مجـلـه‌ی علمـی، پژوهـشی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۷۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، صفحات ۲۳ تا ۳۵

بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی و آپوپتوتیک ۱و۳- دی آمینو پروپان وانادیوم (استیل استات) ۳- متوکسی بر رده‌ی سلولی k562

مریم فخرایی[۱]، دکتر وحید نجاتی[۲]، دکتر نوروز دلیرژ[۳]

نویسنده‌ی مسئول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده‌ی علوم، گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی maryamfakhrayi@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۱۰/۱۴ پذیرش: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *ترکیبات فلزات سنگین مانند وانادیوم، نیکل و کبالت می‌توانند در درمان برخی بیماری‌ها مفید باشند. گزارشات متعددی مبنی بر اثرات زیستی ترکیبات وانادیوم از قبیل اثرات شبه‌انسولینی و ضد فشارخون وجود دارد. همچنین مطالعات متعددی دررابطه با اثرات ضد سرطانی ترکیبات وانادیوم بر روی رده‌های مختلف سلولی شده است. هدف از این مطالعه ارزیابی نقش نوعی ترکیب شیف باز اکسو وانادیوم ۱و۳- دی آمینو پروپان وانادیوم (استیل استات) ۳- متوکسی در ممانعت از تقسیمات سلولی و القای آپوپتوز بر روی رده‌ی سلولی K۵۶۲ بود.*

روش بررسی: *با استفاده از روش رنگ سنجی (MTT Assay) مشاهده شد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌های K۵۶۲ وابسته به غلظت ترکیب وانادیوم مورد استفاده است، یعنی با افزایش غلظت این ترکیب تا ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط in vitro اثرات غیرسیتوتوکسیسیتی مشاهده شد. برای بررسی اینکه این ترکیب دارای اثرات ضدتوموری است، مطالعات بیشتری انجام شد. براساس اطلاعات حاصل از MTT غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰و۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیب وانادیوم مورد نظر انتخاب و به مدت ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت انکوبه گردید. نتایج حاصل از این یافته‌ها نشان داد که ترکیب وانادیوم در غلظت‌های غیرسیتوتوکسیسیتی دارای اثرات القای آپوپتوز و توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G_0/G_1 می‌باشد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از آپوپتوز به وسیله‌ی فلوسایتومتری نشان دهنده‌ی القای آپوپتوز وابسته به غلظت و مدت زمان ترکیب وانادیوم مورد نظر در غلظت‌های غیرسیتوتوکسیسیتی بود. بیشترین درصد آپوپتوز ۳۷/۹۶ درصد در ۴۸ ساعت انکوباسیون و در معرض ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این ترکیب رخ داد. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی چرخه‌ی سلولی حاکی از توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G_0/G_1 بود.*

نتیجه‌گیری: *شیف –باز وانادیوم سنتزی مورد مطالعه دارای اثرات ممانعت از تقسیمات سلولی و القای آپوپتوز بر روی رده‌ی سلولی K۵۶۲ می‌باشد. بدین‌ترتیب به نظر می‌رسد که ترکیب یاد شده می‌تواند به عنوان کاندیدایی جهت یافتن داروهای ضد سرطانی جدید مورد توجه قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: *وانادیوم، K۵۶۲، روش رنگ‌سنجی، چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز، فلوسایتومتری*

مقدمه

از جمله چالش‌های موجود در درمان سرطان ،غالب شدن جمعیت سلول‌های سرطانی مقاوم به ترکیبات شیمی درمانی متداول در توده‌ی سلول‌های سرطانی می‌باشد. بنابراین یافتن ترکیبات دارویی جدید جهت افزودن به پرتوکول‌های درمان

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشگاه ارومیه
۲- دکترای تخصصی بافت شناسی، استادیار دانشگاه ارومیه
۳- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استادیار دانشگاه ارومیه

ترکیبی سرطان لازم به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر توجه زیادی به یافتن ترکیبات ضد سرطانی جدید حاوی یون‌های فلزی شده است (۱). اولین ترکیبات فلزی مورد استفاده در شیمی دارویی ترکیباتی از آهن بوده است. پذیرش کمپلکس‌های فلزی به عنوان دارو با به کارگیری کمپلکس‌هایی از پلاتین از قبیل سیس پلاتین توسعه یافت (۳و۲). البته طیف فعالیت ضد توموری و کارآمدی ترکیب یاد شده محدود می‌باشد (۱).

شیف بازها ترکیبات ماکروسیکلی هستند که توسط واکنش‌های تراکمی تشکیل می‌شوند. شیف بازهایی که مورد مطالعه قرار می‌گیرند عموماً لیگاندهای چهار دندانه‌ای (حاوی ۲ اتم نیتروژن و ۲ اتم اکسیژن) و در مواقعی ۵ دندانه می‌باشند. حداقل ۲ اتم از اتم‌های کئوردینه شده در این لیگاندها اتم‌های نیتروژن هستند، اتم‌های کئوردینه دیگر می‌توانند نیتروژن، اکسیژن، گوگرد و یا ترکیبی از هر سه باشند (۴). سالن‌ها از واکنش سالیسیل آلدهید با استخلاف‌های گوناگون بر روی حلقه‌ی بنزن و دی آمین مورد نظر تهیه می‌شوند (۵) وجود استخلاف‌ها بر روی لیگاند ویژگی‌های الکترونی و حلالیت کمپلکس‌های سالن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴). کمپلکس‌های فلزی عمدتاً با اتصال عامل سیتوتوکسیک به یون فلزی به طور مؤثری دارو را به محل عمل حمل می‌نمایند. کمپلکس‌هایی با لیگاند سالن حاوی منگنز، کبالت و مس تهیه شده‌اند که اتصال این کمپلکس‌ها به DNA و شکسته شدن DNA توسط این کمپلکس‌ها به اثبات رسیده است (۶). در این مطالعه اثر کمپلکسی با لیگاند وانادیوم بر روی رده‌ی سلولی k562 مورد مطالعه قرار گرفت. این رده‌ی سلولی جدا شده از نوعی سرطان خون به نام CML می‌باشد. بیشتر مبتلایان به این سرطان دچار جهش یا تغییر ژنتیکی موسوم به کروموزوم فیلادلفیا هستند. در این کروموزوم قسمتی از کروموزوم ۹ وقسمتی از کروموزوم ۲۲ شکسته شده و با یکدیگر جابه جا می‌شوند هنگامی که قسمت جدا شده‌ی کروموزوم ۹ به کروموزوم ۲۲ متصل می‌شود ژن bcr-abl تشکیل می‌شود، که کروموزوم ۲۲ تغییر یافته را در این حالت کروموزوم فیلادلفیا می‌نامند (۷). ترکیبات فلز کمیاب وانادیوم به صورت گسترده‌ای در سطح زمین توزیع شده است (۸). این ترکیبات به عنوان مواد ریز مغذی برای گونه‌هایی از جانوران مطرح شده است (۱۰و۹)؛ هرچند که نقش این عنصر به‌عنوان یک ترکیب ضروری در انسان به اثبات نرسیده است (۱۲و۱۱). گزارشات متعددی مبنی بر اثرات زیستی ترکیبات وانادیوم از قبیل اثرات شبه انسولینی و ضد فشار خون وجود دارد (۱۲). اخیرا توجه زیادی به اثرات ضد سرطانی ترکیبات وانادیوم شده است (۱۱). اولین بار اثرات ضد سرطانی وانادیوم در مطالعه‌ای بر روی سرطان پستان القا شده در رت در سال ۱۹۸۴ مورد آزمایش قرار گرفت (۱۳). به نحو جالب توجهی سرطان القا شده در رت با تغذیه‌ی روزانه رژیم غذایی حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر، سولفات وانادیوم مورد پیشگیری قرار گرفته است (۱۴). مطالعات بعدی اثربخشی ترکیبات وانادیوم را بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسان از قبیل سرطان کبد (۱۵)، سرطان سینه (۱۷و۱۶)، لوسمی (۱۸) کلیه (۱۹)، تخمدان (۲۰) بیضه (۲۱) و سلول‌های اپیتلیال (۲۲) نشان دادند. کمپلکس‌های مختلف وانادیوم دارای اثرات ضد سرطانی بیشتری در شرایط In vitro و In vivo نسبت به نمک‌های چهار و پنج ظرفیتی آن دارند (۲۳). هدف داروهای شیمی درمانی جلوگیری از تکثیر بی‌رویه‌ی سلول‌ها در بافت‌های مشخصی از اندام‌های بدن می‌باشد. همچنین اکثر این ترکیبات منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌شوند (۲۴). بنابراین ما در مطالعه‌ی حاضر که به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیب جدید شیف باز اکسو وانادیوم " ۱و۳- دی آمینو پروپان وانادیوم (استیل استات) ۳- متوکسی"، اقدام به بررسی اثرات ممانعت از تقسیم سلولی و القای آپوپتوز ترکیب یاد شده، نمودیم.

روش بررسی

این مطالعه به صورت یک بررسی تجربی در پژوهشکده‌ی زیست و فناوری ارومیه انجام گرفت. مطالعه‌ی مزبور به مدت ۱۰ ماه از آذر ماه ۱۳۸۸ لغایت مهر ۱۳۸۹ به طول انجامید.

الف) ترکیب شیف باز اکسو وانادیوم مورد مطالعه " ۱و۳- دی آمینو پروپان وانادیوم (استیل استات) ۳- متوکسی ($C_{19}H_{20}N_2O_5V$)" می باشد که در بخش شیمی دانشگاه سمنان سنتز شده بود (شکل ۱).

ب) مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل PBS, DMSO, RPMI : FBS, RNase, MTT, از شرکت سیگما خریداری شد، همچنین برای تست آپوپتوزیس از کیت Annexin-V-PI که از شرکت GIBCO(USA) خریداری شد، استفاده گردید. الکل اتانل ۷۰ درصد مورد استفاده نیز از شرکت MERK خریداری شد، همچنین PI مورد استفاده در تعیین چرخه‌ی سلولی در مطالعه با فلوسایتومتری به صورت کیت از شرکت (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.) خریداری شد و دستگاه فلوسایتومتری مورد استفاده ساخت شرکت Partec آلمان بود.

ج) رده‌ی سلولی و کشت سلول: رده‌ی سلولی مطالعه شده k ۵۶۲ (Human Leukemia Cell Line) بود، که از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت ۱۶۴۰- RPMI دارای ۱۰درصد سرم جنینی گاوی (FBS) و انسولین ۰/۱ درصد واحد بر میلی‌لیتر و L - گلوتامین ۰/۳ گرم، سدیم پیروات ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آنتی‌بیوتیک‌ها شامل ۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO۲ ۵ درصد کشت و پاساژ داده می‌شوند. شمارش سلولی با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵ درصد بود.

د) ارزیابی سیتوتوکسیسیته‌ی سلولی شیف باز وانادیوم مورد مطالعه:به منظور سنجش اثر سایتوتوکسیسیته سلولی این شیف- باز از روش MTT Assay استفاده شد.این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول بنا شده است (۲۵). ابتدا در پلیت ۹۶ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۵۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل ریخته شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های لگاریتمی ترکیب شیف- باز مورد مطالعه حل شده در DMSO (غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۰/۱ درصد بود) به چاهک‌ها اضافه گشت. بدین ترتیب رقت نهایی در چاهک‌ها بین ۲۵ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم شد. هر رقت در سه چاهک از پلیت سنجش گردید و برای هر رقت سه بار تکرار در نظر گرفته شد. همچنین سه چاهک شامل سلول و محیط کشت کامل به صورت کنترل در نظر گرفته شد. و در سه چاهک از داروی -کنترل مثبت داگسوروبیسین برای مقایسه با شیف – باز مورد نظر استفاده شد. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و اتمسفر ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. پس از پایان زمان‌های انکوباسیون مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به چاهک‌ها اضافه کرده و پس از ۴ ساعت انکوباسیون کریستال‌های رنگ فورمازان ایجاد شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک حل شد. شدت رنگ توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر ثبت گردید. برای کنترل‌ها از محیط کشت فاقد سلول به عنوان بلانک دستگاه الایزا ریدر و از محیط کشت همراه سلول بدون دارو به عنوان کنترل سلول زنده استفاده شد. IC_{50} (غلظتی از دارو است که ۵۰ درصد رشد سلول را نسبت به کنترل کاهش می‌دهد) از طریق رگرسیون غیرخطی

منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت مشتقات محاسبه شد.

هـ) بررسی آپوپتوز ناشی از شیف - باز وانادیوم به وسیله‌ی کیت Annexin- PI: ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی معادل ۵×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۶ خانه‌ای ریخته، مقدار ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به‌همراه ۱۰ درصد FBS به چاهک‌ها اضافه گردید. در ادامه‌ی ترکیب شیف – باز وانادیوم مورد مطالعه با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه گشت. سلول‌ها در سه زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون ابتدا کف پلیت‌های ۶ خانه را با ۲ میلی‌لیتر PBS شستشو داده، با ۲۰۰۰rpm/min سانتریفیوژ شد. مایع روی نمونه‌ها دور ریخته شد و سپس به مقدار ۱۰ میکرولیتر Annexin اضافه کرده، به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شد. پس از گذشت این زمان مقدار ۱ میلی‌لیتر PBS به نمونه‌ها اضافه و به سرعت نمونه‌ها را به وسیله‌ی دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی گردید.

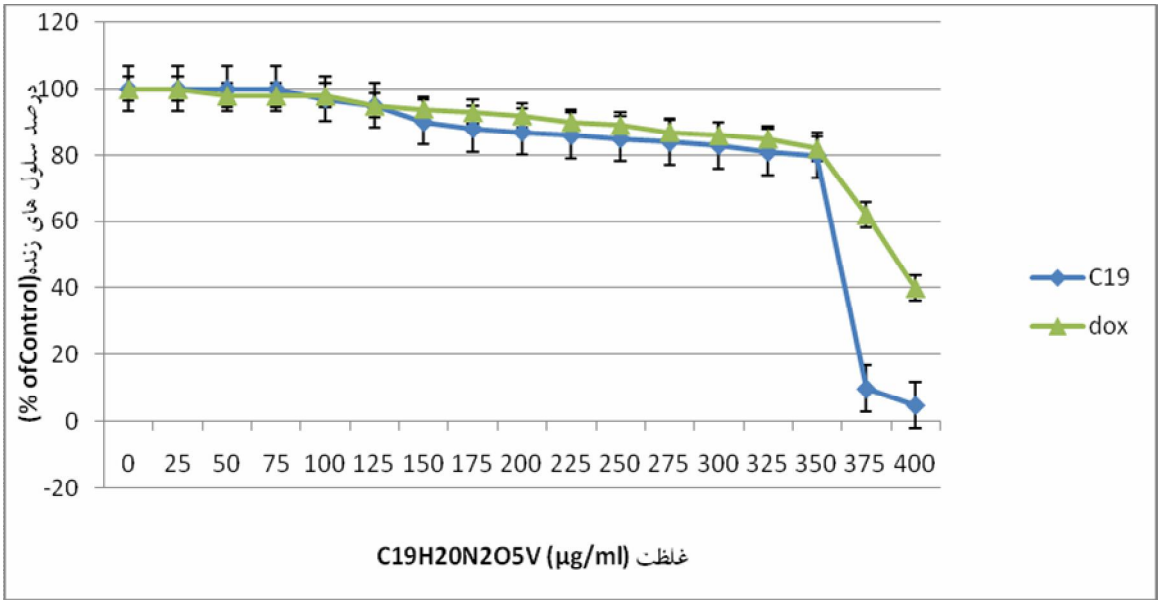
و) آنالیز چرخه‌ی سلولی سلول‌های k ۵۶۲ تحت تأثیر غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از شیف- باز وانادیوم مورد مطالعه: ابتدا ۲ میلی‌لیتر محیط کشت همراه ۱۰ درصد FBS با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیب مورد نظر و همچنین میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت همراه با ۱۰ درصد FBS با غلظت ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر (بر اساس کارهای صورت گرفته قبلی)(۲۶) از داروی دوگسوروبیسین به‌عنوان کنترل به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد، پس از پایان انکوباسیون سلول‌ها جمع‌آوری شده، دو بار با دور ۱۰۰۰ rpm/min به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس مایع‌رویی دور ریخته شد. سلول‌ها بعد از شستشو با ۱۰ میلی‌لیتر PBS بدون کلسیم و منیزیم به صورت سوسپانسیون در آمدند. سپس این سوسپانسیون به یک لوله فالکون خالی منتقل و دوباره با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ شدند، سپس مایع‌رویی دور ریخته شد و پلاک سلولی در ۲۰ میکرولیتر مایع باقی مانده ورتکس گردید. در ادامه به آرامی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد به آن اضافه شد. سپس نمونه به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای به دست آوردن حداکثر Resolution نگهداری شد. بعد از این زمان نمونه را با دور ۳۰۰۰ rpm در ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع‌رویی را دور ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر RNA ase و ۵۰ میکرولیتر از PI به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گشت. در نهایت نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

و) آنالیز آماری: در تمامی مراحل هر آزمون لااقل سه بار تکرار شد و داده‌های به‌دست آمده به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه‌ی (ANOVA) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه‌ی ۲۰۰۷) انجام گرفت.

یافته‌ها

الف) نتایج حاصل از بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی ترکیب سنتزی وانادیوم بر روی k562 به روش MTT Assay: اساس این روش بر مبنای تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول توسط میتوکندری سلول‌های زنده می‌باشد رسوب حاصل ارغوانی رنگ است. شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الایزا ریدر در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد سلول‌های زنده در چاهک‌ها با میزان OD یا جذب نوری سوسپانسیون سلولی در ارتباط است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که میزان حیات سلول‌های K ۵۶۲ در محدوده‌ی غلظت‌های ۲۵ تا ۷۵ میکرگرم بر میلی‌لیتر کمپلکس وانادیوم پس از ۴۸ ساعت

انکوباسیون تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مرگ و میر سلول‌ها نداشت؛ ولی از آن زمان به بعد سلول‌ها دچار مرگ و میر شدند. در غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان بقای سلول‌ها تا ۴۸ ساعت به ترتیب ۹۰، ۸۵ و ۸۰ درصد رسید. پس از آن میزان بقای سلول‌ها به‌صورت نمایی کاهش یافت. به‌طوری‌که میزان بقای سلول‌ها به ۵۰ درصد در غلظت ۳۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۳۰ درصد در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. بنابراین کمپلکس شیف باز وانادیوم مورد مطالعه تا غلظت‌های ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فاقد اثرات سیتوتوکسیک در In vitro بود. در این مطالعه نشان داده شده است که ترکیب شیف باز وانادیوم مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک با IC۵۰ ۳۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و IC۵۰ برای دوگسوروبیسین ۳۷۵ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد. دوکسوروبیسین نیز تا غلظت ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر الگوی تغییرات مشابهی را نشان می‌دهد ولی در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، کمپلکس شیف باز وانادیوم، موجب کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده می‌گردد (نمودار ۱).



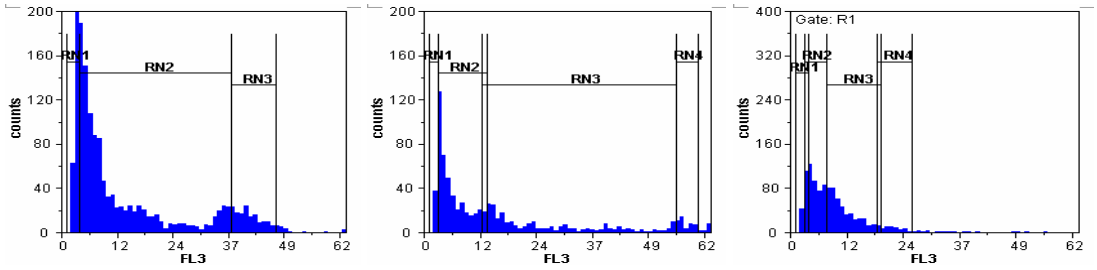
نمودار ۱: اثرات ۱و۳-دی آمینوپروپان وانادیوم (استیل استات) ۳- متوکسی و دوگسوروبیسین بر روی بقای سلول‌های K562 در ۴۸ ساعت. تمام آزمون‌ها بر اساس انحراف معیار ± میانگین آورده شده تمامی آزمون‌ها نیز سه بار تکرار شده است.

۱۰۰× OD کنترل/ OD نمونه -۱= درصد سرعت بقا یا زنده ماندن سلول

ب) نتایج حاصل از بررسی چرخه سلولی سلول‌های تیمار شده با شیف- باز وانادیوم توسط دستگاه فلوسایتومتری غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ترکیب شیف –باز وانادیوم در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت برای آنالیز چرخه‌ی سلولی مورد استفاده قرار گرفت. در این زمان توقف سیکل سلولی در مرحله‌ی G۰/G۱ دیده شد. همچنین این تیمار در قیاس با داروی داگسوروبیسین به‌صورت معنی‌داری موجب توقف بیشتری در مرحله‌ی G۰/G۱ می‌گردد (نمودارهای ۳-۲، ۲-۲، ۱-۲).

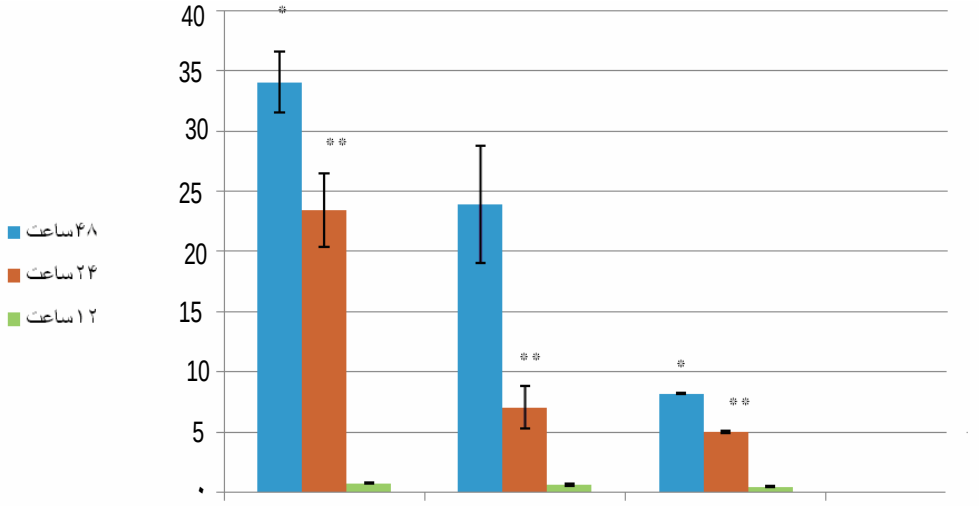
ج) نتایج حاصل از بررسی آپوپتوز سلول‌های تیمار شده با کیت Annexin-PI توسط دستگاه فلوسایتومتری: در طی مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح

داخلی به سطح خارجی غشای سلول منتقل می‌شود که Annexin به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. همچنین PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری می‌باشد. در نمودار (۳) درصد آپوپتوز سلول‌های K562 را که با شیف- باز وانادیوم تیمار شده است، مشخص شده است. که در سه زمان ۱۲،۲۴و۴۸ ساعت در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱/۰۱±۸/۲۴ و ۰/۰۵±۵/۰۳، ۰/۰۵±۰/۵۲ و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۰/۱۳± ۰/۶۶ و ۱/۷۷±۷/۱۱، ۳/۲±۲۳/۹۵ و در غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۰/۰۵±۰/۷۷ و ۴/۸۸±۲۳/۴۷، ۲/۵۴ ± ۳۴/۱۱ می‌باشد. (نمودار ۳) [نمودار فلوسایتومتری ۴ (۳-۴)، (۲-۴)، (۱-۴)]



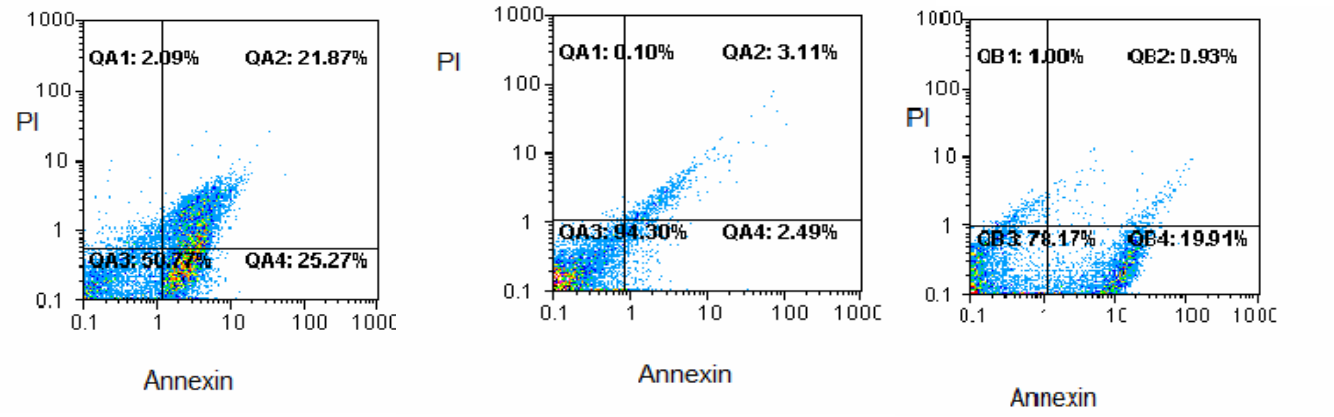
(۲-۱) (۲-۲) (۲-۳)

نمودار ۲: نمودارهای آنالیز چرخه سلولی بعد از ۲۴ساعت، شکل۱-۲) چرخه سلولی سلول‌های K562 بدون تیماربه عنوان شاهد ۲-۲) چرخه سلولی سلول‌های K562 تیمار شده با داروی داکسوروبیسین ۳-۲) چرخه سلولی سلول‌های K562 تیمار شده با ترکیب شیف – باز وانادیوم با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر



۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

*نمودار ۳: مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده‌ی K562 تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ۱,۳- دی آمینو پروپان وانادیوم اک اک (استیل استات) ۳-متوکسی (P<۰/۰۵) * (۴۸ ساعت)، (P<۰/۰۵)** (۲۴ ساعت)*



نمودار (۴-۱) نمودار (۴-۲) نمودار (۴-۳)

نمودار (۴) تعیین فلوسایتومتری آپوپتوز در سلول‌های k562 از طریق کیت Annexin-PI که در این نمودارها محور Xها، Annexin می‌باشد و محور Yها، PI را نشان می‌دهد. نمودار (۴-۱) سلول‌های کنترل k562 را نشان می‌دهد که بدون تیمار با ترکیب وانادیوم می‌باشد. نمودار (۴-۲) سلول‌های k562 تیمار شده با ترکیب وانادیوم ($C_{19}H_{20}N_2O_5V$) با غلظت ۳۵۰µ g/ml در زمان ۴۸ ساعت. نمودار (۴-۳) سلول‌های k562 تیمار شده با داروی دوگسوروبیسین با غلظت ۰/۲ µ g/ml در مدت زمان ۴۸ ساعت.

راهنمای نمودار ۴: ربع سمت راست بالا: سلول‌ها در مراحل انتهایی آپوپتوز، ربع سمت چپ بالا: سلول‌های نکروز شده، ربع سمت راست پایین: سلول‌ها در مراحل اولیه آپوپتوز شده، ربع سمت چپ پایین: سلول‌های زنده

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضدتوموری و القای آپوپتوز ترکیبی از شیف- بازهای وانادیوم "$C_{19}V_2.H_2N_5O$ ۱و۳ – دی آمینو پروپان وانادیوم آک آک (استیل استات) ۳-متوکسی" بود. شدت رنگ ایجاد شده در روش MTT با سلول‌های دارای میتوکندری فعال، متناسب است. در واقع این روش برای تعیین میزان تکثیر و بقای سلول‌ها بعد از قرارگرفتن در معرض مواد سیتوتوکسیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۷). نتایج حاصل از MTT نشان می‌دهد که بقای سلول‌های K ۵۶۲ وابسته به غلظت کمپلکس وانادیوم می‌باشد. به‌طوری که غلظت‌های بالاتر از کمپلکس وانادیوم مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر این ترکیب هستند. بررسی‌ها به وضوح نشان داده‌اند که کمپلکس وانادیوم مذکور تا غلظت ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثرات مشخص سیتوتوکسیک در In vitro نمی‌باشد. با افزایش غلظت کمپلکس وانادیوم مورد مطالعه به بالای غلظت ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حیات سلول‌ها به صورت نمایی کاهش می‌یابد. برای مطالعات بیشتر اثرات ذاتی ضد سرطانی کمپلکس وانادیوم مذکور، مطالعات بیشتری با استفاده از غلظت‌های غیر سیتوتوکسیک (۲۵۰،۱۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) طراحی گردید. به‌منظور یافتن ساز و کار کشندگی این کمپلکس آنالیز چرخه‌ی سلولی K ۵۶۲ پس از تیمار با ترکیب فوق الذکر انجام شد. کاهش معنی‌دار محتوای DNA در فاز G۰/G۱ از چرخه‌ی سلولی نشانگر کند شدن رشد سلولی و اثرات ضد تکثیری ترکیب یاد شده می‌باشد. براساس نتایج ما ترکیب $C_{19}V_2.H_2N_5O$ توقف بیشتری را در چرخه‌ی سلولی نسبت به داروی دوگسوروبیسین (به‌عنوان کنترل مثبت) نشان می‌دهد. رشد لجام گیسخته، از جمله ویژگی‌های سلول‌های سرطانی می‌باشد و بنابراین ترکیباتی که

موجب کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی بگردند، دارای اثرات بالقوه‌ی درمانی بر روی سرطان خواهند بود. بر اساس این نتایج می‌توان حدس زد که سلول‌های K ۵۶۲ احتمالاً به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده پیش می‌روند. در ادامه برای مطالعات بیشتر شیوه‌ی مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) از آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج ما مشخص نمود که درصد سلول‌های آپوپتوتیک (آنکسین مثبت و PI منفی) با افزایش غلظت و مدت زمان انکوباسیون، افزایش می‌یابد. بر طبق این نتایج، با افزایش غلظت از ۱۵۰ به ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و انکوباسیون از ۱۲ به ۴۸ ساعت، درصد آپوپتوز به طور معنی‌داری افزایش یافته است. بیشترین درصد آپوپتوز القا شده در بالاترین دوز غیر سیتوتوکسیک (۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) پس از ۴۸ ساعت تیمار ۳۷/۹۶ درصد بوده است. نکروز و آپوپتوز دو روش مجزای مرگ سلول می‌باشند. آپوپتوز همانند تمایز و تکثیر سلولی یکی از روش‌های مهم کنترل سلولی محسوب می‌گردد و هرگونه اختلال در آن منجر به رشد غیر طبیعی سلول‌ها می‌شود (۲۸). آپوپتوز به‌عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز خوانده می‌شود. در صورتی که این فرآیند دچاراختلال گردد، باعث ایجاد شرایط پاتولوژیکی، از قبیل سرطان و اختلالات خود ایمن می‌گردد. بالعکس افزایش غیر طبیعی آپوپتوز در اختلالات خود ایمن نورودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود (۳۱-۲۸). بر خلاف آپوپتوز، نکروز مرگ پاتولوژیک سلول بوده، در طی آسیب‌های شدید به سلول از قبیل هیپوکسی، هایپرترمی و سموم خارجی، این نوع مرگ سلولی رخ می‌دهد (۳۳و۳۲). روش‌های رادیوتراپی، شیمی درمانی و هورمون درمانی همگی موجب القای فرآیند آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند. البته به کار بردن در دوزهای بیشتر از این ترکیبات موجب مرگ سلول سرطانی از طریق سایر روش‌ها می‌شود (۳۴). نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که شیف-باز وانادیوم سنتزی مورد مطالعه دارای اثرات ممانعت از تقسیمات سلولی و القای آپوپتوز بر روی رده سلولی K ۵۶۲ است. به‌طور جالب توجهی در مطالعات قبلی نشان داده شده است که $Vo(acac)_2$ (ترکیبی از کمپلکس وانادیوم) به طور ترجیحی بر روی سلول‌های تومووری دارای فعالیت گلیکولیتیکی بالا قرار می‌گیرد (۳۵). در معرض قرار گرفتن سلول‌های MCF7 با آمونیوم مونووانادات منجر به القای آپوپتوز وابسته به غلظت می‌شود و ترکیب یاد شده منجر به توقف معنی‌دار چرخه‌ی سلولی و تراکم کروماتین در سلول‌های تحت تیمار در غلظت‌های غیرسیتوتوکسیک می‌گردد. بیشترین درصد آپوپتوز در این سلول‌ها در بالاترین غلظت غیر سایتوتوکسیک آن (۲۵۰ میکرومول) در حدود ۴۲/۵ درصد بوده است (۱۷و۱۶). همچنین ترکیبات وانادیوم باعث القای آپوپتوز در سرطان بیضه شده است (۲۱). مطالعات گذشته نشان می‌دهند که ترکیبات وانادیوم به‌طور معنی‌داری از تکثیر سلول‌های $HEPG_2$ هپاتومای انسانی جلوگیری می‌کنند. اما این ترکیبات دارای اثرات ناچیزی بر سلول‌های طبیعی کبد می‌باشند (۳۶). دو مسیر اساسی در آغاز آپوپتوز وجود دارد. مسیر میتوکندریایی یا مسیر داخلی شامل القای پروتئین‌های ویژه‌ای است که منجربه آزادسازی پروتئین‌های القاکننده‌ی مرگ که به‌طور طبیعی درون توالی میتوکندری‌ها قرار دارند، می‌شود. در روش «گیرنده‌های مرگ» یا مسیر خارجی، اتصال لیگاندهای خودی از طریق گیرنده‌های سطح سلولی (خانواده‌ی گیرنده‌های TNF) موجب آغاز آپوپتوز می‌گردد (۳۳و۳۲). عمده داروهای شیمی درمانی، استرس‌های ژنوتوکسیک و سایر عوامل محرک مرگ سلولی موجب القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی یا میتوکندری می‌گردد (۳۷). در مطالعات گذشته مشخص شده است که ترکیبات وانادیوم مانند Vo (acac)2 می‌تواند منجر به اختلال در فعالیت میتوکندری‌ها به صورت وابسته به غلظت و زمان گردد. به علاوه ترکیبات وانادیوم منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و رهایش سیتوکروم C از

میتوکندری‌ها می‌گردد. سیتوکروم C موجب آغاز آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی می‌شوند (۳۸). همچنین مطالعات روی رده‌های مختلف سلولی نشان می‌دهد که وانادیم اثرات ضدتوموری خود را از طریق ممانعت تیروزین فسفاتاز سلولی یا بر اثر فعال‌سازی تیروزین کینازها اعمال می‌کند. این اثرات خود منجر به فعال سازی مسیرهای انتقال سیگنال می‌شوند که در نهایت منجر به آپوپتوز یا فعال‌سازی ژن متوقف کننده تومور می‌شوند (۳۹). مطالعات اخیر همچنین نشان می‌دهد که نمک‌های وانادیوم باعث القای آپوپتوز بر روی سلول‌های اپی‌درم موش از طریق تولید پراکسید هیدروژن و سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق فعال سازی ژن P53 می‌گردد (۲۲). P53 یک ژن سرکوبگر چرخه‌ی سلولی و تنظیم کننده‌ی تعمیر DNA و آپوپتوز می‌باشد (۴۰). در نهایت به نظر می‌رسد که ترکیب یاد شده پتانسیل لازم را برای تولید داروهای ضد سرطانی جدید دارا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از MTT نشان می‌دهد که بقای سلول‌های K۵۶۲ وابسته به غلظت کمپلکس وانادیوم می‌باشد. به‌طوری که غلظت‌های بالاتر از کمپلکس وانادیوم مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر این ترکیب می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که شیف-باز وانادیوم سنتزی مورد مطالعه دارای اثرات ممانعت از تقسیمات سلولی و القای آپوپتوز بر روی رده‌ی سلولی K۵۶۲ می‌باشد. در نهایت به نظر می‌رسد که ترکیب یاد شده پتانسیل لازم را برای تولید داروهای ضد سرطانی جدید دارا می‌باشد.

تقدیر وتشکر

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر ابطحی، جناب آقای حسینی‌فر و آقای وحدت جاهد و مسوولین پژوهشکده‌ی زیست فناوری ارومیه، که در اجرای این پایان نامه ما را حمایت کردند، قدردانی می‌کنند.

References

1- Meshkini A, Yazdanparast R. Chemosensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. *Experimental Molecular Pathol.* 2010; 89: 334-342.

2- Sherman S E, Gibson D, Wang A H, Lippard S J.X- ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: Cis-Pt (NH3)2{d(pGpG)}]. *Science.* 1985; 4724: 412- 7.

3- Kopf-maier P .Complex of metal other than platinum as antitumor agents. *Eur J Clin Pathol.* 1994; 47: 1-16.

4- Jones RD, Summerville DA, Basolo F. Synthetic oxygen carriers related to biological systems. *Chemical Review.* 1979; 79: 136-76.

5- Yilmaz VT, Degirmencioglu I, Andac O, Karabooceek S, Slawin AMZ. Synthesis, spectra and crystal structure of 2-({[3-methyl{3-[(2-hydroxybenzbezylidene)amino]propyl]amino}Phe nol copper(11)complex. *Moleculare.* 2003; 654: 125-9.

6- Failes TW, Hambley TW. Towards bioreductively activated prodrugs Fe(lll) complexes of hydroxamin acids and the MMP inhibitor marimastat. *Inorganic Biochemistry*. 2009; 3:369- 403.

7- Bianchi N, Ongaro F, Chiarabelli C, et al. Induction of erythroid differentiation of human K562 cells by cisplatin analogs. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60: 31-40.

8- Sorensen, M, Schins R P, Hertel O, Loft S. Transition metals in personal samples of PM25 and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomark*. 2005; 14: 1340-3.

9- Almedeida M, Filipe S, Hunianes M, et al. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the laminariaceae family. *Phytochemistry*. 2001; 57: 633-42.

10- Sakurai H, Katoh A, Yoshikawa Y. Chemistry and biochemistry of insulin-mimetic vanadium and zinc complexes: trial for treatment of diabetes mellitus. *Bull Chem Soc Jpn*. 2006; 79: 1645-64.

11- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*. 2002; 42: 249-265.

12- Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tewari A, Chatterjee M, Vanadium – an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett*. 2004; 150: 135-43.

13- Thompson HJ, Chasteen ND, Meeker LD, Vanadyl (IV) sulphate inhibit chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1984; 5: 849-851.

14- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paul KD, Monks A, Tierney S, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazoin assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988; 48: 4827-33.

15- Willey AH, Apoptosis and regulation of cell numbers in norml and neoplastic tissue.an overview. *Cancer and Metastasis Review*. 1992; 11: 99-103.

16- Rajarshi SR, Balaram G, Ajay R, Malay C. Suppression of cell proliferation induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer*. 2006; 120: 13-23.

17- Ray RS, Rana B, Swami B, Venu V, Chatterjee M. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chem Biol Interact*. 2006; 163: 239-47.

18- Djordjevi C, Vuletic N, Renslo M L, Puryear B C, Alimard R.Peroxo heteroligant vanadates (V): synthesis, spectra-structure relationships and stability toward decomposition. *Mol Cell Biochem*. 1995; 153: 25-9.

19- Noblia P, Vieites M, Parajon-Costa B S, et al. Vanadium(V)complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [VVO2(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. *J Inorg Biochem*. 2005; 99: 443-51.

20- Itkes AV, Imamova LR, Alexandrova NM, Favorova O O,Kisselev L. Expression of c-myc

gene in human ovary carcinoma cells treated with vanadate. *Exp Cell Res.* 1990; 188: 169-71.

21- Ghosh P, Dcruz OJ, Narla RK, Uckun FM. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 1536-45.

22- Huang C, Zhang Z, Ding M, et al. Vanadate induces P53 activation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem*. 2000; 275: 16-22.

23- Lampronti I, Bianchi N, Borgatti M, et al. Effects of vanadium complexes on cell rowth of human leukemia cells and protein-DNA interactions. *Oncol Rep.* 2005; 14: 9-15.

24- Kemnitzer W, Kasibhatla S, Jiang S, et al. Discovery of 4-aryl-4H- chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based highthroughput screening assay. 2. Structure-activity relationships of the 7- and 5-, 6-, 8-positions. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005; 15: 4745-51.

25- Stelle H R,Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995; 267: 1445-9.

26- Qun S, Boshao Zh, Wei Zh, et al. Inhibition of AMP-activated protein kinase pathway sensitizes human leukemia k562 cells to nontoxic concentration. Spiringer Science Business Media. *Mol Cell Biochem.* 2010; 340: 275-81.

27- Chan V, Hilchie A, Brown M, Anderson R, Hoskin D. Apoptosisinduced by intracellular ceramide accumulation in MDA-MB-435 breast carcinoma cells is dependent on the generation of reactive oxygen species. *Exp Mol Pathol.* 2007; 82: 1-11.

28- Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. Molecular biology of cancer. Bios scientific publisher: United kingdom; 2004.

29- Clarke PG, Development cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 1990; 181: 195-213.

30- Carson DA, Ribero JM, Apoptosis and disease, *Lancet*. 1993; 341: 251-54.

31- Gougeon ML, Montagnier L, Apoptosis in AIDS. *Science.* 1993; 260: 1269-70.

32- Wilkinson G. Comprehensive organometallic chemistry. NewYork: Pergamon; 1982.

33- Gordon JA. Use of vanadate as protein-phsphotyrosine phosphateinhibitor. *Methods Ezymol.* 1991; 201: 478-82.

34- Willey AH, Apoptosis and regulation of cell numbers in norml and neoplastic tissue.an overview. *Cancer and Metastasis Review.* 1992; 11: 99-103.

35- Devkumar BO, Peng SF, Marvin W, et al. New vanadium-based magnetic resonance imaging probes:clinical potential for early detection of cancer. *J Biol Inorg Chem.* 2009; 14: 1187-97.

36- Qin WT, Ying FU, Kui W, Xiao-Gai Y, Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. *J Biol Inorg Chem.* 2010; 15: 1087-97.

37- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, et al.

Discovery of 4-aryl - 4H-chromenes as a newseries of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based highthroughputscreening assay. 3. Structure-activity relationships offused rings at the 7, 8-positions. *J Med Chem*. 2007; 50: 2858-64.

38- Zhao Y, Ye L, Liu H, et al. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorganic Biochem.* 2010; 104: 371-8.

39- Vangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncol/Hematol*. 2002; 42: 249-65.

40- Assimakopoulos D, Kolettas E, Zagorianakou N, Evangelou A, Skevas A, Agnantis N. Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. *Anticancer Res*. 2000; 20: 3555-64.

Vanadium Compounds Mediated Apoptosis and Cell Cycle Arrest in K562 Cell Line

Fakhraei M[1], Nejaty V[1], Dalirazh N[2]

[1]Dept. of Biology, Faculty of Science, The University of Urmia, Urmia, Iran

[2]Dept. of Veterinary, Faculty of Immunology, The University of Urmia, Urmia, Iran

Corresponding Author: Fakhraei M, Dept. of Biology, Faculty of Science, The University of Urmia, Urmia, Iran.

E-mail: maryamfakhrayi@yahoo.com

Received: 4 Jan 2011 **Accepted:** 12 Sep 2011

Background and Objective: Compounds of heavy metals such as vanadium, nickel, and cobalt can be useful in treatment of many diseases. There are several reports on the biological effects of vanadium compounds including insulin-like action and reduction of hypertension. A number of studies on vanadium have shown its promising ability to inhibit cancers in a variety of malignant cell lines. The goal of this study was to examine the anti-proliferative and apoptosis-inducing characteristics of some newly synthesized shifft-based vanadium (VOLComplex:C19H20N2O5V) on K562 leukemia cells.

Materials and Methods: The MTT results show that the K562 cells viability is sensitive to the Vol complex in a concentration dependent manner. It was evident that the VOL complexe, up to a dose of 350 µg/ml, were non-cytotoxic *in vitro* after 48 hours of incubation time. In order to investigate if the Vol complexe have just anticancer effect, we designed further studies with non-cytotoxic doses of the complex. Based on the cell viability data, the concentrations of 150, 250, and 350 µg/ml of the VOL complexe were selected to treat the K562 cells for 12, 24, and 48 hr to induce apoptosis.

Results: The results of apoptosis analysis and flow cytometric examination show that exposure of the K562 cells to non-cytotoxic dosses of the VOL complex leads to induction of apoptosis in a dose- and time-dependent manner. The highest level of apoptosis (37.96%) occurred after 48 hr of treatment in response to 350 µg/ml of the Vol complex. Moreover, the cell cycle analysis shows that the VOL complex induces a G0/G1 arrest.

Conclusion: Our findings indicate that the Vol complex, even at a non-cytotoxic dose, has an apoptosis inducing effect, and that it is capable of arresting the affected cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. Taken together, based on their role on induction of apoptosis and cell cycle arrest, VOL complexes may have the potential for being included in an anti-cancer drug discovery program in the near future.

Keywords: Vanadium, K562, MTT assay, Flow cytometry, Apoptosis, Cell cycle