

القا تمایز و مرگ سلولی مشتقی از خانواده ی ۴-آریل - ۴-H کرومن ها بر روی NB4،

لوسمی پرمیلوسیت حاد انسان

محمد حسن ناصری MD^۱، سعید حسامی تکلو Ph.D.^۲، مجید مهدوی Ph.D.^{۳*}، سید محمد امین موسوی Ph.D.^۴،
سوده اباضلی M.Sc.^۴، علیرضا فرومدی Ph.D.^۴

- ۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی البرز و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه الله تهران
 - ۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار
 - ۳- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
 - ۴- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- * پست الکترونیک نویسنده مسئول: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۹

چکیده

هدف: در این مطالعه تاثیر یکی از مشتقات خانواده کرومنها (3-BMPC) در القا تمایز و آپوپتوزیس در سلولهای لوسمی NB4 به عنوان مدل لوسمی پرمیلوسیتی حاد (Acute promyelocytic leukemia: APL) بررسی شده است.

مواد و روشها: اثر سمی 3-BMPC (cytotoxic) بر روی سلولهای لوسمیک NB4 از طریق شمارش سلولی به وسیله هموسایتومتر بررسی شد و زنده بودن سلول با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی تمایز از رنگ آمیزی رایت گیمسا و فعالیت فاگوسیتوز (بیگانه خواری) سلولهای تمایز یافته و برای بررسی آپوپتوزیس از رنگ آمیزی سلولها با هوخست ۳۳۲۵۸ و مشاهده با میکروسکوپ فلورسنس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.

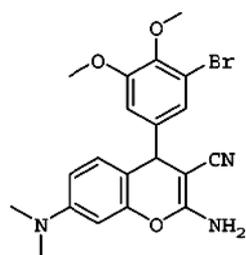
نتایج: رده سلولی لوسمی NB4 انسانی پس از کشت، تحت تاثیر دارو در غلظت‌های مشخص (۱ تا ۱۲ نانومولار) و فاصله‌های زمانی مختلف (۲۴ تا ۷۲ ساعت) قرار گرفت. مطالعه حاضر نشان داد که این ترکیب سبب مهار رشد وابسته به زمان و غلظت می‌گردد. IC50 این ترکیب بعد از ۷۲ ساعت ۳ نانومولار محاسبه گردید. نتایج نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت از تیمار سلولها با غلظت‌های پایین (۳ نانو مولار) از 3-BMPC، سلولهای NB4 به سمت ماکروفاژ/ مونوسیت تمایز یافتند. نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلولها با هوخست ۳۳۲۵۸ نیز نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت از تیمار سلولها با غلظت IC50 ترکیب، آپوپتوزیس در سلولها القا شد.

نتیجه گیری: با توجه به اثر این ترکیب در القای تمایز و آپوپتوزیس، این ترکیب می‌تواند در کنار سایر ترکیبات دارویی به عنوان کاندیدای مناسبی برای درمان سرطان خون معرفی شود.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، ۴-آریل - ۴-H کرومن، تمایز، لوسمی پرمیلوسیت حاد (APL)، سلول NB4

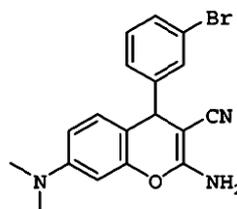
مقدمه

توسط غشا محصور شده اند، تبدیل می‌گردد. جزئیات ریخت شناسی (مورفولوژی) این مرگ سلولی عبارتند از متراکم شدن هسته و سیتوپلاسم، چروکیده شدن سلول و سرانجام قطعه قطعه شدن DNA هسته ای درون اجسامی موسوم به اجسام آپوپتوزی (apoptotic bodies) (۹). تاکنون ترکیبات مختلفی برای القای تمایز و آپوپتوزیس جهت درمان لوسمی گزارش شده است. خانواده ۴-آریل - ۴-H کرومن ها (4-aryl-4-H chromenes) ترکیبات حلقوی هستند که فعالیت ضد سرطانی قوی داشته و با مهار تکثیر سلولی و برهم کنش با جایگاه کلشی سین در توبولین (β) باعث مهار پلیمریزاسیون توبولین ها شده که منجر به توقف (arrest) سیکل سلولی و آپوپتوزیس می‌گردند (۱۰ و ۱۱). فعالیت خانواده ۴-آریل - ۴-H کرومن ها با تغییر در بنیان R موجود در موقعیت ۴ بر اساس رابطه بین ساختار و فعالیت (SAR) با ثابت نگه داشتن گروه آمین در موقعیت ۲، گروه سیانید در موقعیت ۳ و گروه دی‌متیل‌آمین در موقعیت ۷ مورد بررسی قرار گرفته است. تاکنون ترکیبات متعددی از این ترکیبات سنتز شده که دارای فعالیت ضد سرطانی قوی می‌باشند. بنیان فنیل (Phenyl) در موقعیت ۴ فعالیت این ترکیبات را در حد نانومولار افزایش می‌دهد. به گروه فنیل می‌توان گروه‌های مختلفی اضافه نمود و فعالیت آپوپتوزی این ترکیبات را ارزیابی کرد. مطالعات نشان داده است که وجود گروه‌های کوچک، هیدروفوب و الکترون کشنده (electron-withdrawing) مثل گروه برم (Br) در موقعیت ۳ گروه فنیل (R) فعالیت این ترکیبات را افزایش می‌دهد (شمای ۱ الف).



3-BMPC

ب



3-BC

الف

شمای ۱. الف) ۲-آمینو-۳-سیانو-۷-(دی‌متیل‌آمینو)-۴-(۳ برومو) ۴-H کرومن، ب) ۲-آمینو-۳-سیانو-۷-(دی‌متیل‌آمینو)-۴-(۳ برومو ۴ و ۵ دی‌متوکسی فنیل) ۴-H کرومن (3-BMPC).

ترکیب می‌گردد (۱۰). بدین منظور مشتقی از این خانواده با نام 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromene-7-(dimethylamino) (BMPC) مورد بررسی قرار گرفت (شمای ۱ ب). هدف از مطالعه

علی‌رغم پیشرفت‌های محققین در شناسایی علل سرطان، هنوز درمان قطعی برای این نوع بیماران وجود ندارد. لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic leukemia: APL) یکی از انواع سرطان خون با جابجایی کروموزومی ۱۵ و ۱۷ [T(15, 17)] و تجمع پرومیلوسیت های نئوپلاستیک است که در تبدیل شدن به سلول‌های بالغ ناتوانند (۱). رده سلولی NB4 سلول‌های از خانواده لوسمی پرومیلوسیتیک (یا میلوئیدی) حاد است که به عنوان مدلی مناسب در تحقیقات بر روی لوسمی استفاده می‌شود (۲). روش‌های درمانی مختلفی تاکنون برای APL به کار برده شده است که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد. اغلب داروهای شیمی درمانی با مهار تکثیر سلولی و پیش بردن سلول به سمت مرگ سلولی (آپوپتوزیس) فعالیت می‌کنند (۳ و ۴). مطالعات بر روی سلول‌های NB4 نشان می‌دهد که این رده سلولی به‌وسیله تیمار با آل-ترانس رتینوئیک اسید (all-trans-retinoic acid: ATRA)، ۱۲-۰ تترادکانوئیل فوربول - ۱۳-استات (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: TPA) و دی‌متیل‌سولفوکساید (dimethylsulfoxide: DMSO) می‌تواند به گرانولوسیت، مونوسیت/ماکروفاژ و نوتروفیل تمایز یابد (۵، ۶ و ۷). علاوه بر آن گزارش شده است که در بسیاری موارد، تمایز سلول‌های لوسمی با آپوپتوزیس همراه است (۸). آپوپتوزیس نوعی از مرگ سلولی سازمان یافته جهت حذف سلول‌های غیر نرمال است که سلول‌ها به اجسامی کوچک که

وجود گروه‌های الکترون کشنده در موقعیت ۳ فعالیت را افزایش داده و وجود گروه‌های الکترون دهنده (electron-donating) مثل گروه OMe (متوکسی) در موقعیت ۴ وقتی گروه الکترون کشنده در موقعیت ۳ وجود دارد، باعث افزایش فعالیت

جرمی (MS) در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تایید قرار گرفت (۱۰ و ۱۲).

بررسی مهار رشد و زنده بودن (Viability): برای این منظور 5×10^4 سلول NB4 را شمارش و در محیط کشت ۲۰۰ میکرولیتر در ظروف کشت ۹۶ تایی ریخته و بعد از ۲۴ ساعت، با غلظت‌های مختلف دارو (۱ تا ۱۲ نانومولار) برای زمان‌های متفاوت (۲۴ تا ۷۲ ساعت) تیمار شدند. در هر بازه‌ی زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و آزمون تریپان بلو مورد شمارش قرار گرفت.

مطالعه ریخت شناسی سلول های تمایز یافته: به منظور بررسی وقوع تمایز از میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی رایب و گیمسا (Wright giemsa) استفاده شد. این نوع رنگ‌آمیزی برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلول (هسته و سیتوپلاسم) که در معرض ترکیبات دارویی مختلفی قرار گرفته بکار برده شد (۱۳ و ۱۴).

آزمایش فاگوسیتوز ذرات لاتکس (Latex Particle): احتمال تمایز سلول‌ها به ماکروفاژ از طریق بررسی توانمندی آن‌ها در بلعیدن ذرات لاتکس پوشیده شده با پروتئین بررسی شد. در این خصوص، سوسپانسیونی از محلول لاتکس با PBS به نسبت ۱/۱۰ رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به سلول‌های کنترل و دارو دیده (۵۰ هزار سلول) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با ۲۰ درصد PBS اضافه شد. مخلوط برای ۶۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد. هر نمونه سلولی سپس ۳ مرتبه با PBS سرد شسته شده و مجدداً در PBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. سلول‌هایی که حداقل ۱۰ ذره لاتکس را بلعیده باشند مثبت در نظر گرفته شدند (۱۳).

مطالعه ریخت شناسی سلول های آپوپتوزی: به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس می‌باشد، از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲۸۵ استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های طبیعی به صورت رنگ آبی یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های دستخوش آپوپتوزیس 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، ۱ میلی‌گرم هوخست در ۱ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. بعد از رسوب و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات،

حاضر ساخت ترکیب 3-BMPC نبوده بلکه بررسی اثرات احتمالی مهار رشد، تمایز و مرگ سلولی (آپوپتوزیس) این ترکیب بر روی رده سلولی NB4 به‌عنوان مدلی برای APL 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. اتیلن دی آمین Tetra acetic Acid (Ethylene diamine tetra acetic Acid) سدیوم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate (SDS))، تریس (Tris-HCl) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین از شرکت سیناژن (تهران - ایران) خریداری شدند. برای کشت سلول، رده‌ی سلولی NB4 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI-1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) 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 درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

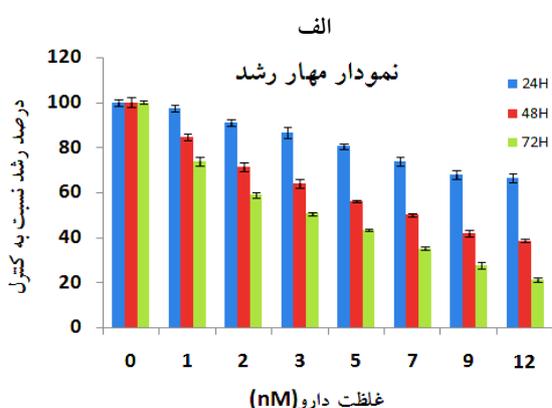
تهیه ۴-آریل-۴-H-کرومن 3-BMPC ۱۰ میلی‌مولار پیپریدین (piperidine) به مخلوطی از ۳-دی متیل آمینو فنول (۵ میلی‌مولار)، ۳-نیتروفنیل بنزالدئید (۵ میلی‌مولار) و مالونیتریل (۵ میلی‌مولار) در اتانول (۲۰ میلی‌لیتر) اضافه شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۲ ساعت حرارت داده شد. بعد از سرد کردن، مخلوط رسوبی شکل جامد فیلتر و با اتانول سرد شسته شد و از همان محلول کریستالیزه گردید. ترکیب 3-BMPC به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از چندین محلول با قطبیت‌های متفاوت خالص گردید. ساختار این ترکیب بوسیله IR، 1H NMR و اسپکترومتری

معنادار استفاده شد. در این آزمون داده هایی با $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

مطالعه رشد و زنده بودن سلول های NB4 تیمار شده با 3-BMPC

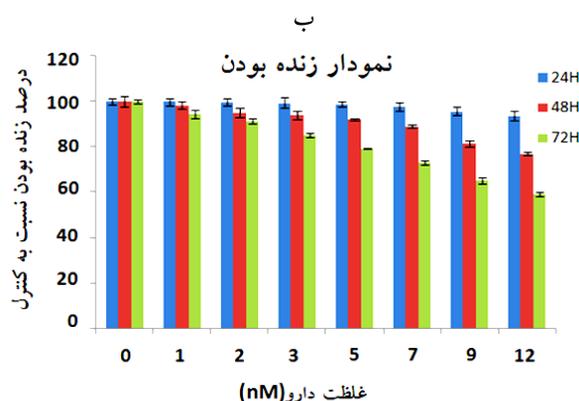
در راستای تاثیر 3-BMPC بر روی سلول های NB4 (لوسمی پرومیلوپوستی) ابتدا محدوده IC50 تعیین شد. بدین منظور ابتدا 5×10^5 از سلول های NB4 شمارش و در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و با غلظت های مختلف ۱ تا ۱۲ نانومولار تیمار گردید. در مرحله ی اول اثرات مهار رشدی که توسط دارو بر روی سلول ها القا شد با روش شمارش سلولی از طریق هموسایتومتر و رنگ آمیزی تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱-الف مشاهده می گردد تیمار سلول ها با غلظت های متفاوت دارو در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث کاهش چشمگیر رشد سلولی گردید. مهار رشد سلولی سلول های NB4 تیمار شده با دارو به طور محسوس از غلظت ۳ نانومولار در زمان ۲۴ ساعت شروع و تا ۷۲ ساعت ادامه داشت (شکل ۱-الف و ب).



۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (5×10^5 سلول در میلی لیتر) با ۱ میکرولیتر از رنگ هوخست مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از تهیه ی اسمیر سلولی پوشانده شده بر روی لام با میکروسکوپ فلورسنس (Zeiss- آلمان) مشاهده گردید (۱۵).

آزمون قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA وقوع آپوتوزیس مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول های 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 - کلروفرم - ایزوآمیل الکل جداسازی شده با اتانول مطلق و ۵ مولار NaCl به مدت یک شب رسوب داده شد. در نهایت رسوب DNA در بافر (Tris - HCl, ۱۰mM) EDTA 10mM حل شد و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۰ ولت بارگذاری (Load) شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل داده ها: مقایسه ی میزان رشد و زنده بودن بین سلول های تحت تیمار با دارو و مقایسه ی آن با سلول های تیمار نشده صورت گرفت و از آزمون t-test برای یافتن اختلافات



شکل ۱: اثرات وابسته به غلظت و زمان دارو بر روی مهار رشد (الف) و زنده بودن (ب) سلول های NB4. سلول های NB4 در ظروف کشت ۹۶ خانه ای کشت شدند. سپس سلول های هر چاهک با غلظت های مختلف دارو در زمان های متفاوت تیمار گردید. مهار رشد و توانایی زنده ماندن سلول ها با کمک تست تریپان بلو بررسی شد. نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل می باشد، $p \leq 0.05$

(شکل ۱-الف). داده های بدست آمده از آزمایش تریپان بلو (شکل ۱-ب) نشان داد که دارو علاوه بر مهار رشد سلولی، موجب القای مرگ سلولی آپوتوزیس در بین سلول های تحت تیمار با دارو می گردد. همانطور که در شکل ۱-ب مشاهده می شود زنده بودن سلول های NB4 تحت اثر دارو در ۲۴ ساعت تغییر معناداری را نشان نمی دهد. این در حالی است که در ۴۸ و

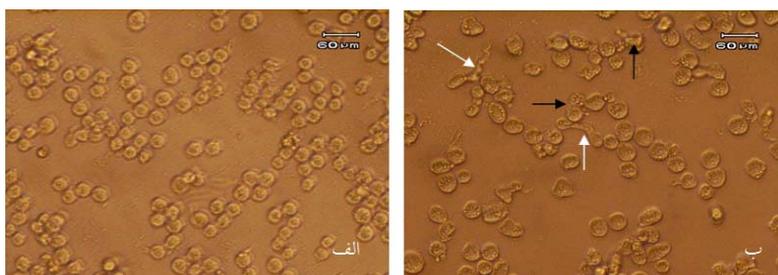
همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می شود اثرات مهار رشدی دارو بر روی سلول های NB4 به صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش یافته به طوری که در غلظت ۳ و ۱۲ نانومولار (در ۷۲ ساعت) به ترتیب به $50 \pm 1/3$ و $18 \pm 2/2$ درصد نسبت به سلول های کنترل رسید. IC50 این دارو بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب 1.1 ± 0.7 و 0.6 ± 0.3 نانو مولار محاسبه گردید

در غلظت‌های مختلف و در زمان ۷۲ ساعت با میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. تغییرات ریخت‌شناسی در سلول‌ها از ۱۲ ساعت به بعد پس از تیمار آن‌ها با ترکیب 3-BMPC شروع شد به طوری که ابتدا سلول‌ها شروع به چسبیدن به ظرف کشت نموده و تشکیل پاهای کاذب دادند. تشکیل پاهای کاذب در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد. تشکیل پاهای کاذب (پیکان‌های سفید) از ۲۴ ساعت شروع شده و تا ۷۲ ساعت ادامه یافت. در مقایسه با سلول‌های کنترل، در بیشتر از ۶۰ درصد سلول‌ها، نسبت سیتوپلاسم به هسته وسیعتر شد (شکل ۳-الف). این حالت نشان از تمایز سلول‌ها به سلول‌های مونوسیت/ماکروفاژ می‌باشد. جهت تایید تمایز سلول‌های تیمار شده با دارو به سلول‌های مونوسیت/ماکروفاژ، آزمایش فاگوسیتوز ذرات لاتکس انجام شد. همانطور که در شکل ۳-ب دیده می‌شود سلول‌های تیمار شده با غلظت مشخص دارو (۳ نانومولار) قادر به فاگوسیتوز ذرات لاتکس بعد از ۷۲ ساعت می‌باشند.

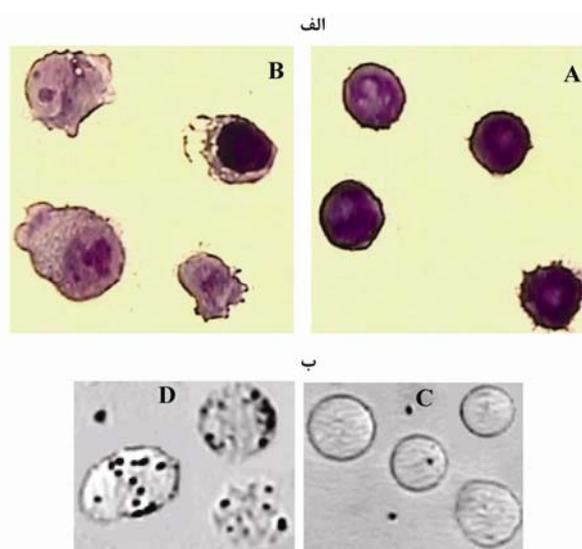
۷۲ ساعت (در غلظت‌های بالا) به صورت وابسته به غلظت کاهش چشم‌گیری مشاهده می‌شود. به طوری که بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار با ۹ نانومولار دارو، زنده بودن سلول‌های NB4 به ترتیب $20 \pm 3/5$ و $32 \pm 2/7$ درصد کاهش یافت.

بررسی القا تمایز سلول‌های NB4 تیمار شده با دارو

به منظور بررسی مهار رشد و القا تمایز، سلول‌های سرطانی NB4 در محیط کشت RPMI1640 کشت داده شدتد. تعداد سلول‌های کنترل NB4 با گذشت زمان به طور فزاینده‌ای افزایش یافته در حالی که در سلول‌های تیمار شده در غلظت‌های بین ۱ تا ۱۲ نانومولار روند رشد سلولی کند شده و در نهایت موجب کاهش در تعداد سلول‌های تیمار شده با دارو نسبت به کنترل گردید (شکل ۱-الف). این نکته که دارو در زمان‌های کوتاه مانند ۲۴ ساعت بر روی کاهش تکثیر سلولی تاثیرگذار است می‌تواند نشان از تاثیر دارو بر روی چرخه سلولی باشد. اثرات دارو بر روی ریخت‌شناسی سلول‌های NB4 تیمار شده



شکل ۲: ریخت‌شناسی سلول‌های NB4 (الف). سلول‌های NB4 در عدم حضور دارو، ب: سلول‌های NB4 تیمار شده با ترکیب 3-BMPC در غلظت IC50 و در زمان ۷۲ ساعت، پیکان‌های سیاه سلول‌های آپوپتوزی و پیکان‌های سفید سلول‌های تمایز یافته را نشان می‌دهد.



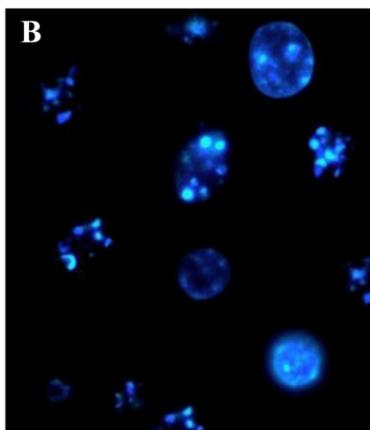
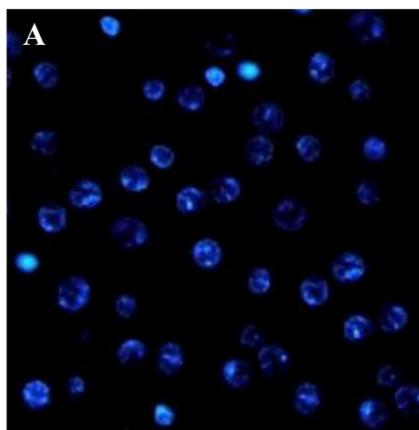
شکل ۳: (الف) تغییرات ریخت‌شناسی حاصل از رنگ‌آمیزی رایت-گیمسای سلول‌های NB4 تیمار شده با ۳ نانومولار از دارو بعد از ۴۸ ساعت. (A) سلول‌های کنترل؛ (B) سلول‌های دارو دیده. ب) فعالیت فاگوسیتوز (بیگانه‌خواری) در سلول‌های NB4 بعد از ۴۸ ساعت از تیمار با ۳ نانومولار از دارو. (C) سلول‌های کنترل؛ (D) سلول‌های در حضور دارو.

بررسی اثرات دارو بر القا آپوپتوز در سلول های NB4

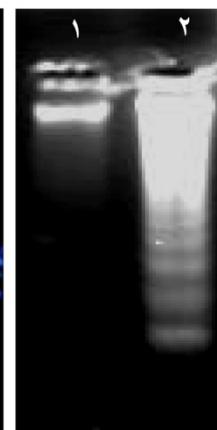
مطالعات اثرات دارو بر روی سلول های NB4 با استفاده از رنگ تریپان بلو نشان دهنده ی آن است که دارو سبب مرگ سلولی می شود (شکل ۱-ب). برای مشخص شدن نوع مرگ سلولی و بررسی این موضوع که آیا دارو سبب القای مرگ از طریق آپوپتوز می شود یا خیر از میکروسکوپ فلورسنس و تست قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید. همان طور که در شکل ۴-الف مشاهده می شود مشخص شد که در میان سلول های تیمار شده با دارو (در غلظت IC50) پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول های کنترل، سلول های با اجسام آپوپتوتیک که

نشان دهنده مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس است دیده می شود. همچنین برای اثبات بیشتر موضوع از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۴-ب، DNA ی تیمار شده با دارو به صورت نردبانی (Ladder) بر روی ژل آگارز مشاهده می شود در حالی که این حالت در سلول های تیمار نشده مشاهده نمی گردد. بنابراین، این آزمون در کنار داده های به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنس به طور کامل اثبات می کند که دارو از طریق آپوپتوزیس سبب القای مرگ در سلول های سرطانی NB4 شده است.

الف



ب



شکل ۴: الف) مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس در سلول های NB4 تیمار شده با ترکیب 3-BMPC (A) سلول های NB4 در عدم حضور دارو. ب) سلول های NB4 تیمار شده در غلظت IC50 بعد از ۷۲ ساعت. ب) DNA ژنومی سلول های کنترل و تیمار شده با غلظت ۷ نانومولار دارو به مدت ۷۲ ساعت استخراج شد و به کمک الکتروفورز میزان قطعه قطعه شدن DNA به عنوان شاخصی برای آپوپتوزیس بررسی شد. چاهک ۱: کنترل و چاهک ۲: سلول های تیمار شد.

بحث

لوسمی میلوئیدی حاد یک اختلال نئوپلاستیک در سلول های خونساز می باشد که در نتیجه ی اختلالات کروموزومی و جهش در سلول های پیش ساز خونی ایجاد می شود. به همین دلیل، توانایی سلول ها برای پاسخ به پیام هایی که تمایز و بلوغ را تحریک می کنند، از بین می رود. یکی از انواع لوسمی ها، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) است که در تبدیل شدن به سلول های بالغ ناتوانند (۱). شیمی درمانی بیماری های سرطانی در سال های اخیر با اهمیت فزاینده ای همراه بوده است (۱۷). تاکنون پیشرفت های قابل ملاحظه ای در بسیاری از جنبه های تحقیقاتی به چشم می خورد به طوری که افزایش دانش ما در مورد دانش بیولوژی تومور، مکانیسم عمل داروهای آنتی نئوپلاستیک را برای ما روشن تر کرده است. این موضوع همچنین

پایه ای برای طراحی منطقی تر داروهای ضد سرطان بوده است (۱۷). با توجه به فاکتور مقاومت دارویی در رده های سرطانی سلول های خونی تلاش های گسترده ای در جهت یافتن ترکیبات موثرتر که پتانسیل بیشتری برای سیتوتوکسیتی داشته باشد و قادر به غلبه بر مقاومت دارویی باشد، جریان دارد (۱۰). بسیاری از ترکیبات ضد سرطانی با ایجاد توقف در چرخه سلولی در S/G1 یا G2/M باعث القا مرگ سلول آپوپتوزیس می شوند. نقاط کنترل چرخه سلولی یکی از رفتارهایی است که سلول برای تعمیر DNA خود اتخاذ می کنند و مرگ سلولی باعث حذف سلول هایی که دچار صدمات جبران ناپذیری شده اند، می گردد. بر اساس مطالعاتی که انجام شده کرومن ها باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2/M می شوند. تجمع در فاز G2/M عمدتاً بر اثر عوامل تخریبی DNA مانند تشعشعات γ ترکیبات پایدار

کننده‌ای میکروتوبول و مهارکننده‌ی توپوایزومرازها می‌باشد (۱۸).

در سال‌های اخیر تحقیقات قابل توجهی در مورد اثر عوامل تمایز دهنده و کشنده سلول (آپوپتوتیک) در درمان لوسمی میلوئیدی و به خصوص لوسمی پرومیلوسیتی انجام شده است. یکی از این داروها، آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) است که مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). از دیگر داروهای تجویز شده برای بیماران لوسمی پرومیلوسیتیک، تری اکسید آرسنیک (arsenic-3-oxide) است که در ۸۵ درصد بیماران APL مفید بوده است. امروزه به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی، مقاومت‌های دارویی و از طرفی شناخت پروتئین‌های ادغامی و پیدا کردن نقاط اثری برای القا تمایز و آپوپتوزیس انتخابی ساخت و طراحی ترکیباتی که بتواند با اثرات جانبی کمتر تاثیرات داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایز دهنده را افزایش بدهد، مورد توجه قرار گرفته است (۲۰ و ۲۱).

در این مطالعه اثرات ضد سرطانی مشتقی از این ترکیبات (کرومن‌ها) و خواص سیتوتوکسیک آن بر روی سلول NB4 به‌عنوان مدلی برای لوسمی پرومیلوسیتی بررسی شد. رشد و توسعه تومور معمولاً در نتیجه عدم وقوع مرگ طبیعی و تنظیم شده سلولی (آپوپتوزیس) در هر یک از بافت‌های بدن می‌باشد و یا ممکن است به علت تکثیر نامنظم سلول‌ها صورت گیرد و از طرفی مشخص شده است که بعضی از عوامل سیتوتوکسیک قادر به القا آپوپتوزیس در سلول‌های توموری می‌باشند. مکانیسم اثر این ترکیبات سیتوتوکسیک، بر روی سلول متفاوت است. این تحقیق اثرات سیتوتوکسیک و القا آپوپتوزیس مشتقاتی از ترکیبات کرومن را مورد بررسی قرار داد. طبق مطالعات انجام یافته مشتقات دیگر این ترکیبات از طریق تداخل در تشکیل توبولین و یا ممانعت در پلیمرزاسیون توبولین باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های توموری می‌گردد. این ترکیبات از طریق مهار پلیمرزاسیون توبولین‌ها باعث مهار تشکیل دوک میتوزی و در نهایت منجر به توقف سیکل سلولی (arrest) می‌شوند (۱۰ و ۱۱). توقف چرخه سلولی موجب تولید سیگنال آپوپتوزیس و مرگ سلولی از طریق کاسپازها می‌شود. 3-BPMC که یکی از مشتقات خانواده کرومن‌ها است که بر روی حلقه‌ی فنیلی خود دارای اتم Br می‌باشد. اتم Br سبب تقویت و افزایش فعالیت بیولوژیک این ترکیب می‌گردد (۶). در این مطالعه مشخص شد که این ترکیب به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب مهار

رشد تا ۷۸ درصد در سلول‌های NB4 گردید. لازم به ذکر است که 3-BMPC در زمان‌های کوتاه سبب مهار تکثیر سلولی سیتواستاتیک (Cytostatic) و در زمان‌های طولانی‌تر مانند ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث القا مرگ سلولی سیتوتوکسیک (Cytotoxic) می‌شود (شکل ۱- الف و ب). سلول NB4 به عنوان مدلی برای لوسمی پرومیلوپلاستی محسوب می‌شود به طوری که غلظت و زمان بهینه‌ی 3-BMPC، ۳ نانومولار بعد از ۷۲ ساعت از تیمار می‌باشد. نتایج بدست آمده از بررسی ریخت شناسی سلول‌های NB4 تیمار شده با دارو نشان از تمایز سلول‌ها به سلول‌های مونوسیت/ ماکروفاژ می‌باشد (شکل ۳- الف و ۳- ب). تحقیقات قبلی اثرات مشتقات مختلفی از کرومن‌ها بر روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف را نشان می‌دهد اما تنها به وقوع آپوپتوزیس و اثرات مهار رشد این ترکیبات اشاره شده است (۱۶ و ۲۲). در این تحقیق علاوه بر اثرات سیتوتوکسیک این ترکیب (3-BMPC)، القا تمایز در رده سلولی خونی NB4 نیز بررسی شد. لذا این ترکیب می‌تواند علاوه بر جنبه درمانی از دیدگاه زیست شناسی به عنوان مدلی برای بررسی این نوع تمایز (مونوسیت/ماکروفاژ) استفاده شود. داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA نیز نشان داد که دارو سبب القا آپوپتوزیس در سلول‌های NB4 می‌شود. (شکل ۴- الف و ۴- ب). به طور کلی آپوپتوزیس بر اساس محرک یا القا کننده‌ی آن از مسیرهای مختلفی به وقوع می‌پیوندد. امروزه دو مسیر اصلی القا آپوپتوزیس شناسایی شده است. مسیر خارج سلولی و مسیر داخل سلولی که هر دو مسیر از طریق فعال شدن کاسپازها منجر به مرگ سلولی آپوپتوزیس می‌شوند. از آنجایی که اختلال در فرایند آپوپتوزیس یکی از نقص‌های رایج در سلول‌های سرطانی می‌باشد. القا آپوپتوزیس می‌تواند به‌عنوان یکی از استراتژی‌های مورد توجه در درمان سرطان به شمار آید. با توجه به این موضوع اثر آپوپتوزی این دارو بر سلول‌های NB4 حائز اهمیت است. مطالعات مختلفی که اثرات کرومن‌ها را بر روی سلول‌های مختلف سرطانی بررسی نموده‌اند انجام شده است، از جمله اثر این ترکیب روی سلول‌های Jurkat و HL60 نیز گزارش شده است که همگی این مطالعات به خاصیت آپوپتوزی و ضد سرطانی آن اشاره داشته‌اند (۱۰). از نقطه نظر مکانیسمی و با توجه به اطلاعات موجود یکی از شناخته شده‌ترین بر هم‌کنش 3-BMPC با میکروتوبول، بر هم‌کنش آن از طریق اتصال به توبولین (β) در محل اتصال کلشی سین یا در نزدیکی آن است. به نظر می‌رسد القا آپوپتوزیس از طریق مهار کردن

عمل کرد میکروتوبول ها از طریق تنظیم ژن های تنظیم کننده ی آپوپتوزیس مانند Bcl-2, p53 و Bcl-x می باشد. مطالعات انجام شده نشان می دهد که این ترکیبات باعث فسفوریلاسیون Bcl-2 شده و این فسفوریلاسیون باعث آغاز فعالیت کاسپاز ها می گردد (۲۳ و ۲۴).

نتیجه گیری

در خاتمه داده های حاصل از این مطالعه نشان داد که 3-BMPC، به عنوان یکی از ترکیبات خانواده کرومن ها به دلیل دارا بودن خاصیت آپوپتوزی و القاء مهار رشد از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این ترکیب بر روی رده سلولی NB4 به عنوان مدلی برای APL (لوسمی پرومیلوسیتی حاد) اثرات آپوپتوزی شدیدی از خود نشان داد به طوری که بعد از زمان ۷۲ ساعت از تیمار سلول ها با ۱۲ نانومولار از دارو، رشد سلول ها مهار و مرگ سلولی آپوپتوزیس القا شد. به طور کلی با توجه به رفتار موثر این ترکیب در القا تمایز و آپوپتوزیس به عنوان کاندیدای مناسبی برای مطالعات فارماکولوژیک آینده جهت درمان سرطان خون باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی البرز جهت تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می کنند. همچنین از دانشگاه تبریز، دانشگاه تهران و دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام بسیاری از مراحل آزمون ها، نهایت سپاسگزاری را داریم.

منابع

1. Yi Wang Zh, Chen Zh, Hu J, Shen Zhi-Xiang, et al. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacol. Ther* 1997; 76: 141-9.
2. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978; 75(5): 2458-2462.
3. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, et al. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*. 2003; 17(7): 1211-1162.
4. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003; 349(15): 1451.

5. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, et al. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. *Leuk Res.* 1999; 23(3): 263-269.
6. Koeffler HP, Bar-Eli M, Territo MC. Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res.* 1981; 41: 919-926.
7. Koeffler HP. Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood.* 1983; 62(4): 709-721.
8. Martin SJ, Bradley JG, Cotter TG. HL-60 cells induced to differentiate toward neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1990; 79(3): 448-453.
9. Kerr JF, Winterford CM and Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.
10. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 1. Structure-activity relationships of the 4-aryl group. *J Med Chem.* 2004; 47(25): 6299-310.
11. 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.
12. 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.
13. Yazdanparast R, Mahdavi M, Moosavi MA. Induction of differentiation and apoptosis in three human leukemia cell lines by a new compound from *Dendrostellera lessertii*. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2006; 38(7): 477-83.
14. Yazdanparast R, Moosavi MA, Mahdavi M, Lotfi A. Guanosine 5'-triphosphate induces differentiation-dependent apoptosis in human leukemia U937 and KG1 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27(9): 1175-84.
15. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med.* 1997; 48: 353-74.
16. Mahdavi M, Davoodi J, Zali MR, Foroumadi A. Concomitant activation of caspase-9 and down-regulation of IAP proteins as a mechanism of apoptotic death in HepG2, T47D and HCT-116 cells upon exposure to a derivative from 4-aryl-4H-chromenes family. *Biomed Pharmacother.* 2011; 65(3): 175-82.

17. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, et al. Mitochondrial gateways to cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010; 31: 1–20.
18. 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(20): 2378 – 2383.
19. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, et al. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. *Leuk Res*. 1999 ; 23(3): 263-9.
20. Mahdavi M, Yazdanparast R. Gnidilatimonoein from *Daphne mucronata* induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Arch Pharm Res*. 2007; 30(2): 177-81.
21. Yazdanparast R, Moosavi MA, Mahdavi M, Sanati MH. 3-Hydrogenkwadaphnin from *Dendrostellera lessertii* induces differentiation and apoptosis in HL-60 cells. *Planta Med*. 2005; 71(12): 1112-7.
22. Aryapour H, Mahdavi M, Mohebbi SR, Zali MR, et al. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of the Derivatives from 4-aryl-4H-chromene Family on Human Leukemia K562 Cells. *Arch Pharm Res*. 2012; 35(9): 1573-82.
23. Fan W. Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57: 1215–21.
24. 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).

Induction of Differentiation and Cell Death of the Derivative of 4-aryl-4H-Chromenes Family on NB4 Human Promyelocytic Leukemia Cell Line

Naseri MH. MD.¹, Hesami tackallou S. Ph.D.², Mahdavi M. Ph.D.^{3*}, Moosavi MA. Ph.D.³,
Abasalti S. M.Sc.³, Foroumadi A. Ph.D.⁴

1. Alborz University of Medical Sciences, Tehran, Iran & Baghiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Garmsar Islamic Azad University, Garmsar, Iran

3. Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

4. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Email corresponding author: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

Received: 30 Sep. 2012

Accepted: 1 Jan. 2013

Abstract

Aim: Chromene derivatives are able to growth inhibition and induce apoptosis in different cell types. In this study, we reported a derivative of 4-aryl-4H-chromenes with differentiation and apoptotic activity against NB4, Acute Promyelocytic Leukemia (APL) cell.

Material and Methods: The cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 cells/well and treated with 1–12 nM of the 2-amino- 4-(3-bromo 4, 5 dimethoxy – phenyl) -3- cyano -7-(dimethylamino) -4H-chromene (3-BMPC). This compound inhibited growth and viability of the cells in dose- and time-dependent manner. 3-BMPC was found to be highly active growth inhibitor with IC₅₀ of 3 nM (72 h) as determined by trypan blue exclusion test. Wright-Giemsa staining and latex particle phagocytosis assay were used to study differentiated cells. Apoptosis was also detected by fluorescent microscope and DNA fragmentation assay.

Results: Results indicated that at low concentrations (3 nM) and after 48 h of treatment, NB4 cells were differentiated to monocyte/macrophage lineage. Results of Hoechst 33258 staining also revealed that the compound induced apoptosis at respective IC₅₀ value after 72 h of treatment.

Conclusion: Regarding these results, this compound can be proposed as effective agents for more investigation in leukemia treatment.

Keywords: Acute Promyelocytic Leukemia, Apoptosis, 4-aryl-4H-chromenes, Differentiation, NB4 cell