البرز ایران، نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، دوره ۱، شماره ۲، بهار ۱۳۹۱، ۱۱۶-۱۰۹

القای آپوپتوز در سلول‌های K562 تحت تأثیر یکی از مشتقات خانواده ۴- آریل – ۴ H کرومن

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۲۸

محمدحسن ناصری[۱و۵]، سعید حسامی‌تکلو[۲و۶]
مجید مهدوی[۳*]، سیدمحمد امین موسوی[۳]
سوده اباصلتی[۳]، علیرضا فرومدی[۴]،
ابوالفضل هادی‌زاده[۵]

[۱] دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی البرز
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار
[۳] گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
[۴] گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران
[۶] شرکت تحقیقاتی زیست‌فناوران آریاژن

[*] نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
۰۴۱۱-۳۳۴۳۱۱۰
E-mail: mahdavi@gmail.com

چکیده

لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic Myelogenous Leukemia: CML) یکی از انواع شایع لوسمی‌ها است. برای درمان این بیماری ترکیبات مختلفی تاکنون برای القای تمایز و آپوپتوز ارائه شده است. ولی به دلیل مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی این ترکیبات موثر نبوده اند. یکی از ترکیباتی که خواص ضد سرطانی قوی از خود نشان می‌دهد خانواده کرومن‌ها می‌باشند. در این مطالعه تاثیر یکی از مشتقات خانواده کرومن‌ها، از نظر سیتوتوکسیسیتی و آپوپتوز بر روی سلول‌های لوسمیک K562 به عنوان مدل لوسمی میلوئیدی مزمن بررسی شده است. رده سلولی لوسمیک K562 انسانی پس از کشت، تحت تاثیر دارو در غلظت‌های مشخص (۳۰nm-۵) و فاصله‌های زمانی مختلف (۲۴-۹۶ ساعت) قرار گرفت. اثرات دارو بر روی رشد سلول‌های K562 با استفاده از آزمون MTT و زنده بودن سلول با استفاده از شمارش سلولی توسط هموسایتومتر و آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی آپوپتوز از میکروسکوپ فلورسانت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید. در این مطالعه دارو در فواصل زمانی ۲۴-۹۶ ساعت و در غلظت‌های بین ۳۰nm-۱۰ سبب مهار رشد سلولی و در غلظت‌های ۳۰ nm-۱۵ باعث کاهش زنده ماندن (Viability) می‌شود. با توجه به اثر القای آپوپتوز این ترکیب می‌تواند در کنار سایر ترکیبات دارویی برای کاهش مقاومت دارویی مورد استفاده قرار گیرد. براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت این دارو می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های K562 القا کند و به عنوان کاندیدای مناسبی برای درمان بدخیمی‌های هماتوژیک معرفی شود.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، ۴- آریل ۴- H کرومن، لوسمی میلوئیدی مزمن

مقدمه

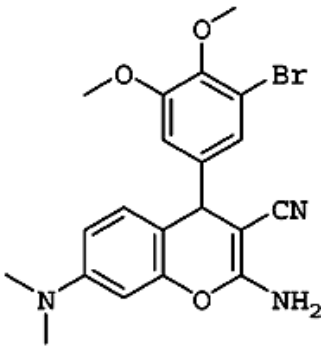
لوسمی میلوئیدی مزمن (CML: chronic myelogenous leukemia) یک بیماری بدخیم خونی است که همراه با نوعی اختلال کروموزومی می‌باشد. در بسیاری از بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن، کلون مربوط به یک سلول بنیادی که حامل کروموزوم فیلادلفیا است گسترش می‌یابد. عامل این بیماری بیشتر به دلیل ژن ادغام یافته BCR-ABL است که در سلول‌های بنیادی خون ساز ایجاد شده و به عنوان کروموزوم فیلادلفیا شناخته می‌شود. به طورکلی کروموزوم فیلادلفیا همان کروموزم کوتاه شده ۲۲ است که از جابجایی متقابل بازوی بلند کروموزوم ۹ (شامل ABL) و ۲۲ (شامل BCR) به وجود می‌آید. این جابجایی، ژن ادغام یافته، پروتئین BCR-ABL را به وجود می‌آورد که تیروزین کیناز سیتوپلاسمی فعالی است که موجب القای لوسمی در سلول‌های بنیادی خونساز می‌گردد.[۱-۳] ابزار پروتئین BCR-ABL مسیرهای انتقال پیام متعددی را فعال نموده که امکان تکثیر مستقل از سیتوکین‌ها و تنظیم استرومایی را فراهم آورده و سلول‌ها را نسبت به شیمی درمانی و مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز) مقاوم می‌نماید. روش‌های درمانی مختلفی تاکنون برای CML به کار برده شده است از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، درمان با اینترفرون آلفا، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد. اغلب داروهای شیمی درمانی با مهار تکثیر سلولی و پیش بردن سلول به سمت مرگ سلولی (آپوپتوز) فعالیت می‌کنند.[۴و۵] از ترکیباتی که فعالیت ضد سرطانی قوی داشته و

با مهار تکثیر سلولی و برهمکنش با جایگاه کلشی سین در توبولین (β) باعث مهار پلیمریزاسیون توبولین‌ها می‌شوند خانواده ی (4-aryl - 4 - H chromenes)ها هستند. این ترکیبات بر علیه برخی سلول‌هایی که مقاومت دارویی نشان می‌دهند موثرند. کرومن‌ها ترکیبات ساده ای هستند که به گروه بزرگی از مولکول‌ها به نام مشتقات بنزوپیران که ترکیبات طبیعی هستند متعلقند.[۶] توبولین‌ها از اجزای حیاتی سلول‌ها محسوب می‌شوند، این مولکول‌ها در تحرک و جابجایی کروموزوم‌ها در هنگام اینترفاز و میتوز نقش دارند. توبولین‌ها همچنین در تشکیل دوک میتوزی نقش ایفا می‌کنند که باعث انتقال کروموزوم دختری به قطبین سلولی می‌شود. لذا مهار پلیمریزاسیون توبولین‌ها منجر به توقف (arrest) چرخه ی سلولی در فاز میتوز در مرحله ی عبور از آنافاز/ متافاز می‌شود و توقف در چرخه ی سلولی سبب تولید سیگنال آپوپتوز در سلول می‌شود.[۷] ۴- آریل ۴- H کرومن‌ها بر علیه برخی سلول‌هایی که مقاومت دارویی نشان می‌دهند موثر بوده و می‌توانند در درمان بیماران سرطانی که مقاوم به عوامل آنتی‌توموری مثل تاکسانها (taxanes) هستند مفید باشند. ترکیبی که در این مطالعه از آن استفاده کردیم 2-amino- 4-(3-bromo 4, 5 dimethoxy – phenyl) -3- cyano -7- (dimethylamino) -4H-chromene; (3-BMPC) یکی از مشتقات این خانواده است که دارای استخلاف برم است (شکل ۱).[۸] رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی CML انسانی در نظر گرفته می‌شود.[۹] هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات احتمالی مهار رشدی و مرگ سلولی ترکیب 3-BMPC بر روی رده سلولی K562 به عنوان مدلی برای CML است.

مواد و روش‌ها

مواد

در این مطالعه که به روش تجربی انجام گرفت محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Biosera انگلستان تهیه شد. رنگ تریپان بلو (Trypan blue)، هوخست ۳۳۲۸۵ (Hoechst 33258) از شرکت Sigma و فلاسک‌های کشت سلول و ظروف ۹۶ و ۲۴ چاهکی از شرکت SPL life science کره جنوبی خریداری شد. اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک اسید (Ethylene diamine tetra acetic Acid (EDTA))، سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate (SDS))، تریس (Tris-HCl) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین از شرکت سیناژن (تهران-ایران) خریداری شدند. برای کشت سلول رده ی سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI-1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰µg/mL) و پنی‌سیلین (۱۰۰U/mL) بود، استفاده گردید. محیط کشت سلول‌ها در محیط استریل و زیر هود مخصوص کشت سلول هر دو روز یکبار مورد تعویض قرار گرفت. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در فلاسک‌های استریل و در انکوباتور مخصوص کشت سلولی با شرایط CO_2 ۵٪، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.



3-BMPC

شکل ۱. ترکیب ۲-آمینو-۳- سیانو-۷- (دی‌متیل آمینو)-۴- (۳ برومو ۴ و ۵ دی‌متوکسی فنیل) ۴-H کرومن (3-BMPC).

تهیه ۴-آریل ۴-H کرومن 3-BMPC

۱۰ میلی‌مولار پیپریدین (piperidine) به مخلوطی از ۳- دی‌متیل آمینو فنول (۵ میلی‌مولار)، ۳- نیتروفنیل بنزالدئید (۵ میلی‌مولار) و مالونیتریل (۵ میلی‌مولار) در اتانول (۲۰ml) اضافه شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۵ درجه برای ۱۲ ساعت حرارت داده شد. بعد از سرد کردن ، مخلوط رسوبی شکل جامد فیلتر و با اتانول سرد شسته شد و از همان محلول کریستالیزه گردید. ترکیب 3-BMPC بوسیله کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از چندین محلول با قطبیتهای متفاوت خالص گردید. ساختار این ترکیب بوسیله IR، 1H NMR و اسپکترومتری جرمی (MS) مورد تایید قرار گرفت.[۸و۱۰]

بررسی مهار رشد سلولی و زنده بودن

برای این منظور ۵×۱۰^{۴} سلول K562 را شمارش و در محیط کشت ۲۰۰ ماکرولیتر در ظروف کشت ۹۶ تایی ریخته و بعد از ۲۴ ساعت، با غلظت‌های مختلف دارو (۳۰nm-۵) برای زمان‌های متفاوت (۲۴ تا ۹۶ ساعت) تیمار شدند. در هر بازه ی زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و آزمون تریپان بلو مورد شمارش قرار گرفت. بررسی اثرکشندگی دارو بر سلول‌های K562 از آزمون احیای نمک تترازولیوم (Methyl Thiazol Tetrazolium: MTT) استفاده شد. نمک تترازولیوم به واسطه فعالیت میتوکندریایی سلول‌های زنده به بلورهای فورمازان که جذب متفاوتی دارند احیا می‌شود. به این منظور $۱۰^{۴}$ سلول در هر چاهک بارگذاری شد، پس از ۲۴ ساعت دارو غلظت‌های متفاوت دارو اضافه شد و در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ۱۰ میکرولیتر از نمک تترازولیوم (Merck آلمان) اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان جذب نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از دستگاه جذب اسپکتروفتومتر (Bio-rad) اندازه‌گیری شد.[۱۱]

مطالعه ریخت‌شناسی سلول‌های آپوپتوزی

به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌باشد از میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۸۵ استفاده شد. برای مطالعه آپوپتوز به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در رنگ آمیزی با رنگ هوخست ۳۳۲۵۸، سلول‌های طبیعی به صورت رنگ آبی یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های آپوپتوز شده به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده است. برای تهیه این محلول، ۱mg هوخست در ۱ml آب دو بار تقطیر حل گردید. بعد از رسوب و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۵×۱۰^{۵} cell/ml) با ۱µl از رنگ هوخست مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از ان روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از تهیه ی اسمیر سلول‌ها با لام پوشانده و با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss- آلمان) مشاهده گردید.[۱۲]

آزمون قطعه قطعه شدن DNA

با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA وقوع آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول‌های کنترل و تیمار شده با دارو تحت تاثیر بافر لیز کننده [SDS 0.1 EDTA 10 mM, W/V, Tris-HCl 10 mM, (pH 7.4)] قرار گرفتند پس از سانتریفوژ DNA با استفاده از ترکیب فنل ـ کلروفورم ـ ایزوآمیل الکل جداسازی شده با اتانول مطلق و۵ مولار NaCl به مدت یک شب رسوب داده شد. در نهایت رسوب DNA در بافر ۱۰mM (Tris – HCl, EDTA 10mM)TE حل شد و روی ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ۱۰ ولت بارگذاری (Load) شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقایسه میزان رشد و زنده بودن بین سلول‌های تحت تیمار با دارو و مقایسه آن با سلول‌های تیمار نشده صورت گرفت و از آزمون t-test برای یافتن اختلافات معنادار استفاده شد. در این آزمون داده هایی با $p<۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

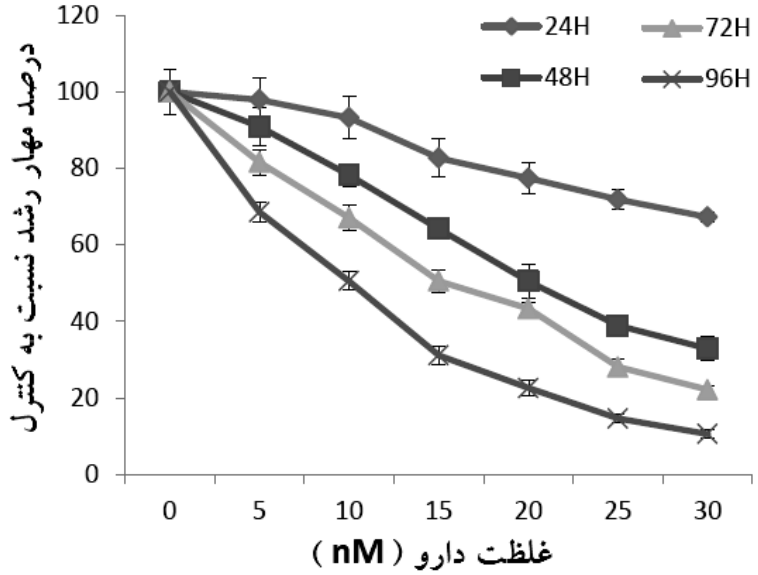
مطالعه رشد و زنده بودن سلول‌های K562 تیمار شده با 3-BMPC

اثرات غلظت‌های متفاوت 3-BMPC بر روی رشد سلول‌های K562 با فاصله‌های زمانی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۱ بیانگر مهار رشد سلول‌های K562 بعد از یک بار تیمار با دارو با

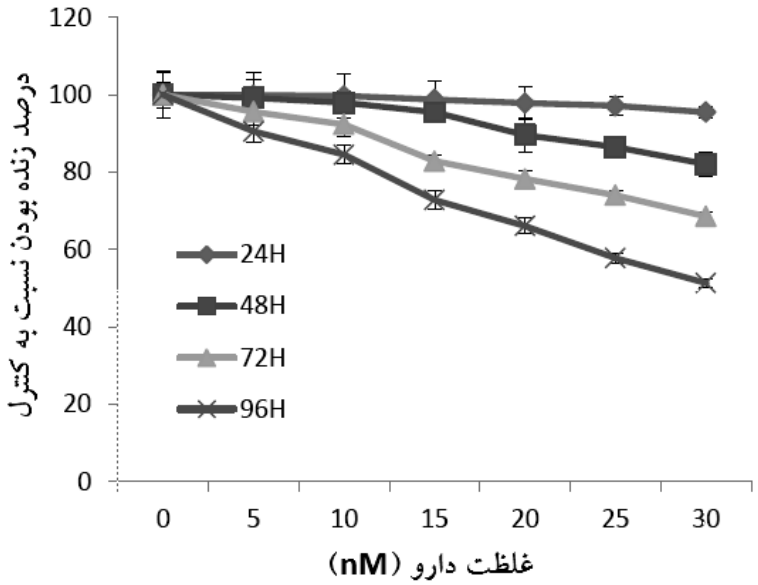
غلظت‌های متفاوت (5nm-30) در زمان‌های مختلف (24-96 ساعت) می‌باشد. IC50 این ترکیب برای سلول‌های K562 بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب۲/۳±۲۰، ۱/۶±۱۵ و ۳/۱±۱۰ نانو مولار محاسبه گردید (شکل ۱). همان طور که در شکل شکل ۱ مشاهده می‌شود اثرات مهار رشدی دارو بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شده و به صورت وابسته به زمان افزایش می‌یابد به طوری که در ۹۶ ساعت به بیشترین میزان خود می‌رسد. به عنوان مثال در غلظت ۲۰nM و بعد از زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت رشد سلول‌ها به ترتیب به میزان ۲۲/۵۶، ۴۳/۲۷، ۵۰/۴ و ۷۷/۳ کاهش می‌یابد. این اثرات هم چنین به صورت وابسته به غلظت نیز بعد از ۹۶ ساعت تیمار با دارو در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ نانو مولار رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۲۶/۵، ۵۰/۴، ۷۱/۱، ۷۶/۵، ۸۲/۵۶ و ۸۹/۶ مهار می‌شود. (شکل ۱). داده‌های بدست آمده از آزمایش MTT (شکل ۲) نشان می‌دهد که دارو علاوه بر مهار چشمگیر رشد سلولی، موجب القای مرگ سلولی آپوپتوز در بین سلول‌های تحت تیمار با دارو می‌گردد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود زنده بودن سلول‌هایK562 تحت اثر دارو در ۲۴ ساعت تغییر معناداری را نشان نمی‌دهد. البته این در حالی است که زنده بودن در ۴۸ ساعت شروع به کاهش می‌کند و در ۷۲ ساعت و در نهایت در ۹۶ ساعت کاهش چشم‌گیری به صورت وابسته به غلظت مشاهده می‌شود.

به عنوان نمونه زنده بودن سلول‌های تحت تیمار با دارو در غلظت‌های ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ نانو مولار در ۹۶ ساعت به ترتیب به میزان ۲۳/۳، ۲۷/۸، ۴۲/۸ و ۵۰/۱ در مقایسه با کنترل کاهش می‌یابد.

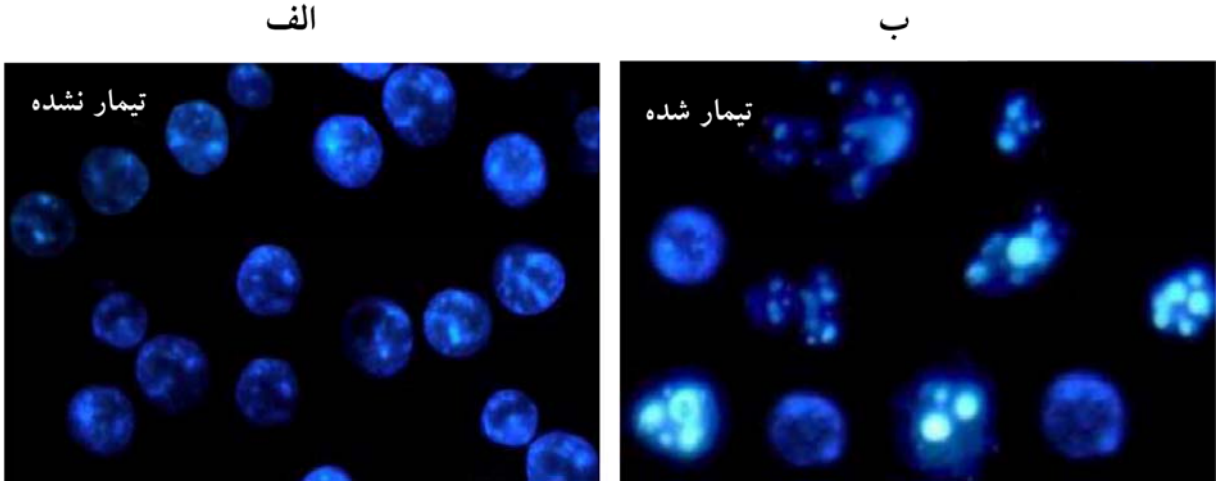
مطالعات اثرات دارو بر روی سلول‌های K562 با استفاده از روش MTT و رنگ تریپان بلو نشان دهنده آن است که دارو سبب مرگ سلولی می‌شود (شکل ۲). برای مشخص شدن نوع مرگ سلولی و بررسی این موضوع که آیا دارو سبب القای مرگ از طریق آپوپتوز می‌شود یا خیر از میکروسکوپ فلورسنت و تست قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.



شکل۱. تاثیر وابسته به غلظت و زمان ترکیب 3-BMPC روی مهار رشد (Growth inhibition) سلول‌های K562. سلول‌ها با دوزهای مختلفی از ترکیب 3-BMPC برای مدت زمان۲۴(◆)، ۴۸(■)، (▲)۷۲ و (✕)۹۶ ساعت تیمار شدند. هر آزمایش سه مرتبه تکرار گردید، $p\leq 0.05$.



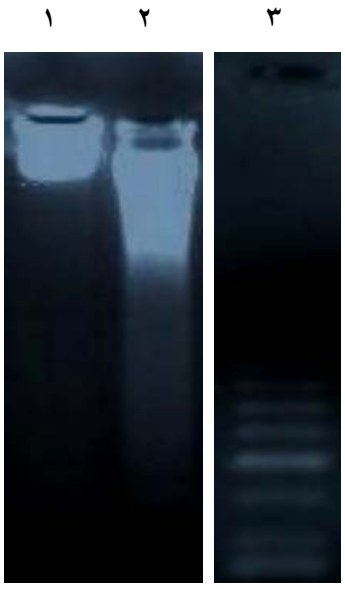
شکل۲. اثرات وابسته به غلظت و زمان دارو بر روی مرگ سلولی سلول‌های K562. توانایی زنده ماندن سلول‌ها با کمک تست MTT بررسی شد. سلول‌ها با دوزهای مختلفی از ترکیب 3-BMPC برای مدت زمان۲۴(◆)، ۴۸(■)، (▲)۷۲ و (✕)۹۶ ساعت تیمار شدند. نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل می‌باشد. $p\leq0.05$.



شکل۲. القای آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده با ترکیب 3-BMPC بعد از ۷۲ ساعت. بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت مشخص دارو به مدت ۷۲ ساعت، خصوصیات ظاهری آپوپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸ مورد بررسی قرار گرفت. وجود اجسام آپوپتوتیک نشان از وقوع آپوپتوز می‌باشد. الف: سلول‌های K562 تیمار نشده (کنترل). ب: سلول‌های K562 تیمار شده در غلظت IC50 (۱۵ نانومولار) بعد از ۷۲ ساعت.

بررسی اثرات دارو بر القاء آپوپتوز در سلول‌های K562

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشخص شد که در میان سلول‌های تیمار شده با دارو (در غلظت IC50) پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌های با اجسام آپوپتوتیک که نشان دهنده مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است دیده می‌شود. همچنین برای اثبات بیشتر موضوع از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۴، DNA تیمار شده با دارو به صورت لکه (Smear) بر روی ژل آگارز مشاهده می‌شود در حالی که این حالت در سلول‌های تیمار نشده مشاهده نمی‌گردد. بنابراین، این آزمون در کنار داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنت به طور کامل اثبات می‌کند که دارو از طریق آپوپتوز سبب القای مرگ در سلول‌های سرطانی K562 می‌شود.



شکل ۴. ژل الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول‌های K562 تیمارشده با ۱۵ نانومولار از ترکیب 3-BMPC. DNA ژنومی سلول‌های تیمار نشده (کنترل) و تیمار شده با دارو (غلظت ۱۵ نانومولار) به مدت ۷۲ ساعت، استخراج شد و به کمک الکتروفورز میزان قطعه قطعه شدن DNA به عنوان شاخصی برای آپوپتوز بررسی گردید. چاهک ۱: DNA سلول‌های تیمار نشده (کنترل)، چاهک ۲: DNA سلول‌های تیمار شده با دارو، چاهک ۳: DNA شاخص.

بحث

شیمی درمانی بیماران سرطانی در سال‌های اخیر با اهمیت فزاینده ای همراه بوده است. تاکنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه ای در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی به چشم می‌خورد. خصوصاً که افزایش دانش ما در مورد دانش بیولوژی تومور، مکانیسم عمل داروهای آنتی‌نئوپلاستیک را برای ما روشن تر کرده است. این موضوع همچنین پایه ای برای طراحی منطقی تر داروهای ضد سرطان بوده است.

با توجه به فاکتور مقاومت دارویی در رده‌های سرطانی سلول‌های خونی تلاش‌های گسترده ای در جهت دارویی شدن، جریان دارد.[۱۳] بسیاری از ترکیبات ضد سرطانی با ایجاد توقف در چرخه سلولی در G_1، S یا G_2/M باعث القای مرگ سلول آپوپتوز می‌شوند. نقاط کنترل چرخه سلولی یکی از نقاطی است که سلول برای تعمیر DNA خود اتخاذ می‌کند و مرگ سلولی باعث حذف سلول هایی که دچار صدمات جبران ناپذیری شدند می‌گردد. براساس مطالعاتی که انجام شده کرومن‌ها باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_2/M می‌شوند. تجمع در فاز G_2/M عمدتاً بر اثر عوامل تخریب کننده DNA مانند تشعشعات γ، ترکیبات پایدار کننده ی میکروتوبول و مهار کننده ی توپوایزومرازها می‌باشد.[۱۴]

ترکیبات 3-BMPC یکی از ترکیبات خانواده کرومن‌ها می‌باشد و به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب مهار رشد تا ۹۰٪ در سلول‌های K562 می‌گردد. K562 به عنوان مدلی برای اریترولوکمیا CML محسوب می‌شود به بطوری که غلظت و زمان بهینه ی 3-BMPC، ۱۵±۳/۱ نانو مولار بعد از ۷۲ ساعت از تیمار می‌باشد (شکل ۱). همچنین داده‌های بدست آمده از میکروسکوپ فلوروسنت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA نشان داد که دارو سبب القای آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود (شکل ۳ و۴).[۱۵] به طورکلی آپوپتوز براساس محرک یا القا کننده ی آن از مسیرهای مختلفی به وقوع می‌پیوندد. امروزه دو مسیر اصلی القای آپوپتوز شناسایی شده است، مسیر خارج سلولی و مسیر داخل سلولی که هر دو مسیر از طریق فعال شدن کاسپازها منجر به مرگ سلولی آپوپتوز می‌شوند.[۱۶] از آنجایی که اختلال در فرایند آپوپتوز یکی از نقص‌های رایج در

سلول‌های سرطانی می‌باشد، القای آپوپتوز می‌تواند به عنوان یکی از استراتژی‌های مورد توجه در درمان سرطان به شمار آید، اثر آپوپتوزی این دارو بر سلول‌های K562 حائز اهمیت است. تحقیقات قبلی اثرات مشتقات مختلفی از کرومن‌ها بر روی رده‌های سلولی سرطانی، مهار رشد و وقوع آپوپتوز را نشان داد.[۱۷] در این تحقیق اثرات سیتوتوکسیک ترکیب دیگری از این خانواده (3-BMPC) و همچنین القای آپوپتوز در رده سلولی خونی K562 بررسی شد. براساس اطلاعات داده شده در مطالعه حاضر به خوبی روشن است که ترکیب حاضر (3-BMPC) باعث القای آپوتوز در رده سرطانی K562 می‌گردد. از نقطه نظر مکانیسمی و با توجه به اطلاعات موجود یکی از شناخته شده ترین برهم کنش 3-BMPC با میکروتوبول، بر هم کنش آن از طریق اتصال به توبولین (β) در محل اتصال کلشی سین یا در نزدیکی آن است. به نظر می‌رسد القای آپوپتوز از طریق مهار کردن عملکرد میکروتوبول‌ها از طریق تنظیم ژن‌های تنظیم کننده آپوپتوز مانند Bcl-2, p53 و Bel-x باشد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که این ترکیبات باعث فسفوریلاسیون Bcl-2 شده و این فسفوریلاسیون باعث آغاز فعالیت کاسپازها می‌گردد.[۱۸و۱۹] با توجه به رفتار موثر این ترکیب در القای آپوپتوز، لذا با مطالعات بیشتر بر روی این ترکیب می‌توان از آن در آینده به عنوان دارویی در درمان CML استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که 3-BMPC، یکی از ترکیبات خانواده کرومن‌ها به دلیل دارا بودن خاصیت سیتوتوکسیک و القای آپوپتوزی به عنوان یکی از ترکیبات مناسب ضد سرطان از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این ترکیب بر روی رده سلولی K562 به عنوان مدلی برای CML (لوسمی میلوسیتی مزمن) اثرات آپوپتوزی شدیدی از خود نشان داد به طوری که این ترکیب در غلظت ۱۵ نانومولار در زمان ۷۲ ساعت بیش از ۵۰ درصد مرگ سلولی را افزایش داده است. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از القای آپوپتوز در سلول‌های K562 توسط این ترکیب، ممکن است در آینده راه را برای درمان CML هموار نماید.

References

1. Cortes J. :Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2004; 18:569–84.
2. Faderl S. Talpaz M. Estrov Z. O'Brien S. Kurzrock R. Kantarjian HM.: The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999; 341(3): 164-172
3. Faderl S. Talpaz M. Estrov Z. Kantarjian HM. :Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. Ann Intern Med. 1999; 131: 207–19.
4. Clarkson B. Strife A. Wisniewski D. Lambek CL. Liu C.: Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. Leukemia 2003; 17(7): 1211-1162.
5. Goldman JM. Melo JV.:Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment.N Engl J Med. 2003; 349(15): 1451
6. Kemnitzer W. Jiang S. Wang Y. et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay. Part 5: Modifications of the 2-and 3-positions . Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2008; 18: 603–607
7. Hait W. Rubina E. Alli E.et al :Tubulin Targeting Agents. update on cancer therapeutics 2007; 2: 1–18
8. Kemnitzer w. Songchun J. Wang Y et al: Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay. Part 5: Modifications of the 2- and 3-positions. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2008; 18: 603–607
9. 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; 38:391-8.
10. Foroumadi A. Dehghan G.. Samzadeh-Kermani A.. Arabsorkhi F. Sorkhi M. Shafiee A. et al.: Synthesis and antioxidant activity of some 2-amino-4-aryl-3-cyano-7-(dimethylamino)-4H-chromenes. Asian Journal of Chemistry 2007; 19(2): 1391-96.
11. Chen TR. :In situ detection of Mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp Cell Res. 1977; 104: 255–62.
12. Rowinsky EK. :The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. Annu Rev Med. 1997; 48: 353 –74.

13. Galluzzi L. Morselli E. Kepp O et al: Mitochondrial gateways to cancer. Molecular Aspects of Medicine 2010; 31: 1–20.

14. Lu MC. Yang SH. Hwang SL et al: Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. Life Sciences 2006; 78: 2378 – 2383

15. Kasibhatla S. Gourdeau H. Meerovitch K. et al: Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. Mol Cancer Ther. 2004; 3: 1365 –73.

16. Domingo PM and Steller H. : Pathways regulating apoptosis during patterning and development. Current Opinion in Genetics & Development 2007; 17: 294–299.

17. Gourdeau H. Leblond L. Hamelin B. et al: Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano- 4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. Mol Cancer Ther. 2004; 3: 1375 –83.

18. Fan W.: Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. Biochem Pharmacol. 1999; 57: 1215–21.

19. Kasibhatla S. Gourdeau H. Meerovitch K et al: Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. Mol Cancer Ther. 2004; 3(11)