

ارزیابی اثرات ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی رده سلولی K562

علیرضا حاج عباس فرشچی^۱، ناهیده افضل آهنگران^۲، امیر ولیخانی^۳، سعیده قربانی^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۱/۲۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مطالعات قبلی نشان داده است که مشتق‌های پیریمیدینی دارای خواص ضد سرطانی می‌باشند. در این کار تحقیقاتی ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک یکی از مشتقات پیریمیدینی بنام مشتق ۲-کلروپیریمیدین، بر روی سرطان خون انسانی K562 و همچنین سلول‌های نرمال تک هسته ایی خون محیطی (PBMC) به‌عنوان کنترل انجام گرفت.

مواد و روش کار: تعداد ۱×۱۰۶ سلول k562 و PBMC در ۱۰۰ میکرولیتر به همراه غلظت‌های سریالی لگاریتمی (۲۰۰-۱/۵۶۲۵) از مشتق مورد آزمایش درون هریک از چاهک‌ها در زمان‌های (۲۴، ۴۸، ۷۲) انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون درصد زنده‌مانی سلولی به‌وسیله روش MTT سنجش شد، پس از تعیین IC50 درصد آپوپتوز و نکروز به روش PI/AO سنجیده شد.

یافته‌ها: اطلاعات نشان می‌دهد که این ترکیب رفتاری سایتوتوکسیک را دارا می‌باشد به‌نحوی که میزان زنده‌مانی در تست MTT کاهش پیدا کرد و درصد آپوپتوز افزایش یافت که خوشبختانه مقدار IC50 این ترکیب بر روی K562 نسبت به PBMC پایین‌تر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده استفاده از این ترکیب می‌تواند برای مقابله با سرطان رده سلول انسانی K562 بدون اثرات سایتوتوکسیک بر روی PBMC مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: K562، PBMC، کلروپیریمیدین، MTT، PI/AO، آپوپتوز، IC50

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره سوم، ص ۱۹۸-۱۸۸، خرداد ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تهران - خیابان نلسون ماندلا، خیابان مهباز، پلاک ۶۸ واحد ۳- تلفن: ۰۲۱۲۲۰۴۳۴۰۰/تلفن همراه ۰۹۳۶۳۶۴۴۱۱۷

Email: alirezafarshchi67@yahoo.com

مقدمه

و ژن bcr بر روی کروموزوم شماره ۲۲ در سلول‌های بنیادی به وجود می‌آید. رده سلولی K562 به‌عنوان الگویی جهت مطالعه (CML) به کار می‌رود (۳). آپوپتوز، یک فرایند تنظیم‌شده مرگ سلولی می‌باشد که باعث حذف سلول‌های ناخواسته، بدون ایجاد آسیب در ارگان‌سیم‌های چند سلولی می‌گردد و سبب کنترل رشد و ثابت نگاه‌داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌شود (۴).

تمام روش‌های درمانی از جمله جراحی، قطع اندام، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی دارای عوارض زیادی از جمله ریزش مو، تهوع، استفراغ، خارش پوست، ضعف جسمانی و همین‌طور افزایش احتمال عفونت به دنبال تضعیف سیستم ایمنی را با خود به همراه دارند (۵). امروزه از داروهای شیمیایی بسیاری در درمان سرطان‌های مختلف

امروزه یکی از مهم‌ترین مطالعات، یافتن ترکیبات ضد سرطان برای درمان بیماران سرطانی امری ضروری است (۱). تحقیقات انجام‌شده و بررسی‌ها گذشته نشان دادند که ترکیبات پیریمیدینی می‌توانند باعث جلوگیری از سرطان‌های متعددی شوند (۲). لوسمی در این مطالعه ارزیابی اثرات یکی از مشتق‌های پیریمیدین‌ها به نام ۲-کلروپیریمیدین بر روی سلول‌های توموری رده k562 و سلول‌های PBMC و همچنین مقایسه اثرات سایتوتوکسیک و تعیین مقادیر IC50 ترکیب موردنظر انجام شده است.

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یکی از شناخته‌شده‌ترین سرطان‌های خون می‌باشد که به دلیل جابجایی دوطرفه بین ژن abl

^۱ کارشناسی ارشد ایمنی شناسی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ استادیار ایمونولوژی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ کارشناسی ارشد هماتولوژی دانشگاه انتقال خون تهران، دانشگاه انتقال خون تهران، تهران، ایران

^۴ کارشناسی ارشد علوم تغذیه، علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

داشته باشیم که به ازای هر غلظت گروه کنترل مثبت داشته باشیم. برای این مهم بجای تیمار، ۱۰۰ میکرولیتر PBS (GIBCO) ریخته شد. این عمل را برای قرائت‌های ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت در میکروپلیت‌های جداگانه انجام دادیم. میکروپلیت‌ها را در انکوباتور قرار داده تا موعد مقرر فرا رسد. محلول MTT (Sigma USA) را با غلظت 5mg/ml به میزان نیاز برای استفاده‌ی سه روز آماده می‌کنیم (۸۴). در هر خانه ۲۰ میکرولیتر محلول اضافه شد. ۴ ساعت قبل از قرائت هرروزه، در هر خانه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT می‌ریزیم و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون انجام شد. بعد از انکوباسیون در هر خانه به میزان ۱۸۰ میکرولیتر DMSO اضافه و بعد از ۱۵ دقیقه میکروپلیت در طول موج ۴۹۸ میکرولیتر قرائت شد و OD های قرائت‌شده را در اکسل روی نمودار برده و کارهای آماری و تعیین IC50 انجام شد.

سنجش زنده‌مانی و آپوپتوز K562 و PBMC به روش AC/PI

سنجش زنده‌مانی و تعیین آپوپتوز سلول‌های K562 پس از رنگ‌آمیزی به‌وسیله میکروسکوپ فلوروسنت انجام گرفت (۹). پس از تیمار سلول‌های توموری به مدت ۲۴ ساعت با غلظت IC50 ترکیب مورد آزمایش، سلول‌های یک چاهک پلیت ۹۶ خانه به داخل لوله فالکن ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به‌آرامی برداشته و دور ریخته شد و توده سلولی به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه با اکریدین اورنج به میزان ۱۰µl/ml رنگ‌آمیزی شده و به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط استاندارد کشت سلولی انکوبه شد. بعد از زمان انکوباسیون سلول‌ها به‌وسیله PBS استریل دو بار شستشو شده، حجم آن را به ۱ میلی‌لیتر رسانده و ۱۰ میکرو لیتر پروپیدیوم یداید به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در شرایط استاندارد کشت سلولی انکوبه شدند. در آخرین مرحله، سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰ سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی حذف شد. ۵۰ میکرولیتر از توده سلولی را برداشته و روی لام شیشه‌ای ریخته شد سپس یک لامل روی آن گذاشته و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت با عدسی ۴۰ تعداد ۵ میدان میکروسکوپی بررسی شد (۱۰). تعداد ۱۰۰ سلول شمارش و سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز شده تعیین گردید. در روش رنگ‌آمیزی دوگانه آکریدین اورنج و پروپیدیوم یداید، آکریدین اورنج به داخل همه سلول‌ها نفوذ کرده و موجب سبزرنگ شدن سلول‌ها می‌شود. پروپیدیوم یداید فقط وارد سلول‌هایی می‌شود که غشا آن‌ها سالم نباشد و باعث ایجاد رنگ قرمز در آن‌ها می‌شود. سلول‌هایی که به رنگ سبز می‌باشند سالم، سلول‌هایی که به رنگ سبز روشن همراه با کروماتین متراکم و قطعه‌قطعه می‌باشند آپوپتوز

استفاده می‌شود که اغلب عوارض استعمال این داروها بیشتر از خاصیت درمانی آن‌ها می‌باشد به‌نحوی که مرگ بسیاری از بیماران سرطانی به علت عوارض داروها می‌باشد لذا پژوهش و تحقیق در مورد ترکیبات سنتتیکی که بتوانند علاوه بر درمان سرطان، عوارض دارویی کم‌تری برای بیماران داشته باشند یکی از ضروریات می‌باشد (۱).

به همین دلیل از ترکیب ۲-کلروپیریمیدین به‌عنوان ترکیب درمان‌کننده و ضد توموری بر روی رده توموری k562 استفاده شد تا از نتایج حاصله بتوان برای درمان بیماران سرطانی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول K562 و جداسازی PBMC:

سلول‌های K562 (انستیتو پاستور ایران) در این مطالعه استفاده شد که به تعداد ۱×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI 1640 (GIBCO-BRL) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گوساله گرما دیده و غیرفعال شده (GIBCO) به همراه، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین (BIOCERA) تحت شرایط استاندارد و استریل کشت‌شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. تعداد زنده‌مانی سلول‌ها به‌وسیله تریپان بلو در زیر میکروسکوپ بالام نئوبار شمارش گردید که زنده‌مانی بیش از ۹۵ درصد بود (۶).

مقدار ۱۵ میلی‌لیتر خون هپارینه (۲۰۰ U/ml) با ۱۵ ml محیط کشت RPMI 1640 رقیق گردید و به همراه ۱۵ ml فایکول (Sigma, USA) سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) با روش فایکول جدا شدند (۶) و سپس تعداد و میزان زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به‌دست‌آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید (۷).

بررسی میزان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های K562 و PBMC به روش MTT:

ابتدا رقت سازی از ترکیب پیریمیدینی و همچنین داروی شاهد دوکسوروبیسین به‌صورت سریالی با بافر فسفات استریل در غلظت‌های (۲۰۰-۱/۵۶۲۵) انجام شد و بسته به تعداد خانه‌های موردنیاز بر اساس تعداد رقت و تعداد تکرار طوری سوسپانسیون سلولی را تنظیم نمودیم که در هر ۱۰۰ میکرولیتر که در هر خانه ریخته، ۱۰۰۰۰ سلول K562 داشته باشد. در هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی می‌ریزیم. که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول K562 می‌باشد. برای ماده مورد آزمایش ۷ غلظت سریالی در نظر گرفته شد (۸).

در هر تکرار به‌صورت تریپلیکیت از هر غلظت تیمار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در خانه‌هایی که حاوی سلول‌اند، ریخته شد. توجه

مختلف هر تیمار روی سلول‌های K562 و PBMC به صورت درصد زنده‌مانی بر نمودار نقطه‌ای رسم شده و منحنی آن کشیده شد تا رگرسیون داده شده نمایانگر دقت نتیجه‌ی کار باشد (۱۱). سپس درصد زنده‌مانی گروه‌های مختلف بر روی نمودارهای ستونی در کنار هم آورده شده‌اند و با رسم ارور بار شرایط مقایسه‌ی آن‌ها را فراهم کرده است. بعد از محاسبه‌ی IC50، به تفکیک زمان، هر کدام را به همراه انحراف معیار در جدولی آمده است. و در انتها دوباره از نمودار ستونی و ارور بار برای مقایسه‌ی IC50 گروه‌های مختلف استفاده شده است. شاخص انتخابی یا SI: Selectivity Index عبارت است از مقایسه‌ی اختلاف اثر تیمار بر سلول‌های K562 و PBMC بهتر قابل بررسی است. بطوریکه هرچه این اختلاف بیشتر باشد بدین معناست که این ترکیب انتخابی عمل کرده و گزینه مناسب‌تری برای درمان می‌باشد. البته لازم به ذکر است که اشاره شود در این تحقیق سعی بر ارزیابی ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی سلول‌های K562 در شرایط IN VITRO بوده است لذا توصیه می‌گردد که نتایج حاصل از بررسی IN VIVO و روش‌های تکمیلی دیگر همچون فلوسایتومتری برای تکمیل و تصدیق نتایج حاصل از این بررسی انجام شود زیرا که نتایج حاصل از این کار تحقیقاتی حاکی از مساعد بودن این ترکیب، جهت درمان، بر روی سلول‌های توموری می‌باشد.

اولیه، آن‌هایی که دارای رنگ قرمز با کروماتین متراکم و قطعه‌قطعه می‌باشند آپوپتوز ثانویه و نهایتاً آن‌هایی که دارای هسته نرمال، متورم و قرمز رنگ می‌باشند نکروز هستند (۱۰).

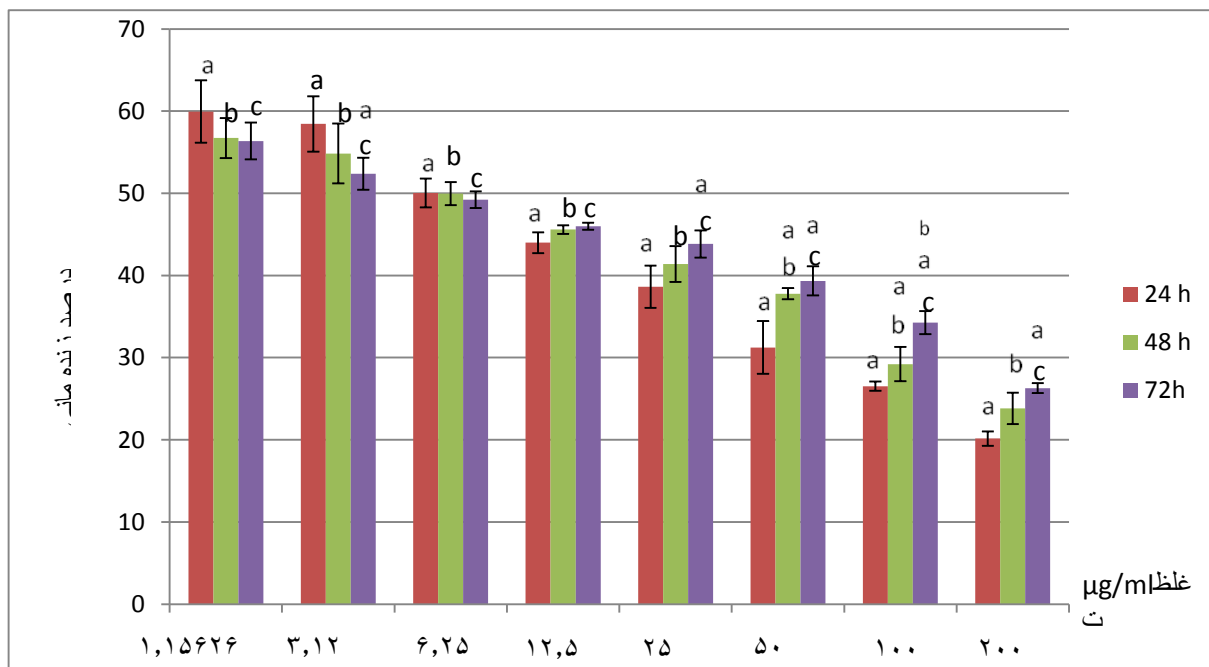
تحلیل آماری:

نتایج این کار تحقیقاتی با برنامه (software Inc. San) ، SPSS تفسیر و بررسی شد همچنین از نرم‌افزار آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway-ANOWA) و (repeated measures) برای تفسیر و بررسی نتایج استفاده شد. اختلافات معنی‌دار به صورت $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. برای محاسبه IC50 از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده و نمودارهای ستونی به وسیله Excel2007 ترسیم شد

یافته‌ها

نتایج اثرات غلظت‌های سریالی تهیه شده از ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی سلول‌های K562 به وسیله روش MTT:

اساس روش MTT بر پایه توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد. دی متیل سولفوکساید فورمازان نامحلول را حل کرده و شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزا نگار قابل‌سنجش است. در ابتدا اثر غلظت‌های

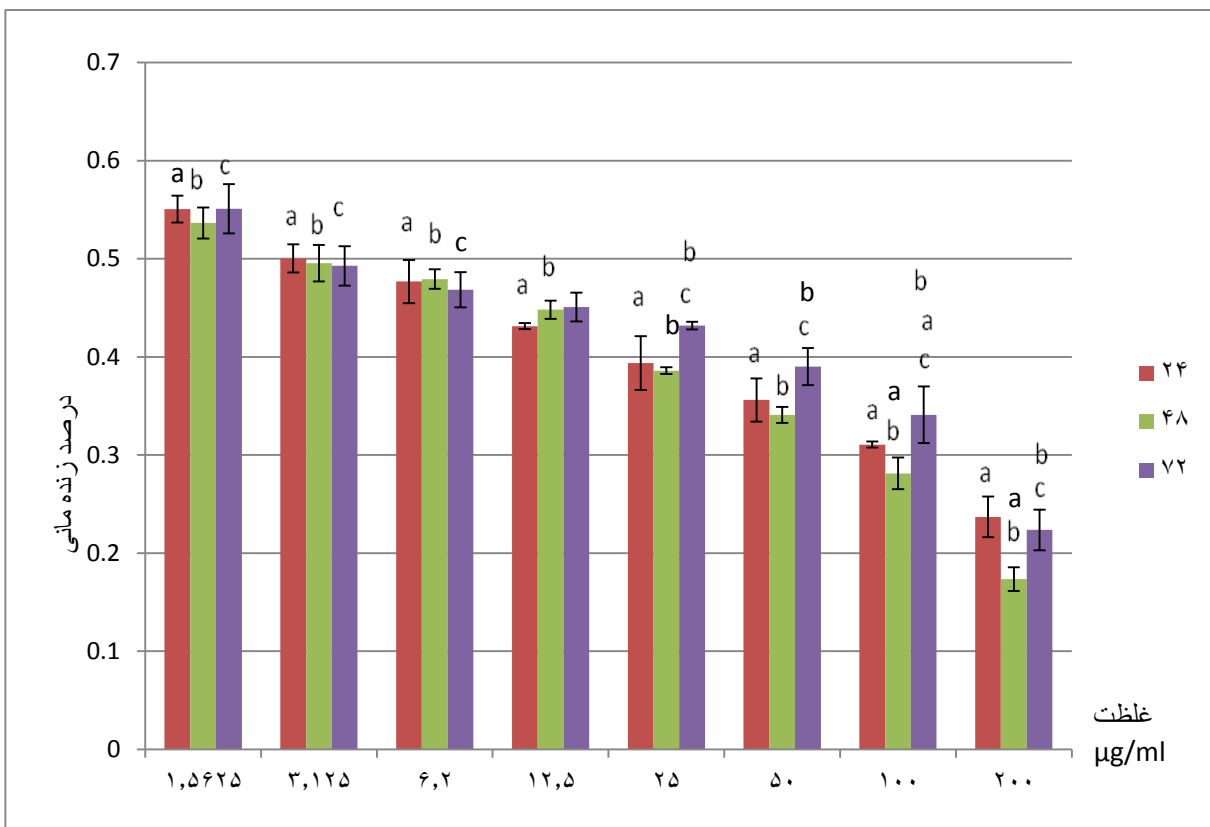


نمودار (۱): نتایج اثرات مهاری ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی رده سلولی K562

نمودار (۱): ارزیابی اثرات مهاری و درصد زنده‌مانی سلول‌های K562 در مواجهه با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.

شکل نمودار که نشان می‌دهد که نمودار از منحنی معادله درجه ۱ پیروی می‌کند. همان‌طور که از نمودار مشخص است زنده‌مانی گروه‌های ستون‌های (a,b,c,d,e) با حروف هم نام، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < .05$). با توجه به نمودارهای فوق غلظت‌های مشتق مورد آزمایش وابسته به زمان بودند.

همان‌طور که در شکل نشان داده شده است ترکیب مورد آزمایش بر روی رده سلولی K562 دارای اثرات سمی بوده و سبب کاهش زنده‌مانی آن‌ها در هر سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار می‌شوند (نمودارهای ۱-۳). این ترکیب دارای اثرات سمی وابسته به غلظت بر روی سلول‌ها می‌باشند و با افزایش غلظت زنده‌مانی کاهش می‌یابد. با توجه به



نمودار (۲): نتایج اثرات مهاری غلظت‌های سریالی ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر رشد و زنده‌مانی سلول‌های PBMC

بعد از تیمار می‌شوند (نمودارهای ۲-۳). با توجه به نتایج ارائه شده در شکل ترکیب مورد آزمایش دارای اثرات سمی وابسته به غلظت بر روی سلول‌های PBMC می‌باشند و با افزایش غلظت زنده‌مانی کاهش می‌یابد. با توجه به شکل نمودار که نشان می‌دهد که نمودار از منحنی معادله درجه ۱ پیروی می‌کند. همان‌طور که از نمودار مشخص است زنده‌مانی گروه‌های ستون‌های (a,b,c,d,e) با حروف هم نام، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < .05$) با توجه به نمودارهای فوق غلظت‌های مشتق مورد آزمایش وابسته به زمان بودند

نمودار (۲): ارزیابی اثرات مهاری و درصد زنده‌مانی سلول‌های PBMC در مواجهه با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین در غلظت‌های سریالی در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار

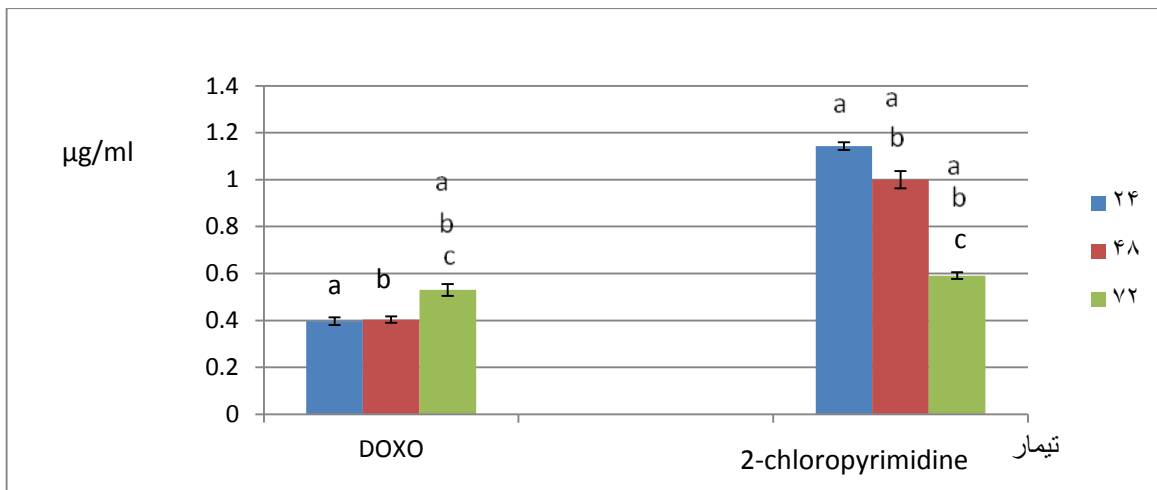
همان‌طور که در شکل نشان داده شده است ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی رده سلولی PBMC دارای اثرات سمی بوده و سبب کاهش زنده‌مانی آن‌ها در هر سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت

جدول (۳): مقادیر IC50 و شاخص انتخابی (SI) برای ترکیب ۲-کلروپیریمیدین

2-chloro-p	24h		48h		72h	
	IC50 ($\mu\text{g/ml}$) \pm S.E	SI	IC50 ($\mu\text{g/ml}$) \pm S.E	SI	IC50 ($\mu\text{g/ml}$) \pm S.E	SI
K562	0.55 \pm 0.013	2.06	0.47 \pm 0.024	2.143	0.46 \pm 0.017	1.28
PBMC	1.143 \pm 0.017		1 \pm 0.015		0.59 \pm 0.018	
DOXO						
K562	0.140 \pm 0.020	2.836	0.102 \pm 0.024	3.961	0.139 \pm 0.026	3.619
PBMC	0.397 \pm 0.016		0.404 \pm 0.022		0.53 \pm 0.016	

کلروپیریمیدین) اما خواص سایتوتوکسیسیته ترکیب ۲ کلروپیریمیدین به مراتب بسیار بالاتر از داروی دوکسوروبیسین بر روی هر دو رده (K562 و PBMC) بود که با توجه به مقادیر SI می‌توان مشاهده نمود که داروی دوکسوروبیسین در مقایسه با ترکیب ۲-کلرو پیریمیدین انتخابی‌تر عمل می‌کند. که البته دور از انتظار نیز نبود.

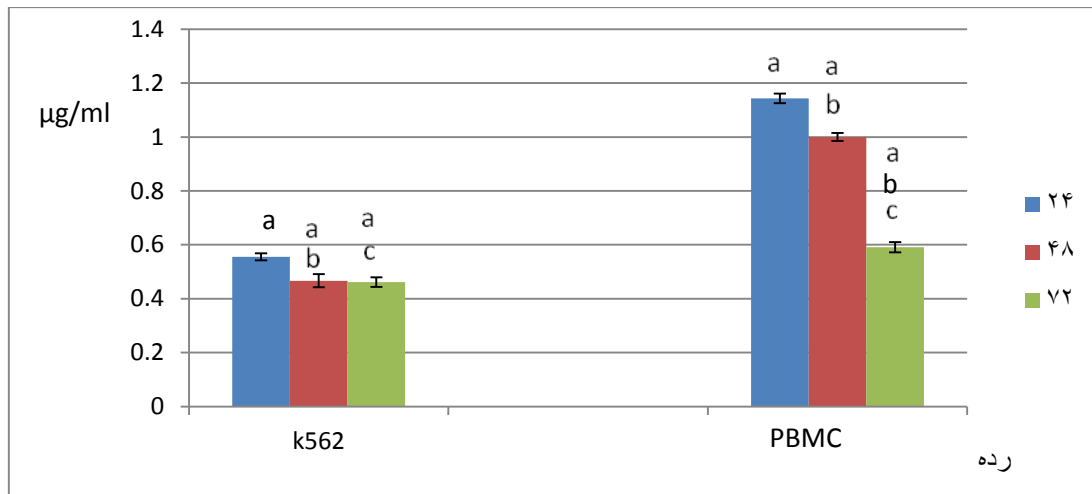
جدول فوق بیانگر مقایسه اثرات سایتوتوکسیک بین داروی دوکسوروبیسین و مشتق مورد آزمایش (ترکیب ۲-کلروپیریمیدین) بر روی سلول‌های PBMC و K562 می‌باشد که با توجه به مقادیر IC50 و SI داروی دوکسوروبیسین و ترکیب ۲-کلروپیریمیدین مورد آزمایش بر روی سلول‌های PBMC و K562 می‌توان مشاهده کرد که اثرات مخرب داروی دوکسوروبیسین بر روی این سلول‌ها بسیار کمتر از اثرات مخرب مشتق مورد آزمایش (ترکیب ۲-



نمودار (۳): مقایسه‌ی IC50 تیمارهای مختلف بر سلول‌های PBMC در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار

کمی سیر صعودی داشتند برخلاف ترکیب مورد آزمایش (ترکیب ۲-کلروپیریمیدین) که با افزایش زمان خواصیت سایتوتوکسیسیته بر روی سلول‌های PBMC سیر نزولی داشتند. گروه‌های ستون‌های (a,b,c,d,e) با حروف هم نام، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$) با توجه به نمودارهای فوق غلظت‌های مشتق مورد آزمایش و داروی دوکسوروبیسین وابسته به زمان بودند.

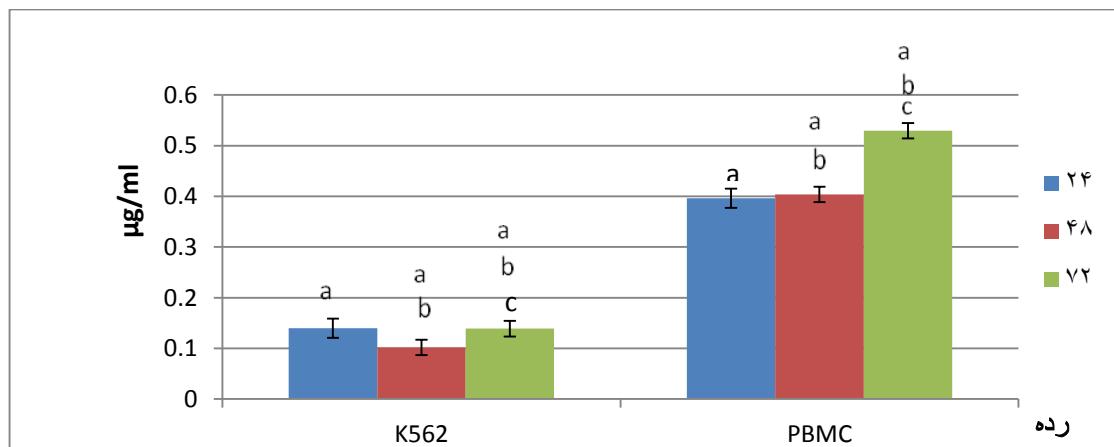
نمودار فوق بیانگر مقایسه اثرات سایتوتوکسیک بین داروی دوکسوروبیسین و مشتق مورد آزمایش (ترکیب ۲-کلروپیریمیدین) بر روی سلول‌های PBMC می‌باشد که با توجه به نمودار اثرات مخرب داروی دوکسوروبیسین بر روی این سلول‌ها بسیار کمتر از اثرات مخرب مشتق مورد آزمایش بود که البته دور از انتظار نبود. اما تفاوت سایتوتوکسیسیته داروی دوکسوروبیسین در زمان ۷۲ ساعت



نمودار (۴): مقایسه‌ی IC50 ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر سلول‌های K562 و PBMC، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار

افزایش زمان اثر سایتوتوکسیسیته بر روی سلول‌های K562 و PBMC سیر نزولی داشتند. گروه‌های ستون‌های (a,b,c,d,e) با حروف هم نام، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$) با توجه به نمودارهای فوق غلظت‌های مشتق مورد آزمایش وابسته به زمان بودند.

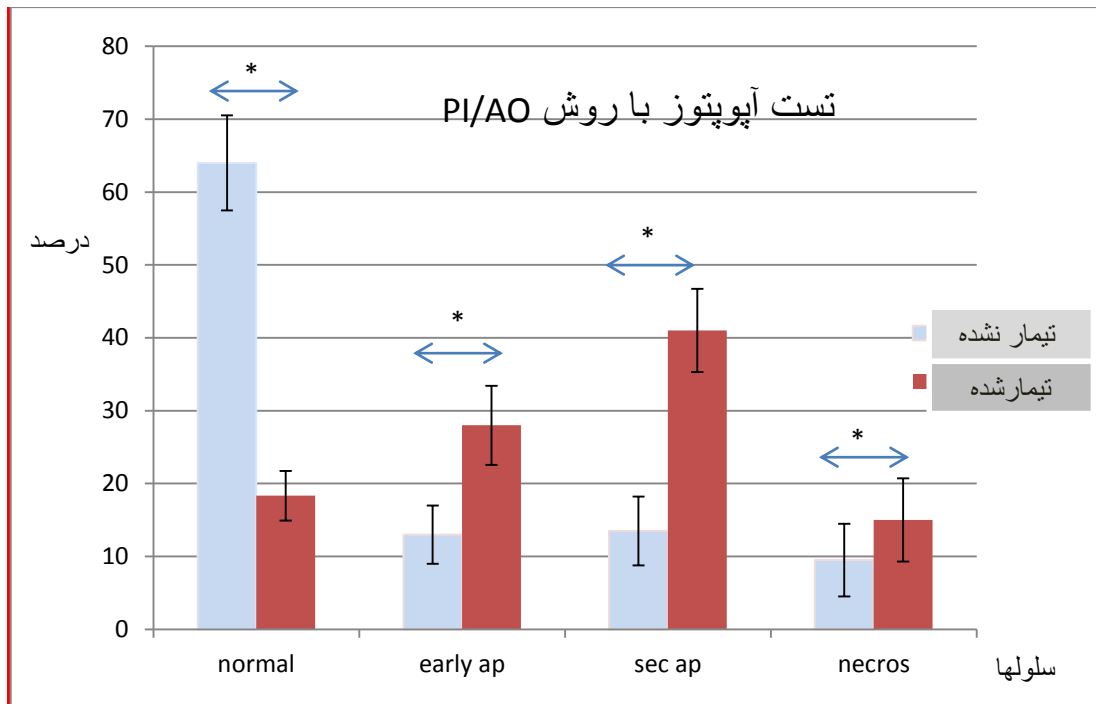
نمودار فوق بیانگر مقایسه اثرات سایتوتوکسیک ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی سلول‌های K562 و PBMC می‌باشد که با توجه به نمودار اثرات مخرب ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی PBMC بسیار کم‌تر از اثرات مخرب مشتق مورد آزمایش بر روی سلول‌های توموری K562 بود. همچنین ترکیب مورد آزمایش که با



نمودار (۵): مقایسه‌ی IC50 تیمار دوکسوروبیسین بر سلول‌های K562 و PBMC در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار

از عملکرد انتخابی مطلوب این دارو است. همچنین اثرات سایتوتوکسیسیته این دارو نیز وابسته به زمان بود. گروه‌های ستون‌های (a,b,c,d,e) با حروف هم نام، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$).

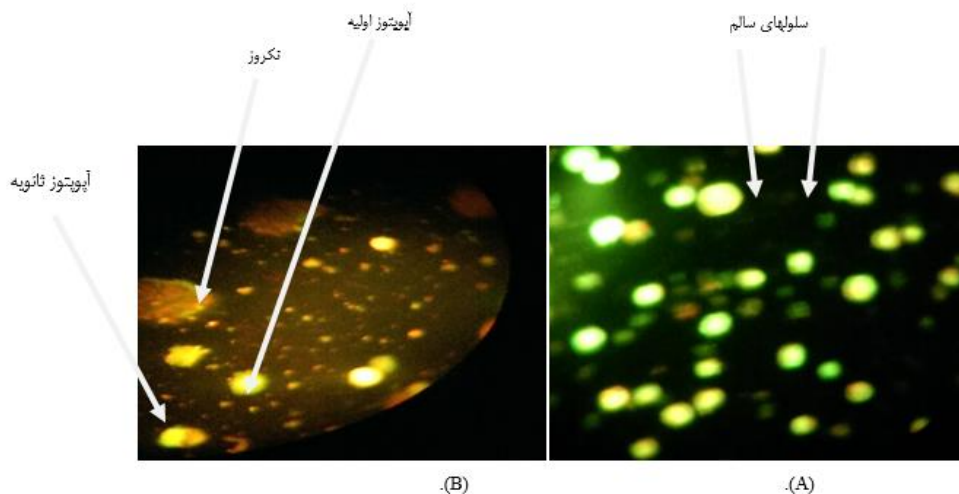
نمودار فوق بیانگر مقایسه اثرات سایتوتوکسیک داروی دوکسوروبیسین بر روی سلول‌های K562 و PBMC می‌باشد که با توجه به نمودار اثرات مخرب داروی دوکسوروبیسین بر روی PBMC بسیار کم‌تر از اثرات مخرب این دارو بر روی سلول‌های توموری K562 بود همچنین با توجه به نمودار، اختلاف مقادیر IC50 حاکی



نمودار (۶): درصد آپوپتوز و نکروز ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی رده سلولی k562 با غلظت IC50 پس از ۴۸ ساعت مواجهه با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین را نشان می‌دهد.

سمت آپوپتوز اولیه و به دنبال آن آپوپتوز ثانیه باشد. و با توجه به درصد پایین نکروزیس در سلول‌های تیمار شده و همچنین درصد بالای آپوپتوزیس سلول‌های تیمار شده با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین، لذا ترکیب مورد آزمایش (ترکیب ۲-کلروپیریمیدین) می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان سرطان در آینده ایی نه چندان دور باشد.

نمودار حاکی از اختلافات معنی‌دار در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های تیمار نشده را نمایش می‌دهد علامت (x) نشان دهنده سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) می‌باشد. با توجه به نمودار آپوپتوز ثانویه در سلول‌های تیمار شده بالاترین درصد را به خود اختصاص داده‌اند که می‌تواند گواهی بر سوق سلول‌های توموری تیمار شده به



شکل (۱): سلول‌های K562 سالم (کنترل) قبل از تیمار کردن - (A). سلول‌های K562 آپوپتوز شده در اثر مجاورت با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین با غلظت IC50 پس از ۴۸ ساعت مجاورت - (B).

بحث و نتیجه گیری

در سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن که دارای فعالیت غیرطبیعی تیروزین کینازی هستند و موجب بی‌نظمی در تکثیر سلول‌ها می‌شوند لذا در این بیماری ثابت شده است اثرات ترکیب پیریدول (۲ و ۳ دی) پیریمیدین بر روی رده سلولی k562 نشان دادند که ترکیبات مشتق از پیریمیدین‌ها می‌توانند از طریق مهار فعالیت تیروزین کینازی در سلول‌های توموری مانع از رشد و تکثیر این سلول‌ها شوند (۱۲).

در رژیم درمانی لوسمی، سلول‌های تک هسته ایی خون محیطی هم زمان تحت تأثیر داروهای شیمی‌درمانی قرار می‌گیرند (۱۳). این سلول‌ها حاوی سلول‌های لنفوسیتی کشنده طبیعی (NK) هستند که از لنفوسیت‌های B و T متمایز بوده و عملکرد کشتارهای سلول‌های توموری آن‌ها وابسته به گسترش کلون نمی‌باشد (۱۴). باتوجه به این موضوع بررسی اثرات مهار ترکیب پیریمیدینی در همان رقت‌های آزمایش شده بر روی رده توموری K562، بر روی سلول‌های PBMC نیز اثر داده شد که اطلاعات به‌دست آمده نشان دهنده اثرات مهار و کاهش زنده‌مانی بر روی PBMC بود. داروی دوکسوروبیسین با اختلال در روند فعالیت آنزیمی رونوشت برداری توپوایزومراز II باعث جلوگیری از نسخه برداری DNA و توقف روند چرخه تکثیر و در نتیجه رشد سلول‌های توموری می‌شود به همین علت در سلول‌های توموری که رشد بالایی دارند مانند رده‌های سارکوما، لیمفوما و لوسمی‌ها استفاده می‌شوند (۱۵). مقایسه عملکرد مهار داروی دوکسوروبیسین بر روی رده سلولی لوسمی و طبیعی نشان می‌دهد که شاخص SI داروی دوکسوروبیسین بسیار بیشتر از شاخص SI ترکیبات مورد آزمایش (۲-کلروپیریمیدین) می‌باشد و نشان از عملکرد مهار انتخابی این دارو در سلول‌های طبیعی و توموری دارد در حالیکه این شاخص در مقایسه با داروی بوسولفان نشان دهنده عملکردضعیف تر این مشتقات پیریمیدینی نسبت به داروی دوکسوروبیسین می‌باشد باتوجه به این موضوع که کاهش IC50 باعث افزایش سایتوتوکسیسیته می‌شود (۱۶) و با توجه به بالاتر بودن مقادیر IC50 ۴ ترکیب مورد آزمایش بر روی PBMC نسبت به اثرات این ترکیبات بر روی رده سرطانی k562 و مقادیر عددی شاخص SI این ترکیبات می‌توان در درمان بیماری سرطان از این مشتقات مورد آزمایش در این کار تحقیقاتی بهره برد. با توجه به اطلاعات به‌دست آمده در میابیم که ترکیب مورد آزمایش (۲-کلرو پیریمیدین) با افزایش غلظت در هر سه زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بر روی هر دو رده k562 و PBMC باعث کاهش زنده‌مانی شدند که این کاهش وابسته به غلظت بوده است به گونه

ایی که افزایش غلظت مشتق ۲-کلروپیریمیدینی، باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های توموری رده K562 شدند. امروزه یکی از رویکردهای درمانی برای درمان سرطان تمایز درمانی یا استفاده از عوامل تمایز دهنده است. از آنجایی که سلول‌های لوسمی در مراحل خاصی از تمایزشان متوقف می‌شوند این ایده ظهور پیدا کرد که با استفاده از داروهایی که این سلول‌ها را وادار به تمایز کند و در نهایت آن‌ها را به سمت مرگ ببرند می‌توان سرطان را مهار و درمان کرد. بنابراین با القاء مرگ خودبخودی سلول‌ها، احتمال عود سرطان کاهش می‌یابد و همچنین بکار بردن تمایز درمانی در کنار شیمی‌درمانی سبب حساس شدن اکثر سلول‌های سرطانی به دارو می‌گردد. از طرفی سلول‌های K562 که به‌عنوان مدل آزمایشگاهی برای لوسمی میلوئید مزمن فاز حاد در نظر گرفته می‌شوند به‌وسیله ترکیبات مختلف قادرند به رده‌های مختلف خونی شامل رده اریترئیدی، مونوسیت ماکروفاژی و رده مگاکاروسیتی تمایز پیدا کنند. بعنوان مثال Hemine تمایز اریترئیدی (۱۷) ۱۲ تتراکانویل فوریل ۱۳-استات (TPA) تمایز منوسیتی (۱۸) فوربول دی بوتیرات و فوربول ۱۲-میرستات ۱۳ - استات تمایز مگاکاریوسیت را در رده سلولی K562 القا می‌کنند (۱۹).

رنگ‌آمیزی دوگانه AO/PI رنگ‌آمیزی دوگانه روشی بسیار ساده، سریع و دقیق برای تشخیص سلول‌های آپوپتوز شده از نکروز شده می‌باشد. آکریدین به داخل همه سلول‌ها نفوذ کرده و باعث سبز رنگ شدن هسته سلول‌ها می‌گردد. اتیدیدوم بروماید فقط وارد سلول‌های می‌گردد که غشاء سلولی آن‌ها سالم نباشد و باعث ایجاد رنگ قرمز در هسته می‌شود. سلول‌هایی که تحت این دارو قرار گرفته‌اند کروماتین آن‌ها متراکم و قطعه‌قطعه شده است. سلول‌هایی که به رنگ سبز روشن، با کروماتین متراکم و قطعه‌قطعه شده می‌باشند آپوپتوز ابتدایی شده‌اند و آن‌هایی که دارای رنگ نارنجی با کروماتین متراکم و قطعه‌قطعه شده می‌باشند آپوپتوز انتهایی شده‌اند. سلول‌های نکروز دارای هسته متورم نارنجی رنگ می‌باشند (۲۱).

داده‌های به دست آمده از مشاهدات میکروسکوپ نوری و فلورسنت و نیز آزمون قطعه‌قطعه شدن DNA در مطالعه حاضر نشان دهنده وقوع آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین می‌باشد. این داده‌ها نشان داد که سلول‌های تیمار شده با این ترکیبات، به همراه هسته خود چروکیده شده و با قطعه‌قطعه شدن DNA درون هسته، اجسام آپوپتوزی شکل می‌گیرند که تأییدکننده رخداد آپوپتوز در سلول‌ها است. در مقایسه

شده سلولی و جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی از مسیری وابسته به آپوپتوز گردند و همچنین تمایز به سمت نکروز می‌شوند.

تشکر و قدردانی

تشکر و قدر دانی از جناب آقای دکتر نوروز دلیرز، سرکار خانم هانیه قربانی، سرکار خانم سامیه قربانی، سرکار خانم روشنا غفاری و مسئولین محترم بیمارستان محک تهران و تمام عزیزانی که مرا در این کار یاری کردند.

با سلول‌های سالم، سلول‌های آپوپتوزی اولیه به شکل ذرات روشن سبز رنگ در هسته چروکیده شده و سلول‌های آپوپتوزی ثانویه به شکل اجسام آپوپتوزی نارنجی رنگ دیده می‌شوند (۲۰). با توجه به این موارد و نتایج حاصل از مشاهده تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز و نیز آزمون قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 تیمار شده (در غلظت IC50) پس از زمان ۴۸ ساعت می‌توان گفت که ترکیب مورد آزمایش (۲-کلروپیریمیدین) در این کار تحقیقاتی می‌تواند باعث تمایز سلول‌های K562 به سمت مرگ برنامه ریزی

References:

- 1-Kawashima D, Asai M, Katagiri K, Takeuchi R, Ohtsuka K. Reinvestigation of the effect of carbenoxolone on the induction of heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009;14(5): 535-43.
- 2- Al-Issa SA. Synthesis and anticancer activity of some fused pyrimidines and related heterocycles. *Saudi Pharm J* 2013;21(3): 305-16.
- 3- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000 Nov 15;96(10): 3343-56.12.
- 4- Klein E, Vánky F, BenBassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976;18(4): 421-31.
- 5- Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38(4): 391-8.
- 6- Oslakovic C. The regulation of blood coagulation by high-density lipoprotein particles. Lund University; 2010.
- 7- Andreasen CB, Latimer KS. Separation of avian heterophils from blood using Ficoll-Hypaque discontinuous gradients. *Avian Dis* 1989;33(1): 163-7.
- 8- Sahi S, Tewatia P, Ghosal S. Leishmania donovani pteridine reductase 1: comparative protein modeling and protein-ligand interaction studies of the leishmanicidal constituents isolated from the fruits of Piper longum. *J Mol Model* 2012; 18(12): 5065-73.
- 9- Korgaonkar KS, Ranade SS. Evaluation of acridine orange fluorescence test in viability studies on Escherichia coli. *Can J Microbiol* 1966; 12(1): 185-90.
- 10- Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In vitro. Cell Dev Biol* 1988;24(4): 266-73.
- 11- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986;89(2): 271-7.
- 12- Dorsey JF, Jove R, Kraker AJ, Wu J. The pyrido [2, 3-d] pyrimidine derivative PD180970 inhibits p210Bcr-Abl tyrosine kinase and induces apoptosis of K562 leukemic cells. *Cancer Res* 2000;60(12): 3127-31.
- 13-Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48(3): 589-601.
- 14- Grzywacz B, Miller JS, Verneris MR. Use of natural killer cells as immunotherapy for leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21(3): 467-83.

- 15- Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400(1): 173-84.
- 16- Shiraki N, Hamada A, Ohmura T, Tokunaga J, Oyama N, Nakano M. Increase in doxorubicin cytotoxicity by inhibition of P-glycoprotein activity with lomerizine. *Biol Pharm. Bull* 2001;24(5): 555-7.
- 17- Iwasaki K, MacKenzie EL, Hailemariam K, Sakamoto K, Tsuji Y. Hemin-mediated regulation of an antioxidant-responsive element of the human ferritin H gene and role of Ref-1 during erythroid differentiation of K562 cells. *Mol Cell Biol* 2006;26(7): 2845-56.
- 18- Koiso Y, Nakajima O, Matsumura D, Fujimoto Y, Hashimoto Y. Chemical control of cell differentiation of human myeloleukemia K562 cell line. *Yakugaku zasshi* 2000;120(1): 104-12.
- 19- Sutherland JA, Turner RA, Mannoni P, McGann LE, Turc JM. Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages. *Int J Immunol Immunother* 1986;5(3): 250-62.
- 20- Samad NA, Abdul AB, Abdullah R, Ibrahim TA, Rahman H, Keong YS. Zerumbone (zer) induces apoptosis in hepg2 cells via mitochondrial pathway. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7(5): 298-302.

THE EFFECT OF 2-CHLOROPYRIMIDINE ON K562 CELL LINE

Alireza hajabbas farshchi¹, Nahideh afzal ahangaran², Amir valikhani³, Saeideh ghorbani⁴

Received: 14 Dec, 2019; Accepted: 15 Apr, 2020

Abstract

Background & Aims: Previous studies indicated that pyrimidine derivatives possess anti-cancer properties. This study was set out to evaluate the effect of 2-chloropyrimidine as a pyrimidine derivative on K562 human erythroleukemia cell line and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as normal control cells.

Materials & Methods: The K562 cells or PBMCs (1×10^6 cells/100 μ l/well) were incubated for different time periods (24, 48, and 72 h) with a serial logarithmic dilution of analogue (1.5625-200 μ g/ml). After the incubation period, the survivability of cells was determined by MTT methods. After determining IC50 value, apoptosis and necrosis of cells were measured by PI/AO staining.

Results: Our data indicated that this compound had a profound cytotoxic effect on the K562 cell line in a dose-dependent manner so that the apoptosis increased and the survival test (MTT) decreased. Interestingly, the IC50 value of this compound against K562 was lower than IC50 value of this compound against PBMCs.

Conclusion: As a result, this compound provides more favorable cytotoxicity against K562 cell line without any additive cytotoxicity against PBMCs.

Keywords: K562, PBMC, 2-chloropyrimidine, apoptosis, PI/AO, IC50, MTT.

Address: Tehran, Nelson Mandela St., Mahyar St., No. 68

Tel: +989363644117

Email: alirezafarshchi67@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(3): 198 ISSN: 2717-008X

¹ MS of Immunology, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² Assistant Professor of Immunology, Urmia University, Urmia, Iran

³ MS of Hematology, Tehran Blood Transfusion University, Tehran Blood Transfusion University, Tehran, Iran

⁴ MS of Nutritional Sciences, Animal Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran