# 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 داری خواص ضد سرطانی می‌باشند. در این کار تحقیقاتی ارزیابی اثرات سایتو توکسیک 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 ۱۰۶×۱ سلول k562 و PBMCS در ۱۰۰ میکرولیتر به همراه غلظت‌های سریالی لگاریتمی (۱/۵۶۲۵- ۲۰۰ µg) 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 به‌نحوی‌که میزان زنده‌مانی در تست MTT کاهش پیدا کرد و درصد آپوپتوز افزایش یافت که خوشبختانه مقدار IC50 این ترکیب بر روی K562 نسبت به PBMCS 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 سیتوتوکسیک 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، ص۱۹۸- ۱۸۸، خرداد ۱۳۹۹**

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

Email: alirezafarshchi67@yahoo.com

### مقدمه

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 سیتوتوکسیک 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 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 ارگانیسم‌های چند سلولی می‌گردد و سبب کنترل رشد و ثابت نگاه‌داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌شود (۴).

تمام روش‌های درمانی ازجمله جراحی، قطع اندام، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی دارای عوارض زیادی ازجمله 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

[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



[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

استفاده می‌شود که اغلب عوارض استعمال این داروها بیشتر از خاصیت درمانی آن‌ها می‌باشد به‌نحوی‌که 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 د لیل 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 ۱×۱۰۶ 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 و۱۰۰ µg استرپتومایسین (BIOCERA) تحت شرایط استاندارد و استریل کشت‌شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 15 میلی‌لیتر خون هپارینه (۲۰۰U/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 K562و PBMC به روش MTT:

ابتدا رقت سازی از ترکیب پیریمیدینی و همچنین داروی شاهد دوکسوروبیسین به‌صورت سریالی با بافر فسفات استریل در غلظت‌های (µg 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 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 هرروز، 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 15 دقیقه میکروپلیت در طول‌موج 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 g 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 g 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 پوروپیدیوم 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



[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

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

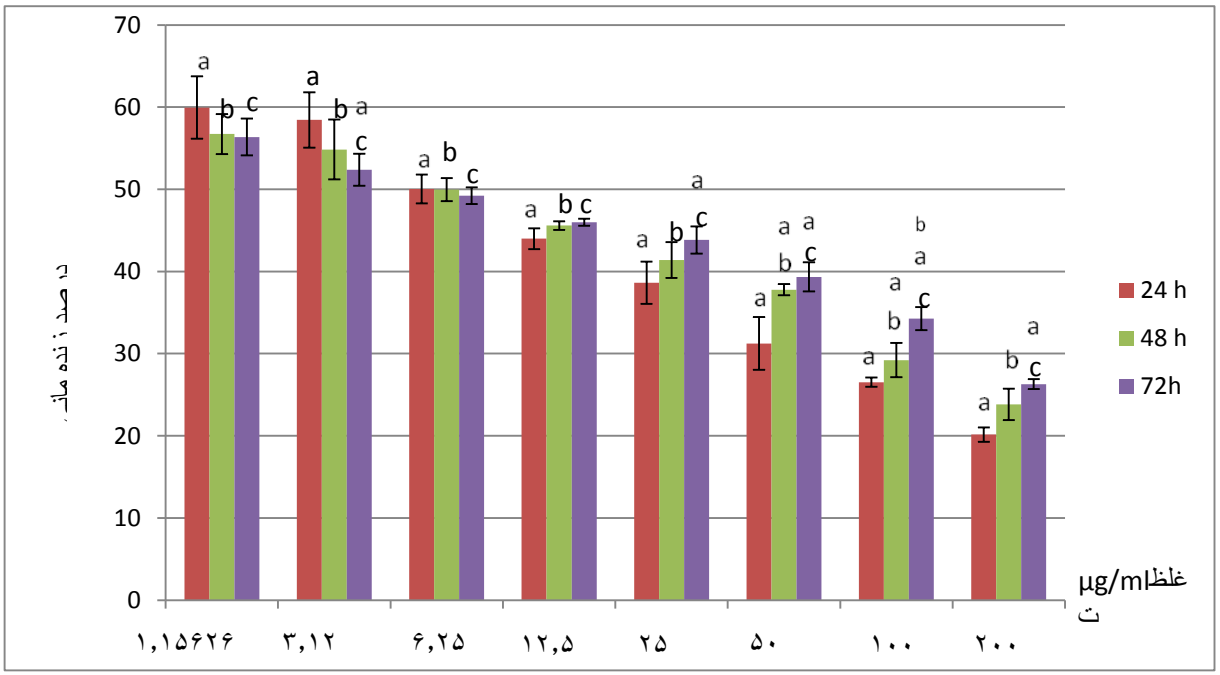
**تحلیل آماری:**

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 به‌صورت P<.05 در نظر گرفته شد. برای محاسبه IC50 از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده و نمودارهای ستونی به‌وسیله Excel2007 ترسیم شد

## یافته‌ها

**نتایج اثرات غلظت‌های سریالی تهیه‌شده از ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی سلول‌های K562 به‌وسیله 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 ایجادشده توسط دستگاه الایزا نگار قابل‌سنجش است. در ابتدا اثر غلظت‌های مختلف هر تیمار روی سلول‌های K562 و PBMC به‌صورت درصد زنده‌مانی بر نمودار نقطه‌ی رسم شده و منحنی آن کشیده شد تا رگرسیون داده‌شده نمایانگر دقت نتیجه‌ی کار باشد (۱۱). سپس درصد زنده‌مانی گروه‌های مختلف بر روی نمودارهای ستونی در کنار هم آورده شده‌اند و با رسم اِرور بار شرایط مقایسه‌ی آن‌ها را فراهم کرده است. بعد از محاسبه‌ی IC50 ، به تفکیک زمان، هرکدام را به همراه انحراف معیار در جدولی آمده است. و در انتها دوباره از نمودار ستونی و اِروربار برای مقایسه‌ی IC50 گروه‌های مختلف استفاده شده است. شاخص انتخابی یا SI: Selectivity Index عبارت است از IC50 of PBMC / IC50 of K562 به‌وسیله‌ی این شاخص مقایسه‌ی اختلاف اثر تیمار بر سلول‌های K562 و PBMC بهتر قابل‌بررسی 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.




**نمودار (۱)**: نتایج اثرات مهاری ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی رده سلولی k562

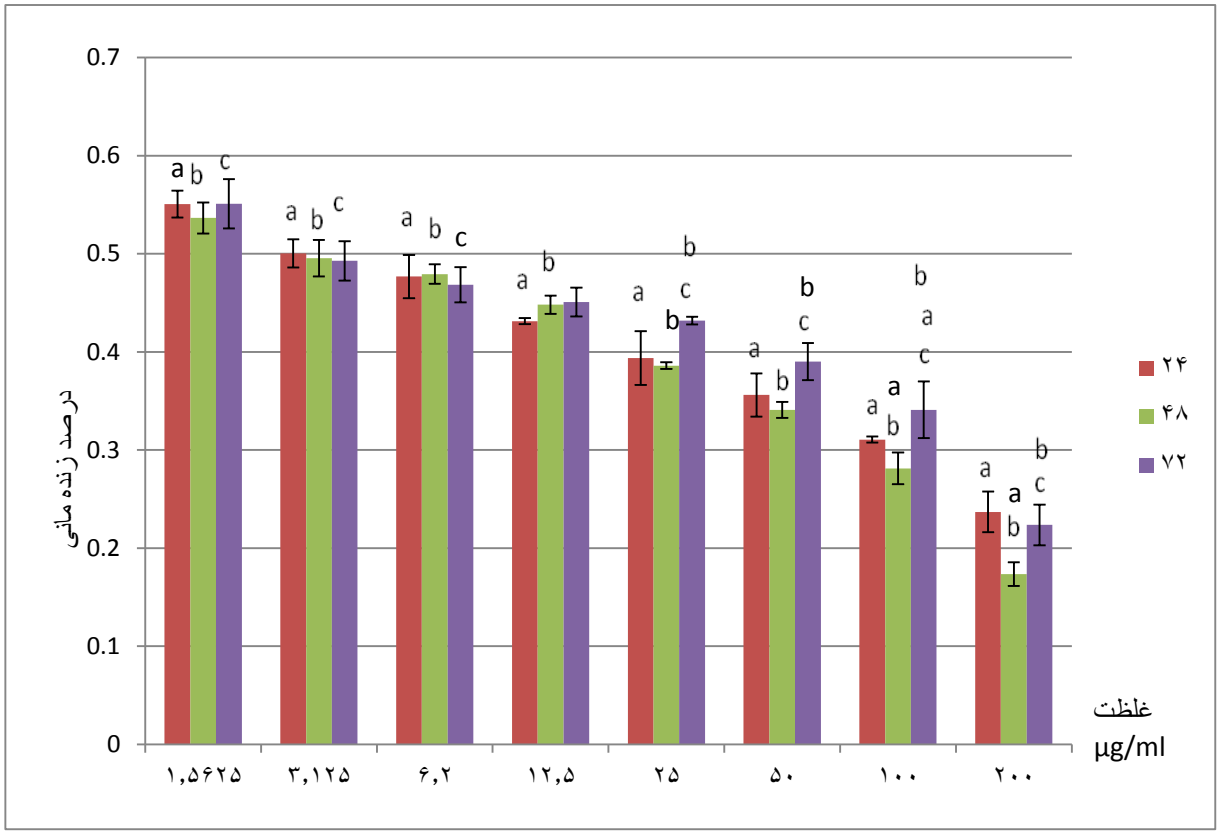


[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

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

همان‌طور که در شکل نشان داده شده است ترکیب مورد آزمایش بر روی رده سلولیK562 دارای اثرات سمی بوده و سبب کاهش زنده‌مانی آن‌ها در هر سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار می‌شوند (نمودارهای-۳-۱).

این ترکیب دارای اثرات سمی وابسته به غلظت بر روی سلول‌ها 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):** نتایج اثرات مهاری غلظت‌های سریالی ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر رشد و زنده‌مانی سلول‌های PBMC

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

همان‌طور که در شکل نشان داده شده است ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی رده سلولیPBMC دارای اثرات سمی بوده و سبب کاهش زنده‌مانی آن‌ها در هر سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار می‌شوند (نمودارهای ۳-۲). با توجه به نتایج ارائه‌شده در شکل ترکیب مورد آزمایش دارای اثرات سمی وابسته به غلظت بر روی سلول‌های PBMCمی‌باشند 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

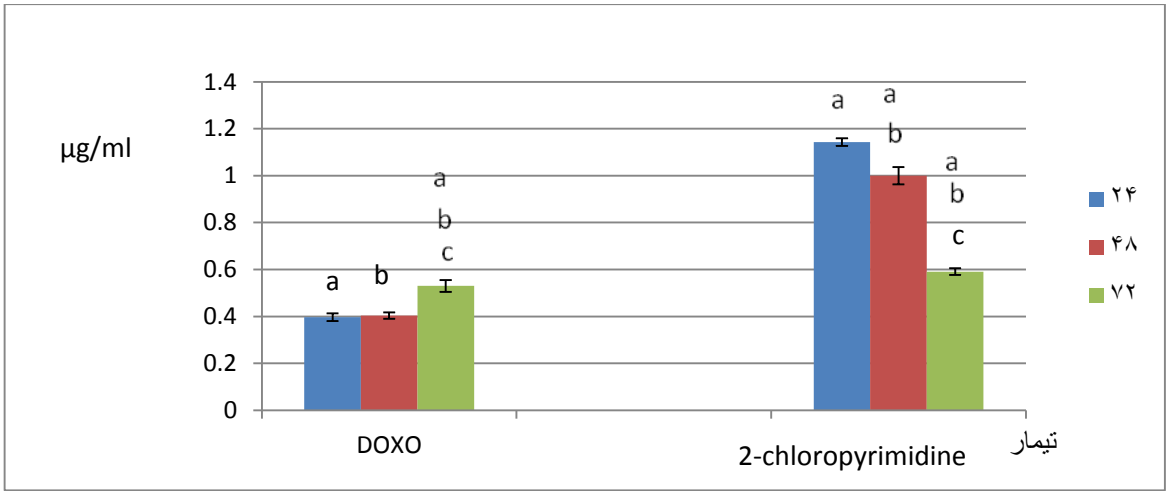


[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

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

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

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 PBMCو K562 می‌توان مشاهده کرد که اثرات مخرب داروی دوکسوروبیسین بر روی این سلول‌ها بسیار کم‌تر از اثرات مخرب مشتق مورد آزمایش (ترکیب ۲-کلروپیریمیدین) اما خواص سایتوتوکسیسیتی 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.

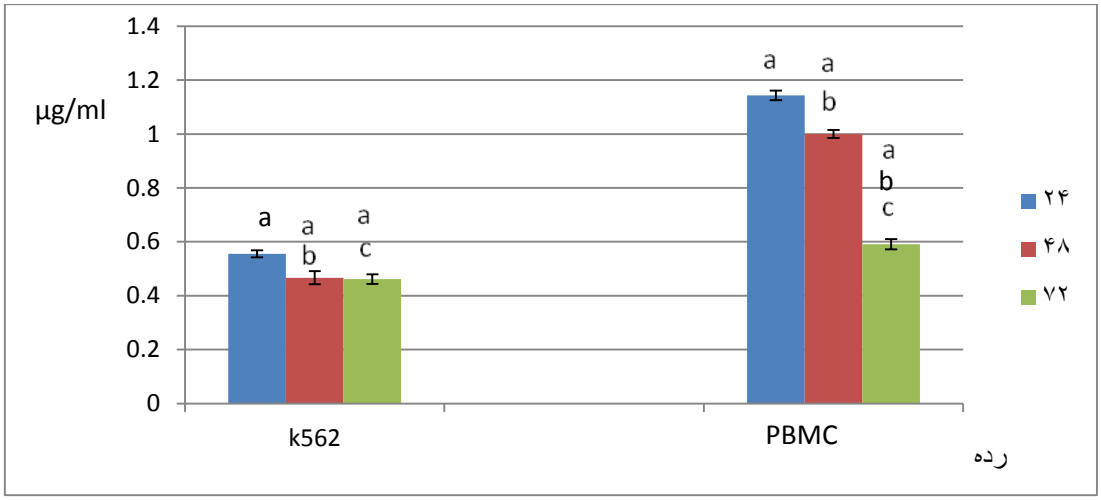



**نمودار (۳):** مقایسه‌ی IC50 تیمارهای مختلف بر سلول‌های PBMC در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار

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 سایتوتوکسیسیتی داروی دوکسوروبیسین در زمان ۷۲ ساعت کمی سیر صعودی داشتند برخلاف ترکیب مورد آزمایش (ترکیب ۲-کلروپیریمیدین) که با افزایش زمان خواصیت سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌های PBMC سیر نزولی داشتند. 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 و داروی دوکسوروبیسین وابسته به زمان بودند.

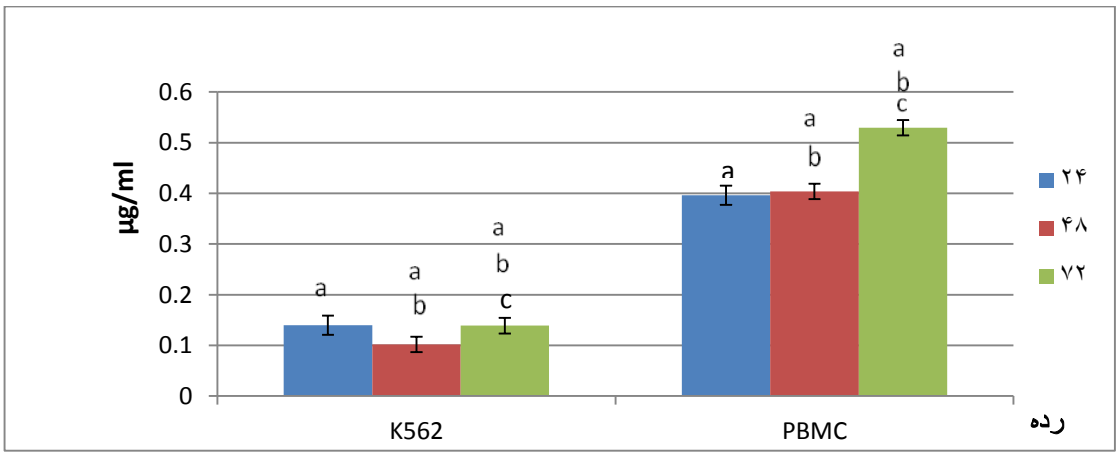


[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]




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

نمودار فوق بیانگر مقایسه اثرات سایتوتوکسیک ترکیب ۲-کلروپیریمیدین بر روی سلول‌های PBMC و k562 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 افزایش زمان اثر سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌های K562 و PBMC سیر نزولی داشتند. 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.

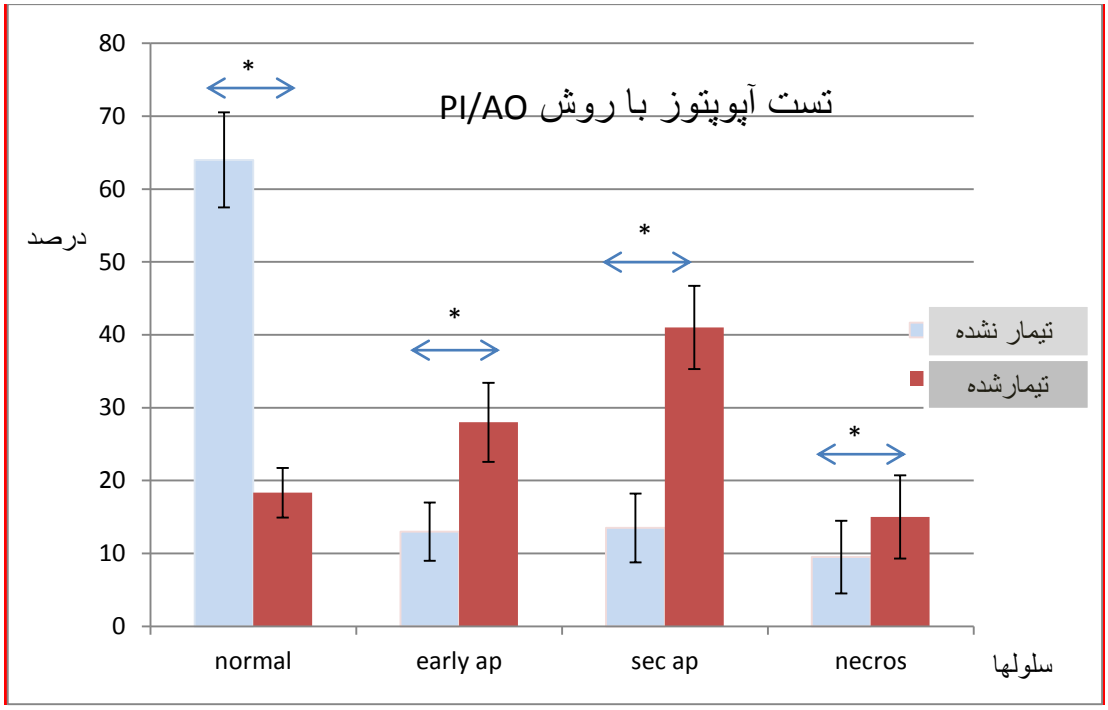



**نمودار (۵):** مقایسه‌ی IC50 تیمار دوکسوروبیسین بر سلول‌های K562 و PBMC در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار

نمودار فوق بیانگر مقایسه اثرات سایتوتوکسیک داروی دوکسوروبیسین بر روی سلول‌های PBMC و k562 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 از عملکرد انتخابی مطلوب این دارو است.. همچنین اثرات سایتوتوکسیسیتی این دارو نیز وابسته به زمان بود. گروه‌های ستون‌های (a,b,c,d,e) با حروف هم نام، اختلاف معنی‌داری داشتند (P<.05).

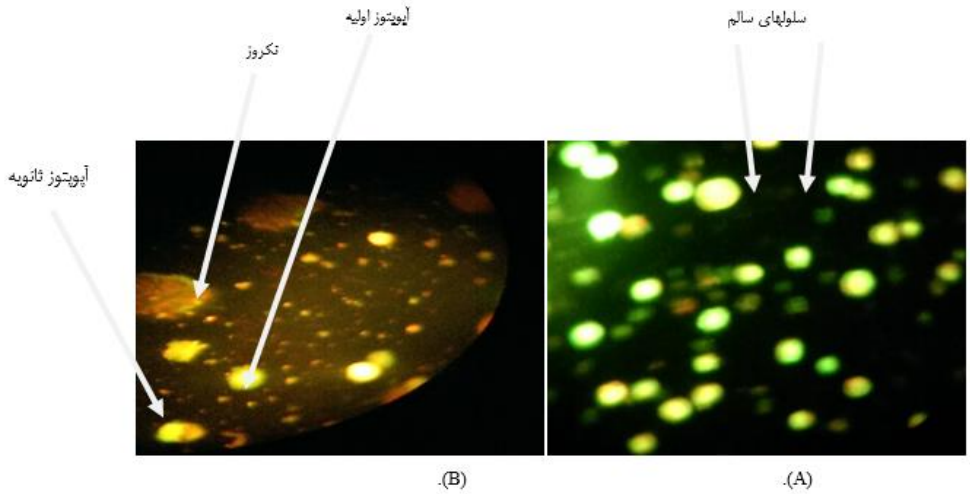


[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]




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

نمودار حاکی از اختلافات معنی‌دار در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های تیمار نشده را نمایش می‌دهد علامت (×) نشان دهنده سطح معنی‌داری ($P<.05$) می‌باشد. با توجه به نمودار آپوپتوز ثانیویه در سلول‌های تیمار شده بالاترین درصد را به خود اختصاص داده‌اند که می‌تواند گواهی بر سوق سلول‌های توموری تیمار شده به سمت آپوپتوز اولیه و به دنبال آن آپوپتوز ثانیه باشد. و باتوجه 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.




**شکل (۱):** سلول‌های K562سالم (کنترل) قبل از تیمار کردن-(A). سلول‌های K562آپوپتوز شده در اثر مجاورت با ترکیب ۲-کلروپیریمیدین با غلظت IC50 پس از ۴۸ ساعت مجاورت -(B).



[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

**بحث و نتیجه‌گیری**

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 مهاری 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 مهاری 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 نیجه رشد سلول‌های توموری می‌شود به همین علت در سلول‌های توموری که رشد بالایی دارند مانند رده‌های سارکوما، لیمفوما و لوسمی ها استفاده می‌شوند (۱۵). مقایسه عملکرد مهاری 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 مهاری 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 از 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 وPBMC 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 قادراند به رده‌های مختلف خونی شامل رده اریتروئیدی، مونوسیت ماکروفاژی و رده مگاکاروسیتی تمایز پیدا کنند .بعنوان مثال Hemine تمایز اریتروئیدی (۱۷) ۱۲ تتراکانویل فوریل ۱۳-استات (TPA) تمایز منوسیتی (۱۸) فوربول دی بوتیرات و فوربول ۱۲- میریستات ۱۳ – استات تمایز مگاکاریوسیت را در رده‌ی 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. اتیدیوم 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- کلروپریمیدین می‌باشد. این داده‌ها نشان داد که سلول‌های تیمارشده 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



[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

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 تیمارشده (در غلظت IC50) پس از زمان ۴۸ ساعت می‌توان گفت که ترکیب مورد آزمایش (۲-کلروپریمیدین) در این کار تحقیقاتی می‌توانند باعث تمایز سلول‌های K562 به سمت مرگ برنامه ریزی 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 دلیرژ، سرکار خانم هانیه قربانی، سرکار خانم سامیه قربانی، سرکار خانم روشنا غفاری ومسئولین محترم بیمارستان محک تهران و تمام عزیزانی که مرا در این کار یاری کردند.

## 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.

[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

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 Immunother1986;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.

[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]

Original Article

# THE EFFECT OF 2-CHLOROPYRIMIDINE ON K562 CELL LINE

*Alireza hajabbas farshchi [*1], Nahideh afzal ahangaran[2], Amir valikhani[3], Saeideh ghorbani[4]*

***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 ($1\times10^6$ cells/100 µl/well) were incubated for different time periods (24, 48, and 72 h) with a serial logarithmic dilution of analogue (1.5625-200µg/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*

[ Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29 ]