

مهار رشد و القاء آپوتوز در رده سلولی K562 لوسمی میلوئید انسان تحت تأثیر مشتقاتی از خانواده دی هیدروپیرانو[*c*]کرومن

سینا پژمان^۱؛ مجید مهدوی^{۱*}؛ سعید بلالایی^۲

چکیده

زمینه: اخیراً اثرات ضد سرطانی ترکیبات خانواده کرومن در چندین رده سلولی گزارش شده است. در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات ضدسرطانی مشتقاتی از خانواده دی هیدروپیرانو کرومن بر رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: پس از کشت 10^5 سلول K562 در ظروف ۹۶ تایی، تحت تأثیر مشتقات دی هیدروپیرانو کرومن در غلظت‌های ۲۶۰-۸۰ میکرومولار و فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفت. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو به منظور بررسی رشد و زیستایی در سلول‌های K562 استفاده شد. برای بررسی نوع مرگ سلولی از میکروسکوپ فلورسنت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.

یافته‌ها: مشتقات دی هیدروپیرانو کرومن باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های K562 گردید، به طوری که میزان IC₅₀ پس از ۴۸ ساعت برای ترکیبات 4-PC، 4-CNC و 4-HC به ترتیب ۲۴۰، ۱۸۰ و ۱۶۰ میکرومولار بود. ترکیبات 4-CNC و 4-HC دارای گروه‌های الکترون کشنده CN و OH بر روی حلقه فنیل موقعیت C4 قدرت مهار رشدی بیشتری نسبت به ترکیب مرجع 4-PC داشتند. همچنین داده‌های به دست آمده از مشاهدات میکروسکوپ نوری و آزمون قطعه قطعه شدن DNA و میکروسکوپ فلورسنت نشان‌دهنده وقوع آپوتوز در سلول‌های K562 پس از ۷۲ ساعت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات مهار رشدی و آپوتوزی دی هیدروپیرانو کرومن‌ها بر سلول‌های K562، این ترکیبات می‌توانند به عنوان کاندیدای خوبی برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان خون مورد بررسی قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: آپوتوز، دی هیدروپیرانو کرومن، لوسمی میلوئید مزمن، K562

«دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱۲»

۱. گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز

۲. گروه شیمی آلی، دانشکده علوم دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی، تهران

* عهده دار مکاتبات: تبریز، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، گروه زیست‌شناسی جانوری، تلفن: ۰۹۱۲۵۱۴۲۲۴۱

Email: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و نقص در فرایند آپوتوز می‌گردد (۳). تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به شیمی‌درمانی، درمان با اینترفرون آلفا، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد (۴). به طور کلی، داروهایی که در شیمی‌درمانی به کار می‌روند منجر به القاء آپوتوز و مهار رشد می‌شوند (۵) اما اثرات جانبی این داروها و مقاومتی که سلول‌های سرطانی

لوسمی میلوئید مزمن (CML: Chronic Myeloid Leukemia) به دلیل یک جابجایی دوطرفه بین ژن *abl* بروی کروموزوم ۹ و ژن *bcr* بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چندتوان ایجاد می‌شود (۱ و ۲). این جابجایی کروموزومی باعث به وجود آمدن ژن هیبرید *Bcr-Abl* می‌شود که پروتئین $p210^{Bcr-Abl}$ را کد می‌کند و فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین باعث

همراه است (۱۰). علاوه بر این، کرومن‌های دارای استخلاف عملکردی، نقش روزافزونی در راه‌های سنتزی ترکیبات نویدبخش در زمینه‌های شیمی‌دارویی و فارماکولوژی دارند، به طوری که مشاهده شده که با جانشینی گروه‌های ویژه بر روی کربن‌های حلقه‌های کرومن، ترکیباتی با اثرات خاص و قوی حاصل می‌شوند (۱۱ و ۱۲).

دی‌هیدروپیرانو[c]کرومن‌ها و مشتقات آن‌ها به دلیل داشتن طیف وسیعی از خواص زیستی از جمله فعالیت اسپاسم، دیورتیک، ضد فشارخون، ضد سرطان و ضد آنافیلاکسی اهمیت دارند (۱۳-۱۵). علاوه بر این آن‌ها می‌توانند بعنوان افزایش‌دهنده‌های روانشناختی برای درمان بیماری‌های تحلیل سلول‌های عصبی شامل بیماری الزایمر، اسکروز آمیوتروفیک جانبی، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون، جنون مرتبط با ایدز و سندرم داون و همچنین برای درمان اسکیزوفرنی و میوکلونوس به کار روند (۱۶).

این مطالعه برای اولین بار اثر مهار رشدی و آپوپتوزی مشتقاتی از ترکیبات دی‌هیدروپیرانو کرومن را که در آزمایشگاه دکتر سعید بلالایی دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی سنتز شده‌اند (۱۷) بر روی رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی سرطان خون CML مورد بررسی قرار می‌دهد.

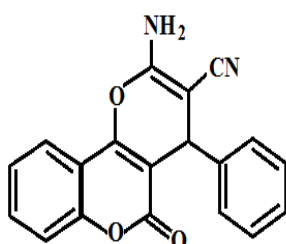
نام شیمیایی هر یک از مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومن سنتز شده عبارتند از:

نسبت به آن‌ها نشان می‌دهند، از مشکلات و موانع مهم در شیمی درمانی به‌شمار می‌روند. در حال حاضر داروهای که در درمان لوسمی به‌کار گرفته می‌شوند، عمدتاً به دلیل ایجاد مقاومت به دارو، اثر خود را از دست می‌دهند. به‌عنوان مثال ایماتینیب مسیلات (Imatinib Mesylate) یا STI571 که امروزه جهت درمان CML به‌کار می‌رود، به‌طور اختصاصی منجر به مهار Bcr-Abl می‌گردد، اما کاربرد این دارو سبب بروز اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی می‌شود (۶). این موارد، اشاره به این دارد که هیچ‌یک از روش‌های درمانی فعلی منجر به درمان قطعی CML نگردیده است. لذا تلاش در جهت به‌کارگیری داروهایی با پتانسیل تومورکشی بالا و اثرات جانبی کم‌تر ادامه دارد. در این میان مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومن (dihydropyrano[c]chromene) می‌تواند حائز اهمیت باشد. کرومن‌ها خانواده‌ای از ترکیبات هتروسیکلیک بوده که حاصل جوش خوردن حلقه بنزن با حلقه پیران هستند و حدواسط‌های تعدادی از محصولات طبیعی و عوامل دارویی می‌باشند (۷). چارچوب ساختاری اولیه آن‌ها به‌عنوان یک ویژگی مشترک در الکلوئیدها، توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌های طبیعی و نیز در تعدادی از تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها در چای، میوه، سبزیجات، شراب قرمز و غیره یافت می‌شوند (۸). کرومن‌ها همچنین در بسیاری از موجودات دریایی از قبیل کیسه‌داران، ماهی، اسفنج، نیام‌داران و جلبک‌های بزرگ با ویژگی‌های فعال زیستی وجود دارند (۹). اغلب حضور ساختار بر پایه کرومن در یک مولکول با توانایی آن برای جلوگیری از بیماری

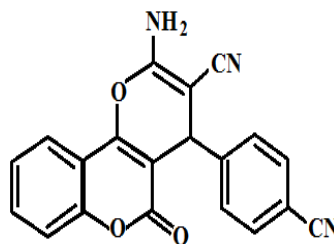
2-amino-4-phenyl-5-oxo-4H,5H-pyrano-[3,2-c]chromene-3-carbonitrile (4-PC)

2-amino-4-(4-cyanophenyl)-5-oxo-4H,5H-pyrano-[3,2-c]chromene-3-carbonitrile (4-CNC)

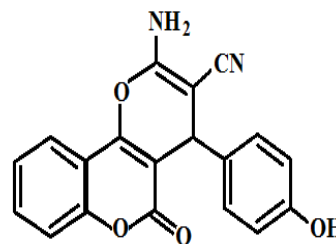
2-amino-4-(4-hydroxyphenyl)-5-oxo-4H,5H-pyrano-[3,2-c]chromene-3-carbonitrile (4-HC)



4-PC



4-CNC



4-HC

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و تهیه غلظت‌های مختلف دارو: به‌منظور تهیه غلظت‌های مختلف ترکیبات 4-PC (۲- آمینو- ۴- فنیل- ۵- اکسو- H ۴، H۵ - پیرانو- (۳، ۲-c) کرومن- ۳- کربونیتریل)، 4-CNC (۲- آمینو- ۴- (۴-سیانو فنیل)- ۵- اکسو- H ۴، H۵ - پیرانو- (۳، ۲-c) کرومن- ۳- کربونیتریل) و 4-HC (۲- آمینو- ۴- (۴-هیدروکسی فنیل)- ۵- اکسو- H ۴، H۵ - پیرانو- (۳، ۲-c) کرومن- ۳- کربونیتریل)، پودر خشک این مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومن در حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) (سیناژن، تهران) حل شده و استوک اولیه ترکیبات با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه شد و سپس غلظت‌های مختلف از آن‌ها تهیه گردید.

کشت سلول: رده سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 (بیوسرا، انگلستان) غنی‌شده با سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum) (بیوسرا، انگلستان) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) (سیناژن، تهران) در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد. سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک‌بار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند.

بررسی رشد و زیستایی سلولی: به‌منظور بررسی اثر مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومن بر رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر استفاده گردید. برای این منظور تعداد ۱۰^۵ سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، غلظت‌های مختلف از این ترکیبات به هر چاهک برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه شد. در هر بازه زمانی، تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (سیگما، آمریکا) مورد شمارش قرار گرفت (۱۸). این آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه به‌طور مستقل انجام شد.

مطالعه ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومن: به‌منظور بررسی اثرات مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومنی بر ظاهر سلول‌های K562، تعداد ۱۰^۵ سلول در ظروف ۲۴ چاهکی کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومنی برای فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومنی با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (المپیوس، ژاپن) در قیاس با نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای انجام این آزمایش، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۱۰^۵) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (شرکت سیگما-آلمان) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید (۱۸).

آزمون قطعه قطعه شدن DNA: برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین‌منظور سلول‌های تیمار شده با مشتقات دی‌هیدرو پیرانو کرومنی با ۲۰ میکرولیتر بافر لیزکننده شامل اتیلن دی‌آمین تتراسدیک اسید (EDTA) ۱۰۰ میلی‌مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۰/۸ درصد وزنی-حجمی و بافر تریس-اسیدکلریدریک ۲۰ میلی‌مولار با pH=۸ (شرکت مرک-آلمان) لیز و سپس ۱۰ میکرولیتر RNase A/T1 و پروتئیناز K (شرکت فرمنتاس-آلمان) هر کدام به‌طور جداگانه افزوده شد و در ۵۰ درجه سانتیگراد برای حداقل ۹۰ دقیقه قرار گرفت. پس از افزودن ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ۶X (۳۰ درصد گلیسرول و ۲۵ درصد برومو فنول بلو)، هر یک از نمونه‌های موجود در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصدی بارگذاری شد. با انجام الکتروفورز، قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۹ و ۲۰).

رشد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۹، ۵۶/۴ و ۷۱ درصد بود. میانگین میزان رشد سلول‌های تیمار شده با $220\mu\text{M}$ ترکیب 4-CNC در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳۵/۲، ۶۵ و ۸۰ درصد کاهش یافت. ترکیب 4-HC پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار در غلظت $200\mu\text{M}$ ، رشد سلول‌ها را به ترتیب ۳۵، ۶۳/۵ و ۸۹/۵ درصد کاهش داد. غلظت مهارکنندگی به میزان ۵۰ درصد (IC_{50}) ترکیبات 4-PC، 4-CNC و 4-HC برای رده سلولی K562 پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۴۰، ۱۸۰ و $160\mu\text{M}$ میکرومولار می‌باشد (شکل ۱).

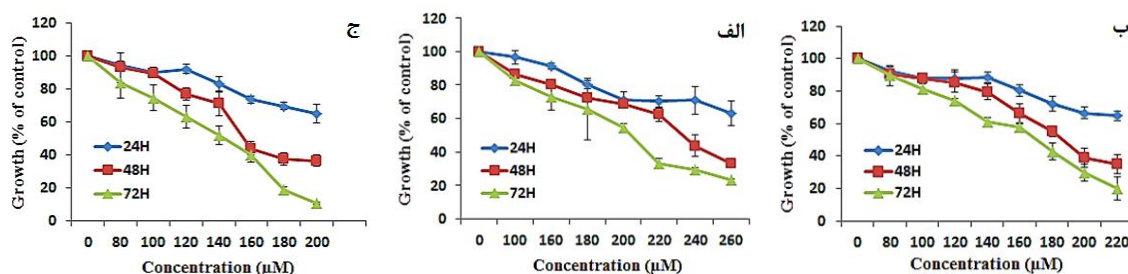
نتایج به دست آمده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو نشان می‌دهند که ترکیبات دی‌هیدروپیرانو کرومینی علاوه بر مهار رشد سلول‌های K562، سبب کاهش زیستایی و القاء مرگ سلولی به صورت وابسته به زمان و غلظت در این سلول‌ها می‌شوند. تمامی مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومینی مورد آزمایش پس از ۲۴ ساعت، تغییر چندان و معناداری در زیستایی و مرگ سلولی سلول‌های تحت تیمار با این ترکیبات ایجاد نکردند. ولی پس از تیمار سلول‌ها در زمان‌های بالاتر از ۲۴ ساعت (۴۸ و ۷۲ ساعت) زیستایی به صورت چشمگیری کاهش یافت. به عنوان مثال پس از ۷۲ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۶۰-۱۰۰ میکرومولار ترکیب 4-PC، ۲۲۰-۸۰ میکرومولار ترکیب

برای به دست آوردن درصد تقریبی مرگ آپتوزی سلول‌های تیمار شده با ترکیبات دی‌هیدروپیرانو کرومینی، سلول‌هایی که در مرحله اولیه و ثانویه آپتوز بودند با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت شمارش گردید و درصد تقریبی آپتوز سلول‌ها به دست آمد (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی داده‌های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و Exel 2010 و آزمون student t-test انجام شد و داده‌های با ارزش $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار تلقی شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون دفع رنگ تریپان بلو نشان داد که ترکیبات دی‌هیدروپیرانو کرومینی سبب کاهش رشد سلولی یا مهار رشد سلولی وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های K562 می‌شوند. ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۶۰-۱۰۰ میکرومولار (μM) ترکیب 4-PC، ۲۲۰-۸۰ میکرومولار ترکیب 4-CNC و ۲۰۰-۸۰ میکرومولار ترکیب 4-HC، درصد رشد سلول‌ها به ترتیب به میزان ۷۷-۱۷، ۸۰-۱۰/۴ و ۸۹/۵-۱۶/۵ درصد کاهش یافت (شکل ۱). این ترکیبات نیز سبب مهار رشد وابسته به زمان در سلول‌های K562 شدند. به طوری که مثلاً در غلظت ۲۴۰ میکرومولار ترکیب 4-PC، میزان مهار

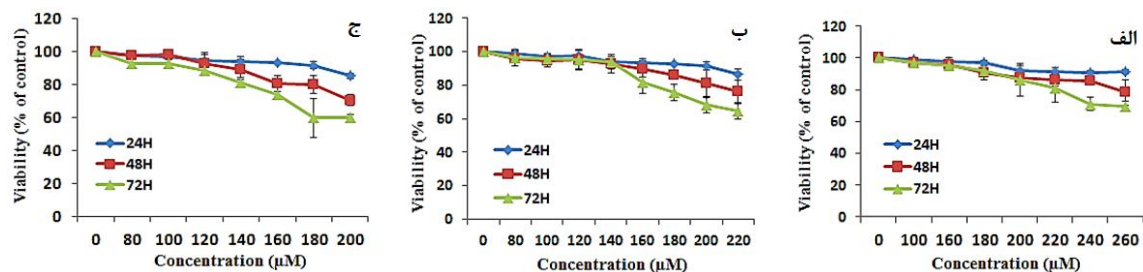


شکل ۱- اثرات مشتقات دی‌هیدروپیرانو کرومینی بر رشد سلول‌های K562. سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف ترکیبات دی‌هیدروپیرانو کرومینی (الف: 4-PC، ب: 4-CNC و ج: 4-HC) و زمان‌های متفاوت تیمار شد و اثرات آن‌ها بر رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و شمارش سلولی مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می‌باشد ($P < 0.05$).

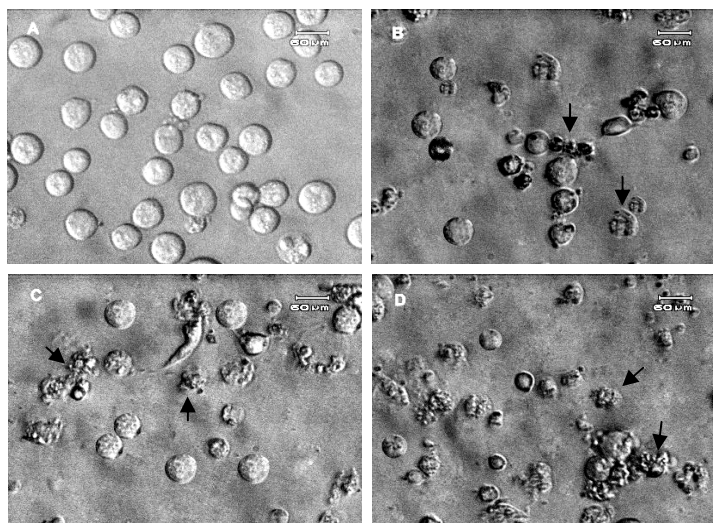
زیستایی سلول‌ها را به ترتیب ۸/۵، ۲۰ و ۴۰/۵ درصد کاهش داد (شکل ۲).

بررسی‌های انجام‌شده با میکروسکوپ نوری نشان‌دهنده تغییرات ظاهری قابل‌ملاحظه در سلول‌های K562 تیمار شده با ترکیبات دی‌هیدروپیرانوکرومی مورد مطالعه وابسته به غلظت و زمان می‌باشد. در ۴۸ و ۷۲ ساعت سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های IC_{50} ترکیبات و بالاتر نسبت به سلول‌های کنترل کوچک و چروکیده شده و اجسام آپوپتوزی و سلول‌های مرده قابل تشخیص است (شکل ۳).

4-CNC و ۲۰۰-۸۰ میکرومولار ترکیب 4-HC زیستایی نسبت به کنترل به ترتیب ۳۰/۷-۳/۱، ۳۵/۵-۳/۵ و ۴۰-۷/۵ درصد کاهش یافت. در غلظت $260 \mu M$ ترکیب 4-PC پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش زیستایی نسبت به کنترل به ترتیب ۸/۴، ۲۱/۷ و ۳۰/۷ درصد بود. همچنین میزان زیستایی سلول‌های K562 در غلظت $200 \mu M$ ترکیب 4-CNC در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸/۳، ۱۹ و ۳۱/۵ درصد کاهش یافت. همانند دو ترکیب قبل، ترکیب 4-HC در غلظت ۱۸۰ میکرومولار پس از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



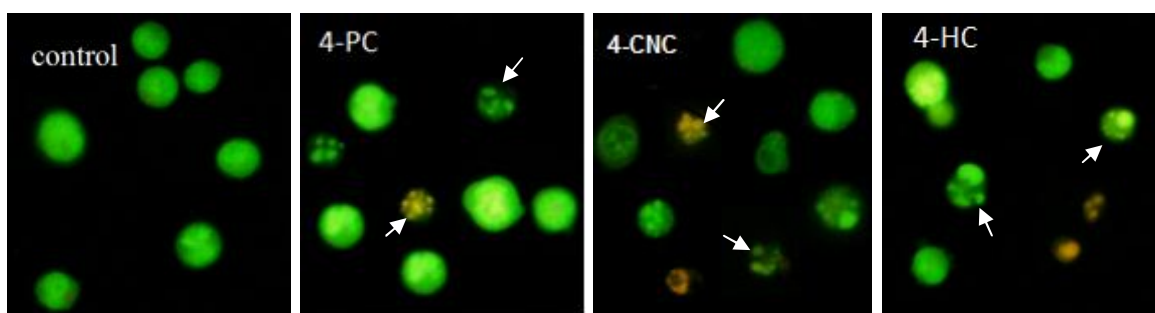
شکل ۲- اثرات مشتقات دی‌هیدروپیرانوکرومی بر زیستایی سلول‌های K562. سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف ترکیبات دی‌هیدروپیرانوکرومی (الف: 4-PC، ب: 4-CNC، ج: 4-HC) و زمان‌های متفاوت تیمار شد و اثرات آن‌ها بر زیستایی سلول‌ها با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و شمارش سلولی مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر ارایه‌شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می‌باشد ($P < 0.05$).



شکل ۳- تغییرات ظاهری سلول‌های K562 تیمار شده با مشتقات دی‌هیدروپیرانوکرومی پس از گذشت ۷۲ ساعت. A: سلول‌های کنترل، B: سلول‌های تیمار شده با $240 \mu M$ ترکیب 4-PC، C: سلول‌های تیمار شده با $180 \mu M$ ترکیب 4-CNC و D: سلول‌های تیمار شده با $160 \mu M$ ترکیب 4-HC. چروکیدگی غشاء و تشکیل اجسام آپوپتوزی با پیکان‌های سیاه نمایش داده شده‌اند (بزرگنمایی $40\times$).

به منظور اثبات بیشتر مرگ سلولی آپتوزی از آزمون قطعه قطعه شدن DNA توسط الکتروفورز ژل آگاروز استفاده شد. بر اساس نتایج، ترکیبات دی هیدروپیرانوکرومنی باعث تغییر در الگوی ژنومی سلول‌های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل (تیمار نشده) گردید (شکل ۵). به طوری که مشاهده می‌شود DNA ژنومی سلول‌های K562 تیمار شده به صورت لکه یا اسمیر بر روی ژل الکتروفورز دیده

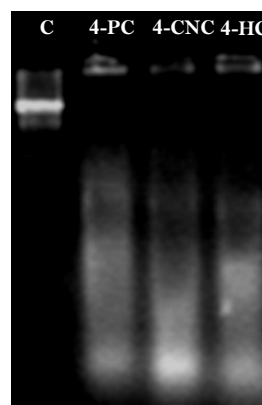
همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ آکریدین اورنج (Ao/Et) مشخص شد که در میان سلول‌های تیمار شده با ترکیبات دی هیدروپیرانوکرومنی پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌های با کروماتین سبز یا نارنجی درخشان بسیار فشرده و یا قطعه قطعه دیده می‌شوند که نشان‌دهنده مرگ سلولی از نوع آپتوز می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562 جهت بررسی وقوع آپتوز. پس از تیمار سلول‌ها با مشتقات دی هیدروپیرانوکرومنی به مدت ۷۲ ساعت خصوصیات ظاهری آپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفته است. (الف): تصویر فلورسنت سلول‌های تیمار نشده (کنترل). (ب): تصویر فلورسنت سلول‌های تیمار شده با $240 \mu\text{M}$ ترکیب 4-PC. (ج): تصویر فلورسنت سلول‌های تیمار شده با $180 \mu\text{M}$ ترکیب 4-CNC. (د): تصویر فلورسنت سلول‌های تیمار شده با $160 \mu\text{M}$ ترکیب 4-HC. وجود سلول‌های سبز یا نارنجی با هسته متراکم (پیکان‌های سفید) حاکی از وقوع آپتوز می‌باشد.

می‌شود در حالی که این حالت در سلول‌های کنترل مشاهده نمی‌گردد. بنابراین این آزمون در کنار داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنت نشان‌دهنده آن است که مشتقات دی هیدروپیرانوکرومنی از طریق مرگ سلولی آپتوز سبب القاء مرگ در سلول‌های K562 می‌شوند.

بر اساس نتایج، درصد تقریبی آپتوز القاء شده به وسیله ترکیبات 4-PC، 4-CNC و 4-HC پس از ۷۲ ساعت در سلول‌های K562 به ترتیب $24/6$ ، $21/4$ و $23/6$ می‌باشد که ارتباط نزدیکی با میزان زیستایی (یا کاهش میزان زیستایی) سلول‌های تیمار شده با این ترکیبات دارد که می‌تواند تأیید کننده نوع مرگ سلولی آپتوزی باشد (جدول ۱).



شکل ۵- اثرات مشتقات دی هیدروپیرانوکرومنی بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562. سلول‌های K562 با ترکیبات دی هیدروپیرانوکرومنی 4-PC، 4-CNC و 4-HC در غلظت‌های 240 ، 180 و $160 \mu\text{M}$ میکرومولار تیمار شدند و اثرات آپتوزی آن‌ها پس از ۷۲ ساعت به وسیله قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز بررسی گردید.

متوکسی، نیترو و فلور (F) بر روی حلقه فنیل، فعالیت را افزایش می‌دهد (۲۳). فعالیت سلول‌کشی و SAR مشتقات بنزو پیرانو [۲-۳] کرومن ۶ و ۷ دی آن بر روی رده‌های سلولی سرطان انسانی HeLa, Raji, Ls180 و Mef-7 بررسی شده است. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور گروه متوکسی (CH_3O) بالاترین فعالیت سیتوتوکسیک را به این ترکیبات اعطا می‌کند و کم‌ترین فعالیت برای ترکیبات با گروه متیل (CH_3) مشاهده می‌شود (۲۴). داده‌های به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد که ۴۸ ساعت پس از تیمار با ترکیبات دی‌هیدرو پیرانو کرومنی 4-PC، 4-CNC و 4-HC میزان IC_{50} به ترتیب ۲۴۰، ۱۸۰ و ۱۶۰ میکرومولار بوده و این ترکیبات سبب مهار رشد و کاهش زیستایی رده سلولی K562 می‌شوند. از آنجایی که مشتقات دارای گروه‌های سیانو و هیدروکسی (OH) به ترتیب در ترکیبات 4-CNC و 4-HC نسبت به ترکیب مرجع یعنی 4-PC دارای IC_{50} کم‌تری می‌باشند، چنین به نظر می‌آید که وجود گروه‌های الکترون کشنده مانند CN و OH بر روی حلقه فنیل موقعیت C4 سبب افزایش فعالیت می‌شود به طوری که فعالیت مهار رشدی این ترکیبات به صورت $\text{HC} > 4\text{-CNC} > 4\text{-PC}$ می‌باشد. همچنین با توجه به روند آزمایش، ترکیباتی که دارای حلالیت بیشتر بودند قدرت اثر بیشتری داشتند. بنابراین احتمالاً قدرت الکترون کشندگی و حلالیت با وجود گروه‌های مختلف ویژگی‌های مولکولی ترکیبات دی‌هیدرو پیرانو کرومنی است که می‌تواند با فعالیت این ترکیبات در ارتباط باشد. تاکنون اثرات مهار رشدی مشتقات گوناگون خانواده کرومن در رده‌های مختلف سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال فعالیت مهار رشدی و سلول‌کشی مشتقاتی از ۲-آمینو-۴-آریل-۳-سیانو-۷-(دی متیل آمینو)- H^4 -کرومن‌ها بر روی چندین رده سلولی سرطانی ارزیابی شد (۲۵). در آزمایشی که توسط Hawas و همکارانش انجام شد نیز فعالیت ضدسرطانی و مهار رشدی برخی از مشتقات کربونیتریلی تتراهیدروکرومن بر روی ۶۰ رده سلولی

جدول ۱- مقایسه میزان مرگ آپوپتوزی و زیستایی سلول‌های K562 تیمار شده با مشتقات دی‌هیدرو پیرانو کرومنی در ۷۲ ساعت. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می‌باشد ($P < 0.05$).

Compound	IC_{50} (μM)	Viability (%)	Apoptosis (%)
4-PC	۲۴۰	$71 \pm 4/2$	$24/6 \pm 1/3$
4-CNC	۱۸۰	$75/5 \pm 5$	$21/4 \pm 5/4$
4-HC	۱۶۰	$73/5 \pm 2/12$	$23/6 \pm 4/24$

بحث

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیبات سنتزی دی‌هیدرو پیرانو کرومنی بر روی رده سلولی K562 لوسمی میلوئید مزمن انجام شد. این ماده دارای خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی است و به عنوان مدلی مناسب برای فاز بلاست CML و مقاوم به دارو محسوب می‌شود (۲۱). دی‌هیدرو پیرانو کرومن‌ها رده‌ای از ترکیبات هتروسیکلیکی مهم‌اند که برای فعالیت ضدتوموری و ضد مهار رشدی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برای مثال برخی از مشتقات ۹-هیدروکسی (فنیل) متیل-۲ و ۲ دی متیل ۲، ۳، ۸، ۹-تتراهیدرو $\text{H}^4, \text{H}^{10}$ -پیرانو [۲-۳] کرومن-۴ و ۱۰ دی آن توسط عزیزاده و همکارانش بر علیه سرطان سینه T47D مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که این ترکیبات دارای فعالیت سلول‌کشی و مهار رشدی می‌باشند. علاوه بر آن مطالعه رابطه ساختار-فعالیت (SAR) مشخص کرد که جانشینی گروه‌های سیانو (CN)، نیترو (NO_2)، کلر (Cl) و متوکسی (CH_3O) بر روی حلقه فنیل این ترکیبات، فعالیت آن‌ها را بیشتر کرده و IC_{50} آن‌ها در رنج کم‌تری بر روی این سلول‌ها اعمال می‌شود (۲۲). در آزمایشی مشتقات ۳-فنیل- H^2 و H^5 -پیرانو [3,2-c] کرومن-۲- آن سنتز و اثرات ضد رشدی آن‌ها بر روی رده‌های سرطانی، بررسی و SAR آن‌ها مطالعه شد. از مطالعات SAR آن‌ها چنین بر می‌آید که وجود گروه‌های الکترون کشنده

مؤثری جایگاه کولشی سین در توبولین را اشغال می‌کنند. ۴-آریل-H۴-کرومن‌ها پلی مریزاسیون توبولین را مهار می‌کنند که ممکن است مکانیسم اصلی عمل این سری از مهارکننده‌های آپوپتوز باشد. فعالیت برخی از این ترکیبات در سلول‌های مقاوم به عوامل آنتی‌میتوتیک تاکسان و وینکا‌الکالوئید حفظ می‌شود. بنابراین می‌توانند برای درمان سرطان‌های مقاوم به دارو مفید باشند. علاوه بر این، تشکیل لوله‌های مویرگی، سلول اندوتلیال را مختل می‌کنند که می‌توانند برای به‌کارگیری در هدف‌گیری عروق توموری مشابه با CA-4P و ZD-6126 محتمل باشند (۲۷). کرومن جداشده از جلبک قهوه‌ای با نام Sargachromanol (SE)، اثر مهار رشدی برجسته‌ای روی رده سلولی HL-60 لوسمی میلوئید انسان وابسته به دژ (غلظت) به‌وسیله‌القاء آپوپتوز با مشاهده اجسام آپوپتوزی، قطعه قطعه شدن DNA و تجمع DNA در قبل از فاز G_1 ($sub-G_1$) چرخه سلولی نشان می‌دهد. SE همچنین آپوپتوز را همراه با کاهش بیان Bcl-xl، افزایش بیان Bax، فعال‌سازی کاسپاز ۳ و برش PARP القاء می‌کند (۹).

از آن‌جایی که اختلال در فرایند آپوپتوز عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به‌شمار می‌رود و سلول‌های سرطانی به‌علل مختلف نسبت به آپوپتوز مقاومت نشان می‌دهند، لذا اثر مشتقات دی‌هیدروپیرانوکرومی در القاء آپوپتوز می‌تواند حائز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که تمام ترکیبات دی‌هیدروپیرانوکرومی مورد مطالعه سبب کاهش رشد و زیستایی و القاء آپوپتوز در رده سلولی K562 به‌صورت وابسته به غلظت و زمان می‌شوند. همچنین مشخص گردید که جایگزینی گروه‌های مختلف بر روی حلقه بنزن در موقعیت ۴ دی‌هیدروپیرانوکرومن‌ها، فعالیت ضد سرطانی آن‌ها را تغییر می‌دهد. باتوجه به اثرات ضد سرطانی دی‌هیدروپیرانوکرومن‌ها، به‌نظر می‌رسد این

سرطان‌های انسان نظیر لوسمی (K562 HL-60)، ملانوما، ریه، کولون، کلیه، مغز، تخمدان، سینه و پروستات در شرایط *in vitro* بررسی گردید و مشخص شد که برخی از این ترکیبات به‌عنوان ترکیبات قوی ضد سرطانی عمل می‌کنند (۲۶).

داده‌های به‌دست‌آمده از مشاهدات میکروسکوپ نوری و فلورسنت و نیز آزمون قطعه قطعه شدن DNA در مطالعه حاضر نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده با ترکیبات دی‌هیدروپیرانوکرومی می‌باشد. این داده‌ها نشان داد که سلول‌های تیمار شده با این ترکیبات، به همراه هسته خود چروکیده شده و با قطعه قطعه شدن DNA درون هسته، اجسام آپتوزی شکل می‌گیرند که تأییدکننده رخداد آپتوز در سلول‌ها است. در مقایسه با سلول‌های سالم، سلول‌های آپتوزی اولیه (early apoptosis) به شکل ذرات روشن سبز رنگ در هسته چروکیده شده و سلول‌های آپتوزی ثانویه (late apoptosis) به شکل اجسام آپتوزی نارنجی رنگ دیده می‌شوند. با توجه به این موارد و نتایج حاصل از مشاهده تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز و نیز آزمون قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 تیمار شده با مشتقات دی‌هیدروپیرانوکرومی (در غلظت IC_{50} پس از زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌توان گفت این ترکیبات سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شوند.

مشتقات زیادی از خانواده کرومن‌ها آپوپتوز را در بسیاری از رده‌های سلولی سرطان‌های انسان القاء می‌کنند. در آزمایشی که به‌وسیله Kemnitzer و همکارانش صورت گرفت، ترکیب ۲-آمینو-۳-سیانو-۷- (دی متیل آمینو)-۴-(۳-متوکسی-۵-۴-متیل اندیوکسی فیل)-H۴-کرومن عضوی از خانواده ۴-آریل-H۴-کرومن‌ها به‌عنوان یک القاء‌کننده قوی آپوپتوز شناسایی شد که قطعه قطعه شدن هسته، برش PARP، همچنین توقف چرخه سلول در مرحله G_2/M و آپوپتوز را در رده‌های سلولی T47D و Jurkat القاء می‌کند. به‌طور ساختاری این ترکیب مهارکننده توبولین بود و به‌طور

ترکیبات به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای مطالعات بیشتر
 در درمان سرطان خون باشند.
تشکر و قدردانی
 حمایت مالی این مطالعه از محل طرح پژوهشی و
 ابراز نمایندگی پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت
 گرفته و نویسندگان بر خود لازم می‌انند بدین وسیله مراتب
 تشکر خود را از جناب آقای دکتر رستمی و دیگر همکاران

References

- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-56.
- O'Dwyer M. Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. *The Oncologist*. 2002;7:34-8.
- Rosca A, Arion C, Colita A, Nedelcu L, Scirneacu C, Andreescu O, et al. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. *Bulletin of the Trasilvania University of Brasov*. 2009;2(51):97-104.
- Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. 2002;21(56):8652-67.
- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, 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. 3 structure-activity relationships of fused rings at the 7, 8-positions. *J Med Chem*. 2007;50(12):2858-64.
- Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Witte ON. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. *Blood*. 2003;101(10):4088-97.
- Ellis GP. Chromenes, chromanones, and chromones. 1st ed. New York: John Wiley & Sons. 1977; 29-43.
- Doodeman R, Rutjes FPJT, Hiemstra H. Synthesis of 2-substituted chromenes via vring-closing metathesis and stable 1-benzopyrylium ions. *Tetrahedron Letters*. 2000;41(31):5979-83.
- Heo SJ, Kim KN, Yoon WJ, Chulhong O, Young-Ung C, Abu A, et al. Chromene induces apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Food and Chem Toxic*. 2011;49:1998-2004.
- O'Kennedy R, Themes RD. Coumarins: Biology, Applications and Mode of action. 1st ed. Dublin: J. Wiley & Sons. 1997;11-27.
- Sun W, Cama LD, Birzin ET, Warriar S, Locco L, Mosley L, et al. 6H benzo[c]chromen-6-one derivatives as selective ERb agonists. *Bioorg. Med Chem Lett*. 2006;16:1468-72.
- Garino C, Bihel F, Pietrancosta N, Laras Y, Quelever G, Woo I, et al. New 2-bromomethyl-8-substituted-benzo[c]chromen-6-ones. Synthesis and biological properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(1):135-8.
- Andreani LL, Lapi E. On some new esters of coumarin-3-carboxylic acid with balsamic and bronchodilator action. *Bull Chim Farm*. 1960;99:583-6.
- Bonsignore L, Loy G, Secci D, Calignano A. Synthesis and pharmacological activity of 2-oxo-(2H) 1-benzopyran-3-carboxamide derivatives. *Eur J Med Chem*. 1993;28:517-20.
- Witte EC, Neubert P, Roesch A. 7-(Piperazinylpropoxy)-2H-1-benzo-pyran-2-ones. *Ger Offen DE Chem Abstr*. 1986;104:224915.
- Ghorbani-Vaghei R, Toghraei-Semiromi Z, Karimi-Nami R. One-Pot Synthesis of 4H-Chromene and Dihydropyrano[3,2-c]chromene Derivatives in Hydroalcoholic Media. *J Braz Chem Soc*. 2011;22(5):905-9.
- Abdolmohammadi S, Balalaie S. Novel and Efficient Catalysts for the One-Pot Synthesis of 3, 4-Dihydropyrano [c]chromene Derivatives in Aqueous Media. *Tetrahedron Letters*. 2007;48:3299-303.
- Mahdavi M, Yazdanparast R. Gnidilatimonoein from *Daphne mucronata* induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Arch Pharm Res*. 2007;30(2):177-81.
- 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.
- Kotamraju S, Hogg N, Joseph J, Keefer LK, Kalyanaraman B. Inhibition of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cells by nitric oxide. Peroxyl radical scavenging as an antiapoptotic mechanism. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17316-23.
- Hait WN, Choudhury S, Srimatkandada S, Murren JR. Sensitivity of K562 human chronic Myelogenous Leukemia blast cells transfected with a human multidrug resistance C dna to cytotoxic drugs and differentiating agents. *J Clin Invest*. 1993;91:2207-15.
- Alizadeh BH, Vosooghi M, Khoobi M, Javidnia A, Foroumadi A, Panah F, et al. Synthesis and cytotoxic activity of novel 9-[Hydroxy(Substitutedphenyl) Methyl]-2,2-Dimethyl-2,3,8,9-Tetrahydro-4H,10H-Pyrano [2,3-f]Chromene-4,10-Diones. *Iran J Chem Eng*. 2010;29:189-96.

23. Kovacicova L, Gasparova R, Bohac A, Durana M, Lacova M. Synthesis of 3-phenyl-2H,5H-pyrano[3,2-c]chromen-2-one derivatives and their antineoplastic activity. ARKIVOC. 2010;9(11):188-203.
24. Shafiee A, Motamedi R, Firuzi O, Meili S, Mehdipour AR, Miri R. Synthesis and cytotoxic activity of novel benzopyrano [3,2-c]chromene-6,8 dione derivatives. Med Chem Res. 2011;20:466-74.
25. Vosooghi M, Rajabalian S, Sorkhi M, Badinloo M, Nakhjiri M, Negahbani AS, et al. Synthesis and cytotoxic activity of some 2-amino-4-aryl-3-cyano-7-(dimethylamino)-4H-chromenes. Research in Pharmaceutical Sciences. 2010;5(1):9-14.
26. Hawas US, Al-Omar MA, Amr EA, Hammam AEF. Anticancer activity of some new synthesized tetrahydroquinoline and tetrahydrochromene carbonitrile derivatives. American Journal of Applied Sciences. 2011;8(10):945-52.
27. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Wang Y, Zhao J, 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;47:6299-310.