (۹). مشتقات پیرازین دارای محدوده وسیعی

از فعالیت‌های بیولوژیک هستند. آن‌ها در ترکیبات متنوعی مانند آسپرژیلیک اسید، هیدروکسی آسپرژیلیک اسید و دیگر آنتی بیوتیک‌های دارای ساختار مشابه که دارای فعالیت‌های آنتی باکتریایی هستند یافت می‌شوند. سنتز مشتقات پیرازین تنوع وسیعی از ویژگی‌های دارویی را نشان می‌دهد (۱۰). پیرازینامید یک پیش دارو برای درمان سل هست که به نظر می‌رسد در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اثر آنزیم پیرازینامیداز به پیرازینوئیک اسید تبدیل شده و آنزیم سازنده‌ی اسید چرب را مهار می‌کند. از آنجا که اسیدهای چرب برای سنتز غشای سلولی مایکوباکتری‌ها ضروری هستند در نتیجه باعث مرگ باکتری می‌شوند (۱۱). طی یک سری از آزمایشات انجام گرفته نشان داده شد که ۵-۲-alkyl-ferrocenyl-6, 7-dihydropyrazolo[1,5-a]pyrazine-4(5h)-one به طور موثری می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی A544 ریه القا کند (۱۲). همچنین مشتقاتی از 2-Imidazo[1,2-a]pyrazine از طریق مهار CAMP توسط یک فسفودی استراز می‌توانند تکثیر سلول‌های Dami را مهار کنند (۱۳). در مطالعاتی دیگر مشخص شده است که imidazo[1,2-a]pyrazine و مشتقاتش فعالیت‌های ضد تکثیری، تفکیکی و آپوپتوزی دارند. با توجه به این تحقیقات احتمالاً می‌توان از پیرازینوئیک اسیدها و مشتقات آن‌ها نیز برای تهیه‌ی داروهای ضد سرطان استفاده کرد (۱۴).

سلول‌های K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشا میلوئیدی هستند که نخستین بار در یک خانم ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون شناسایی شدند. این رده‌ی سلولی به علت برخی ویژگی‌های خاص در مطالعات آزمایشگاهی بیشتر استفاده می‌شوند (۱۵و۱۶). در مطالعه‌ی حاضر از رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) استفاده شد. ترکیب مورد مطالعه 2-oxo-1,2-diphenylethyl pyrazine-2-carboxylate (2-DP.P) می‌باشد که جزئی از خانواده‌ی پیرازینوئیک اسیدها است و در آزمایشگاه تحقیقاتی دکتر حسین مصطفوی واقع در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز سنتز شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهار رشد و القای آپوپتوز این ترکیب بر روی رده‌ی سلولی K562 می‌باشد.

روش کار

برای تهیه غلظت‌های مختلف دارو از ترکیب 2-oxo-1,2-diphenylethyl pyrazine-2-carboxylate (2-DP.P) ابتدا با توجه به وزن مولکولی آن، از پودر آن برای غلظت ۱۰ میلی مولار وزن و سپس در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) (سیناژن، تهران) حل شد. سپس از این استوک غلیظ، و با توجه به روابط استوکیومتری مقدار حجم مشخصی از آن برداشته شد و برای

گردید. نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شده و در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در این مرحله سه فاز درون میکروتیوب ایجاد می گردد که فاز بالا محتوی DNA می باشد. فاز بالا به میکروتیوب دیگری منتقل شده و برابر با حجم آن ایزوپرانول سرد روی محلول ریخته شد و به آرامی سر و ته گردید، سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند تا DNA رسوب کند. سپس مایع رویی بیرون ریخته شد. در مرحله ی آخر به هر کدام از میکروتیوب ها پس از خشک شدن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. مقدار ۱۵ میکرولیتر از محلول موجود در میکروتیوب با ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ۶x (۳۰٪ گلیسرول، ۲۵٪ بروموفنول بلو) در یک میکروتیوب دیگر مخلوط گردیده و روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. ژل با ولتاژ ۳۵ ولت به مدت ۲ الی ۳ ساعت الکتروفورز گردید، و در نهایت برای مشاهده ی نتیجه، ژل در دستگاه داک قرار داده شده و قطعات DNA با تابش نور UV نمایان گردید. در این مطالعه از ladder marker نیز استفاده گردید (۲۰).

در بررسی چرخه ی سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری نسبت سلول ها در هر مرحله از چرخه ی سلولی نشان داده می شود. بدین منظور سلول های تیمار شده در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و برای فیکس کردن سلول ها ۳ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به سلول ها افزوده و به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شدند نمونه ها مجدداً در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده و با PBS شستشو داده شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از پروپیدیوم یدید (PI) به هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در جای تاریک قرار گرفت. در نهایت چرخه ی سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردید. این دستگاه با استفاده از نرم افزار خاص درصد جمعیت سلولی را در مراحل Sub G1، G1، S و G2/M مشخص می کند (۲۱).

تمامی داده های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 و میکروسافت اکسل ۲۰۱۰ و آزمون student t-test انجام شد و داده ها با ارزش $p < 0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

بررسی رشد و زیستایی ترکیب 2-DP.P در سلول های K562
جهت بررسی اثرات ترکیب فعالی از خانواده ی پیرازینوئیک اسید بر میزان مرگ سلولی، آزمون MTT به کار گرفته شد. اثرات مهاری ترکیب در چهار غلظت ۲۵، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رشد سلول ها بررسی شد (شکل ۱).

درست کردن محلول ۱ میلی مولار با محیط کامل رقیق شد. در ادامه مقدار مشخصی از دارو (بر اساس غلظت های مورد آزمایش) به هر کدام از چاهک ها اضافه شد (۱۷).

رده ی سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در محیط کشت RPMI-1640 (بیوسرا، انگلستان) غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) (بیوسرا، انگلستان) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین و پنی سیلین (سیناژن، تهران) ۱ درصد، در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد. سلول ها هر ۲۴ ساعت یک بار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند (۱۷).

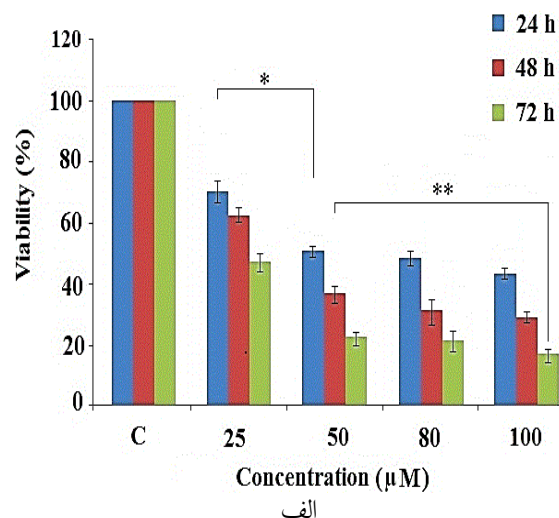
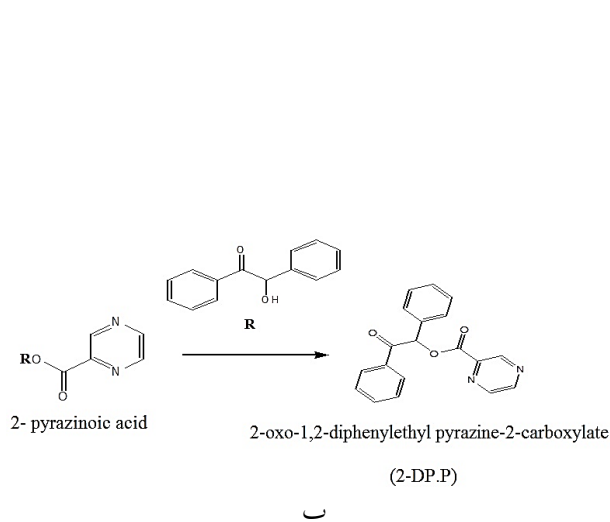
در بررسی رشد و زیستایی ترکیب 2-DP.P در سلول های K562 با استفاده از آزمون MTT این روش به منظور بررسی اثرات ضد توموری ترکیب، مقدار 5×10^4 سلول به همراه محیط کشت در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی ریخته شد. سپس غلظت های مختلف از ترکیب مورد نظر (۲۵، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به هر چاهک برای زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه گردید. سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه که رسوب حل شد، نور جذب شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. بر اساس جذب هر چاهک نسبت به چاهک کنترل، میزان زنده ماندن نمونه های تیمار به دست آمد (۱۸).

برای بررسی آپوپتوز از طریق رنگ آمیزی هوخست (Hoechst 33342) اثرات ترکیب بر ظاهر سلول های K562، به تعداد 5×10^4 سلول K562 در هر چاهک پلیت ۲۴ چاهکی کشت داده شد. و غلظت مشخص ۲۵ میکرومولار (بر اساس IC_{50}) از ترکیب مورد نظر به هر چاهک اضافه گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول ها با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی دور ریخته شد. ۲ میکرولیتر رنگ هوخست ۳۳۳۴۲ به هر نمونه اضافه کرده و یک قطره از نمونه های به دست آمده روی لام قرار داده شد و تغییرات مورفولوژیک سلول های تیمار شده در قیاس با نمونه های کنترل توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

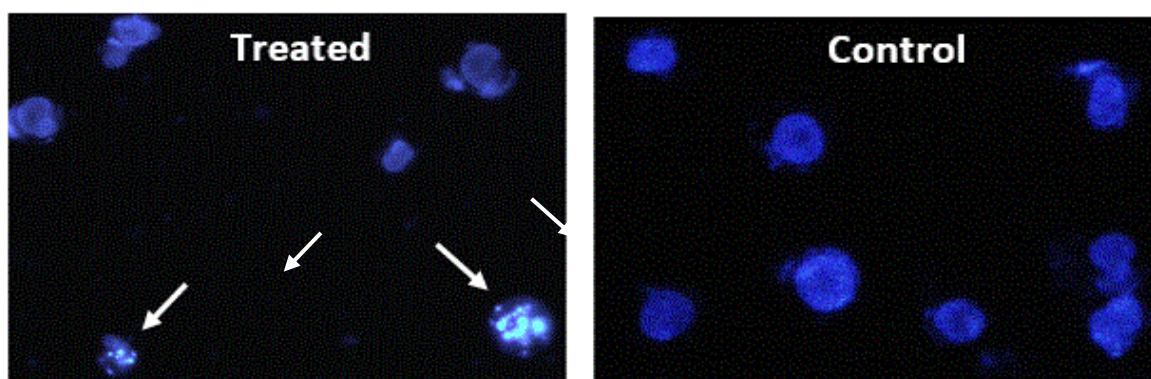
جهت بررسی قطعه قطعه شدن DNA به قطعات الیگو نوکلئوتیدی با اندازه ۱۸۰-۲۰۰ جفت بازی که طی آپوپتوز رخ می دهد از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. سلول های تیمار شده با ترکیب، تحت تاثیر ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده شامل (Tris, pH:8.0 0.820% [w/v] SDS, 100mM EDTA) قرار گرفته و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و سپس ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم و ایزوامیل الکل (با نسبت ۱:۱) به هر کدام اضافه

گردد) برای ترکیب برابر با ۲۵ میکرومولار، محاسبه شد. بررسی القاء آپوپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلوروسانس شکل ظاهری سلول های تیمار شده با DP.P-۲ بعد از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت IC50 محاسبه شده (۲۵ میکرومولار) توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و عکس برداری شد. در رنگ آمیزی با رنگ هوخست سلول های طبیعی به صورت یکنواخت دیده می شوند در حالی که هسته ی سلول های آپوپتوز شده به واسطه ی متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیرمنظم و به صورت نقاط درخشان قابل مشاهده هست (شکل ۲).

یافته های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که ترکیب مورد نظر در مقایسه با گروه کنترل فعالیت سلول کشی وابسته به زمان و غلظت دارد (شکل ۱). به بیان دیگر با افزایش مدت زمان و غلظت دارو درصد مرگ سلول های سرطانی افزایش و نتیجه زنده ماندن سلول ها کاهش می یابد. ترکیب در ۲۴ ساعت کشندگی کمی داشته و بیشتر در این مدت زمان باعث تنش در سلول ها می گردد ولی با افزایش زمان در طی ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت های پایین تر دارویی باعث کشته شدن ۵۰ درصد از سلول ها می شود. میزان IC50 (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰ درصدی سلول ها می



شکل ۱. الف) ساختار ترکیب 2-DP.P ب) بررسی اثر ترکیب 2-DP.P بر زیستایی سلول های K562 با استفاده از MTT در زمان ها (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و غلظت های مختلف (۲۵-۱۰۰ میکرومولار). ستون C مربوط به نمونه ی کنترل می باشد. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل $\pm$ انحراف استاندارد (SD) می باشد. [$p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*)]



شکل ۲. اثرات مورفولوژیک ترکیب 2-DP.P بر روی سلول های K562 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ۲۵ میکرومولار از ترکیب مورد مطالعه. سلول های تیمار نشده یا کنترل: سمت راست و سلول های تیمار شده با ترکیب 2-DP.P: سمت چپ (پیکان ها آپوپتوز را نشان می دهند).

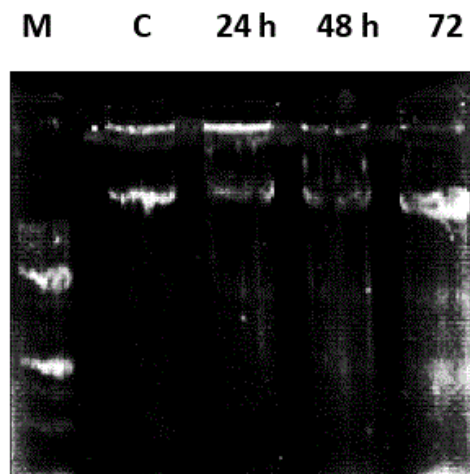
مشاهده می شود DNA ژنومی سلول های K562 تیمار شده به صورت نردبانی بر روی ژل الکتروفورز دیده می شود در حالی که این حالت در سلول های کنترل مشاهده نمی گردد.

به منظور بررسی بیشتر آپوپتوز القاء شده توسط ترکیب، تغییرات مراحل چرخه ی سلولی بر اثر این دارو در سلول های K562 بررسی شد. این سلول ها پس از تیمار در غلظت ۲۵ میکرومولار با ترکیب 2-DP.P در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از رنگ PI بوسیله ی دستگاه فلو سایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول ها از ناحیه ی G0/G1 در حال کاهش و در ناحیه ی sub-G1 در حال افزایش است که دلالت بر ایجاد تغییرات در چرخه ی سلولی و القاء آپوپتوز توسط این ترکیب است.

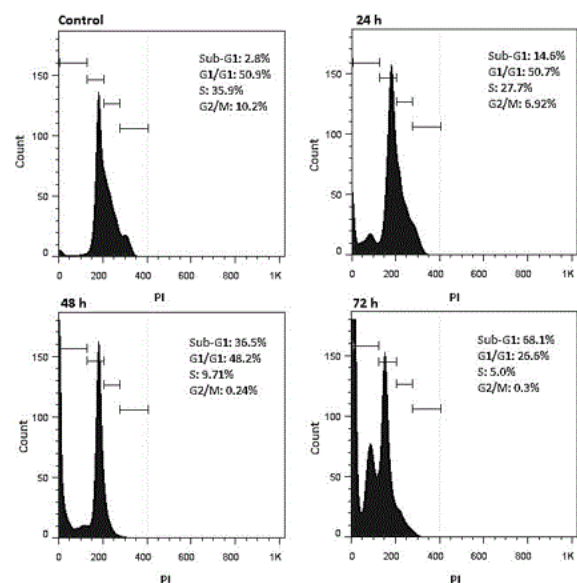
بحث

عدم تنظیم میزان تکثیر، تمایز و مرگ سلولی سبب اختلال در مرگ و افزایش بی رویه رشد سلولی می گردد. نقص در چرخه سلولی و همچنین نقص در مسیرهای آپوپتوزی و توانایی برای دوری جستن از مرگ سلولی از نشانه های سرطان است که منجر به رشد غیر کنترل شده سلول توموری می شود. اختلال در فرایند آپوپتوز عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به شمار می رود. سلول های سرطانی به علل مختلف نسبت به آپوپتوز مقاومت نشان می دهند. مقاومت به آپوپتوز از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول های سرطانی در برابر شیمی درمانی محسوب می شود از آنجایی که القای آپوپتوز روش مناسبی برای از بین بردن سلول های سرطانی است و اغلب سلول های سرطانی دارای نقص در مکانیسم های آپوپتوز خود می باشند، بنابراین هر عاملی که بتواند بر این مقاومت غلبه کند و باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطانی شود می تواند به عنوان عاملی برای درمان سرطان مد نظر قرار گیرد (۲۲).

مطالعه ی حاضر به منظور بررسی اثرات ترکیب 2-DP.P که جزئی از خانواده ی پیرازینوئیک اسیدها می باشد، بر روی رده سلولی K562 از لوسمی میلوئید مزمن (CML) صورت گرفت. این رده ی سلولی به عنوان مدلی مناسب برای مرحله ی بلاست CML محسوب می شود. توسعه ی داروهای جدید برای درمان سرطان بر پایه توانایی این ترکیبات برای متوقف کردن تکثیر سلولی و القای آپوپتوز می باشد. از آنجا که ترکیبات سنتتیک پیرازینی دیگری که اخیراً مورد مطالعه قرار گرفتند، آپوپتوز را در سلول های سرطانی القا می کنند (که در مقدمه به آن ها اشاره شد)، در مطالعه حاضر نیز القای آپوپتوز توسط ترکیب جدیدی از خانواده پیرازینوئیک اسیدها (با نام اختصاری 2-DP.P) برای اولین بار بر روی رده ی سلولی K562 مورد مطالعه قرار گرفت. مشتقات



شکل ۳. اثرات ترکیب 2-DP.P بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562. سلول ها با ترکیب مورد نظر در غلظت ۲۵ میکرومولار به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و اثرات آپوپتوزی به وسیله ی قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. M: ladder marker ، C: نمونه ی کنترل



شکل ۴. داده های حاصل از فلو سایتومتری PI سلول های K562 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت ۲۵ میکرومولار توسط ترکیب مورد نظر (2-DP.P) تیمار شدند. داده ها حاکی از افزایش پیک sub-G1 (نشان دهنده وقوع آپوپتوز) پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت است.

به منظور اثبات بیشتر مرگ سلولی آپوپتوزی توسط ترکیب 2-DP.P از آزمون قطعه قطعه شدن DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل ۳، ترکیب مورد نظر باعث تغییر در الگوی ژنومی سلول های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول های کنترل گردید. به طوری که

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده برای القای آپوپتوز در زمان های مختلف توسط ترکیب مورد مطالعه (2-DP.P) و اینکه این ترکیب در ۲۴ ساعت، کاهش کمی در زیستایی سلول های K562 ایجاد می کند ولی در زمان های بیشتر (۴۸ ساعت به بعد) زیستایی این سلول ها را به شدت کاهش می دهد، می توان گفت احتمالاً این ترکیب ابتدا باعث القای تمایز در این سلول ها می شود و سپس این سلول ها را در مدت زمان بیشتری از تیمار به سمت مرگ آپوپتوزی می کشاند. بنابراین ترکیب 2-DP.P به صورت وابسته به غلظت و زمان باعث مهار رشد و القای آپوپتوز در رده ی سلولی K562 می شود. در نتیجه این ترکیب را می توان به عنوان ترکیبی جدید و موثر برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان خون پیشنهاد نمود.

قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه و دانشگاه تبریز به جهت همکاری و حمایت های مالی آنها ابراز می دارند.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی شامل نمی شود.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۱۰۵/۴۸۵ از طرف دانشگاه ارومیه صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

مولفان اظهار می دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

ح ب، م م و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

پیرازین در فعالیت های مختلف فیزیولوژیکی مانند فعالیت های ضد باکتریایی، ضد التهابی، فعالیت آرامش بخش رحمی، ضد انسداد، تحریک قلب، ضد افسردگی، فعالیت هیپوگلیسمی، فعالیت ضد انعقادی، کنترل واکشش های آلرژیک، فعالیت مهار کننده فسفودی استراز و فعالیت ضد توموری دخیل می باشند (۲۳).

برخی ترکیبات سنتتیک مشتق شده از پیرازین در مطالعه ی آزمایشی توسط Kamal و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی سرطان های لوسمی، ملانوم، ریه، کولون، CNS، تخمدان، کلیه، پروستات و سرطان های پستان آزمایش شده اند و فعالیت ضد توموری آنها مشخص شده است. تجزیه و تحلیل داده های این آزمایش نشان داد که این ترکیبات چرخه سلولی را در مرحله G0 / G1 در سلول های A549 متوقف می کنند و در نهایت منجر به مرگ سلول می شود. القای آپوپتوز نیز توسط Annexin، تجزیه DNA و رنگ آمیزی Hoechst تایید شد (۲۴).

در حال حاضر در آزمایشگاه ما (آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه تبریز) بر روی مشتقات دیگری از پیرازینوئیک اسیدها مطالعه می شود و فعالیت های ضد توموری آنها نیز در حال بررسی است. نتایج حاصل از آزمایش های حاضر نشان داد که ترکیب مذکور باعث کشته شدن سلول های K562 به صورت وابسته به غلظت و زمان می شود. به طوری که با گذشت زمان بیشتر و در غلظت های بالاتر، ترکیب مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک بیشتری می باشد (شکل ۱ ب). بررسی داده های ریخت شناسی سلول ها توسط میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که سلول های تیمار شده دچار تغییراتی از قبیل انقباض سلولی و تکه تکه شدن کروماتین شده اند که نشان دهنده ی وقوع آپوپتوز در این سلول ها می باشد. در حالی که سلول های کنترل هیچ آپوپتوزی را نشان ندادند. در تصاویر گرفته شده توسط این میکروسکوپ فلورسانس، سلول های کنترل شکل کروی و شفاف خود را حفظ کرده اند در حالی که سلول های تیمار شده تغییر شکل داده و نهایتاً به سمت آپوپتوز سوق یافته اند (شکل ۲). برای اطمینان بیشتر از وقوع آپوپتوز، آزمون قطعه قطعه شدن DNA نیز انجام شد که نتایج حاصل از این آزمون نیز تایید کننده ی القای آپوپتوز توسط این ترکیب می باشد. همچنین آنالیز چرخه ی سلولی به منظور بررسی تاثیر ترکیب بر روی چرخه ی سلولی نشان داد که این ترکیب منجر به توقف چرخه سلولی در مرحله ی sub-G1 و القاء آپوپتوز می شود (شکل ۴).

References

1. Ghasemian M, Mahdavi M, Rahnamay M, Zare P, HosseinpourFeizi M A, Balalaei S. Cytotoxic and Apoptotic Effects of the New Derivatives of Quinazoline Family on K562 Cells, Chronic Myelogenous Leukemia. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2014; 36(4): 86-93. (Persian).
2. Rebecca L, Kimberly D, Ahmedin J. Cancer statistics 2016. *A cancer journal for clinicians* 2016; 66: 7-30. doi: 10.3322/caac.21332
3. Bapiri A, Mohamadzadeh M. The Effect of Ibuprofen and Indomethacin on Human Chronic Myelocytic

- Leukemia K562 Cell Line: An In-Vitro Study. *J Esfahan Med Sch* 2015; **33**(328): 389-399. (Persian).
4. JoséFlores-Alvarez L, JuliaGuzmán-Rodríguez J, López-Gómez R, Salgado-Garciglia R, Ochoa-Zarzosa A, E.López-Meza J. PaDef defensng from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2018; **99**: 10-18. doi: 10.1016/j.biocel.2018.03.013.
5. Kshama T, Sharique A, Kshitij T, Amrisha J, Sania Zahra R. Phladelphia Chromosome posetive chronic myilogenous leokemia in childhood:a rare casereport. *Era's Journal of Medical Research* 2017; **4**(1): 73-75. doi: 10.24041/ejmr2017.8
6. Hershkovitz-Rokah O, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, Shomron N, Raanani P, et al. MiR-30e induces apoptosis and sensitizes K562 cells to imatinib treatment via regulation of the BCR-ABL protein. *Cancer Letters* 2015; **356**: 597-605. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.006
7. Cortez A P, Menezes E G, Benfica P L, Dos Santos L P, Cleres L M, H.O Ribeiro, et al. Grandisin induces apoptosis in leukemic K562 cells. *Braz J Pharm Sci* 2017; **53**(1): doi: 10.1590/s2175-97902017000115210
8. Barik S. Combination Therapy for Chronic Lymphoid Leukemia. *J Cancer Sci Ther* 2016; **8**: 4. doi: 10.4172/1948-5956.1000395
9. Zhang Y, Margaret Wade M, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; **52**: 790-795. doi: 10.1093/jac/dkg446
10. Foks H, Balewski L, Gobis K, Dabrowska-Szponar M, Wisniewska K. Studies on Pyrazine Derivatives LII:Antibacterial and Antifungal Activity of Nitrogen Heterocyclic Compounds Obtained by Pyrazinamidrazone Usage. *Heteroatom Chemistry* 2012; **23**. doi: 10.1002/hc.20751
11. Osman F, Ismail F, Osman A, Omar A, Said H, Ismail N. High Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *JCM* 2016; **4**: 155-172. doi: 10.1128/JCM.00396-10
12. Pan X H, Liu X, Zhao B X, Xie Y S, Shin D S, Zhang S L, et al. 5-Alkyl-2-ferrocenyl-6,7-dihydropyrazolo [1,5-a] pyrazin-4(5H)-one derivatives inhibit growth of lung cancer A549 cell by inducing apoptosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; **16**: 9093-9100. doi: 10.1016/j.bmc.2008.09.046
13. Zurbonsen K, Michel A, Vittet D, Bonnet P A, Chevillard C. Ant proliferative effects of imidazole[1,2-β] pyrazine derivatives on the dami cell line. *Biochemical Pharmacology* 1997; **54**: 365-371. doi: 10.1016/S0006-2952(97)00224-4
14. Zurbonsen K, Michel A, Bonnet P A, Mathieu M N, Chevillard C. Antiproliferative , Differentiating and Apoptotic Effects Elicited by Imidazo[1,2-a] pyrazine Derivatives. *Gen Pharmac* 1999; **32**: 135-141. doi: 10.1016/S0306-3623(98)00097-4
15. Deininger M W, Goldman J M, Melo J V. Themolecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; **96**(10): 3343-3356.
16. Bosch G J, Joosten A M, Kessler J H, Melief C J, Leeksa O C. Recognition of BCR-ABLpositive leukemic blasts by human CD4+ T cellselicited by primary in vitro immunization with aBCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 1996; **88**(9): 3522-3527.
17. Alemi Serej F, Mahdavi M, Zare P, HosseinpourFeizi M A, Balalaei S. Biological Evaluation of Aminopyrimidines Derivatives as Growth Inhibitor and Apoptosis Inducer of K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; **24**(116): 1-10. (Persian).
18. Bijnsdorp I V, Giovannetti E, Peters G J. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol* 2011; **731**: 421-434.
19. Mahdavi M, Yazdanparast R. Ginidilatimonoein from Dephne mucronata induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Arch Pharm Res* 2007; **30**(2): 177-181. doi: 10.1007/bf02977692
20. Philchenkov A, Miura K. The IAP Protein Family, SMAC Mimetics and Cancer Treatment. *Cri. Rev Oncog* 2016; **21**(3-4): 185-202. doi: 10.1615/Crit RevOncog.2016017032
21. Rahimi R, Mahdavi M, Pejman S, Zare P, Balalaei, S. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis inK562 human leukemia cells by the derivative (3-NpC) fromdihydro- pyranochromenes family. *Acta Biochim Pol* 2015; **62**: 83-85. doi: 10.18388/abp.2014_825
22. Ferreira C G, Epping M, Krut F A, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2024-2034.
23. Myadaraboina S, Alla M, Saddanapu V, Rao Bommena V, Addlagatta A. Structure activity relationship studies of imidazo [1,2-a] pyrazine derivatives against cancer cell lines. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 5208-5216. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.08.035
24. Kamal A, Ramakrishna G, Raju P, Subba Rao A V, Viswanath A, Lakshma Nayak V, et al. Synthesis and anticancer activity of oxindole derived imidazo[1,5-a] pyrazines. *Eur J Med Chem* 2011; **46**: 2427-2435. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.03.027.