

Cytotoxic and Apoptotic Effects of the New Derivatives of Quinazoline Family on K562 Cells, Chronic Myelogenous Leukemia

Majid Ghasemian¹, Majid Mahdavi^{1*}, Mohammad Rahnamay¹, Payman Zare², Mammad Ali Hosseinpour Feizi¹, Saeed Balalaei³

¹Department of Biology, School of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Department Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Department of Chemistry, School of Science, University of K. N. Toosi, Tehran, Iran

Received: 9 Jan, 2014 Accepted: 27 Feb, 2014

Abstract

Background and Objectives: Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a clonal pluripotent hematopoietic stem cell disorder which increases the number of abnormal white blood cells. Recently, Quinazoline derivatives have been considered for cancer treatment. The objective of this study was to determine the cytotoxicity and apoptosis effects of the new Quinazoline derivatives on K562 cell line, CML.

Methods and Materials: The colorimetric MTT test was used to evaluate cytotoxicity of these compounds. The K562 cells were seeded in 96-well plates at 2×10^4 cells/well and treated with various concentrations (100-300 μ M) of the Quinazoline compounds (4t-CHQ, 4-CHQ and 4-CPQ) for 24, 48 and 72 h. Inverted and fluorescent microscopy were used to evaluate the morphological changes and apoptosis. Apoptosis was also confirmed by DNA fragmentation assay.

Results: The results showed that the Quinazoline compounds cause cell death in a dose- and time-dependent manner. 4t-CHQ, 4-CHQ and 4-CPQ were found to be highly active cell proliferation inhibitor with IC₅₀ values of 200, 280 and 280 μ M, respectively. Given that the basic structures of these compounds, the compound with a reactive group showed stronger cytotoxic activity. The results indicated that structure and function of these compounds are related to each other. Fluorescent microscopy and DNA fragmentation assay was confirmed apoptosis cell death in K562 cells after 48 h of treatment with the compounds.

Conclusion: Base on these results, the new Quinazoline derivatives can be proposed as effective agents for more investigation in the field of chemotherapy.

Keywords: Apoptosis, Chronic Myelogenous Leukemia, Quinazoline, K562 cells

*Corresponding author:

E-mail: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثرات سیتوتوکسیک و آپاپتوزی مشتقات جدید کوینازولین بر روی رده‌ی سلولی K562 لوسمی میلوئید مزمن

مجید قاسمیان^۱، مجید مهدوی^{۱*}، محمد رهنمای^۱، پیمان زارع^۲، محمد علی حسین پورفیضی^۱، سعید بلالایی^۳

^۱ گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ گروه شیمی آلی، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۲/۱۰/۱۹ پذیرش: ۹۲/۱۲/۸

چکیده

زمینه و اهداف: لوسمی میلوئید مزمن (CML) یک اختلال در سلول‌های هماتوپوئیتیک چند توان می‌باشد که در آن تعداد گلبول‌های سفید غیر نرمال افزایش می‌یابد. اخیراً مشتقات کوینازولین در فعالیت‌های زیستی مخصوصاً در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه تعیین اثرات سیتوتوکسیک و آپاپتوزی مشتقات جدید کوینازولین بر روی رده‌ی سلولی K562 از لوسمی میلوئید مزمن (CML) بود.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک از آزمون رنگ سنجی MTT استفاده گردید. بدین منظور تعداد 2×10^4 از سلول‌های K562 در غلظت‌های ۱۰۰-۳۰۰ میکرومولار (μM) از ترکیبات کوینازولین (4-CPQ و 4-CHQ 4t-CHQ) در فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. جهت بررسی تغییرات مورفولوژیک و مرگ سلولی (آپاپتوز) از میکروسکوپ نوری معکوس و فلورسنس استفاده شد. برای تایید مرگ آپاپتوزی از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که مشتقات کوینازولین باعث مرگ سلول‌های K562 وابسته به غلظت و زمان می‌شوند. IC50 ترکیبات 4-CHQ و 4-CPQ پس از ۴۸ ساعت از تیمار به ترتیب ۲۰۰، ۲۸۰ و ۲۸۰ میکرومولار (μM) محاسبه شد. با توجه به یکسان بودن ساختار پایه‌ای این ترکیبات، ترکیبی که دارای گروه‌های واکنشگر بود فعالیت سیتوتوکسیک قوی‌تری را نشان می‌داد. نتایج نشان داد که ساختار و عملکرد این ترکیبات به یکدیگر وابسته است. داده‌های حاصل از میکروسکوپ فلورسنس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA بعد از ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌های K562 با ترکیبات کوینازولین، مرگ سلولی از نوع آپاپتوز را تایید کرد.

نتیجه گیری: بر پایه اطلاعات حاضر مشتقات جدید کوینازولینی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تحقیقات در زمینه شیمی درمانی باشند.

کلید واژه‌ها: آپاپتوز، لوسمی میلوئید مزمن، کوینازولین، سلول K562.

* ایمیل نویسنده رابط: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

سرطان نام گروهی از بیماری‌های به هم مرتبط می‌باشد که در تمام انواع آنها رشد بی‌رویه و گسترش غیرطبیعی سلول‌ها را داریم (۱). سرطان از اوایل قرن ۲۱ یک تهدید بزرگ برای سلامتی عمومی مطرح است. در حال حاضر سرطان مسئول ۲۵ درصد از مرگ و میرها در کشورهای پیشرفته و ۱۵ درصد از مرگ و میرها در سراسر جهان می‌باشد (۲). لوسمی یک اختلال در سلول‌های هماتوپوئیتیک چند توان می‌باشد که باعث افزایش تعداد گلبول‌های

سرطان خون می‌شود. کروموزوم فیلادلفیا (ph) در سال ۱۹۶۰ به عنوان یک ناهنجاری کروموزومی توصیف شد. این ناهنجاری کروموزومی در بیشتر بیماران با لوسمی میلوئید مزمن وجود دارد. ژنتیک مولکولی کروموزوم فیلادلفیا نشان می‌دهد که ژن ABL بر روی بخشی از کروموزوم ۹ وجود دارد که به کروموزوم ۲۲ منتقل می‌شود. نقطه شکستی که در کروموزوم ۲۲ رخ می‌دهد باعث کوتاه شدن طول DNA به اندازه ۵-۶kb می‌شود این ناحیه

ترکیبات هتروسیکلیک اصلی در فعالیت‌های زیستی می‌باشد که از دو حلقه آروماتیک شش ضلعی شامل یک حلقه بنزنی و یک حلقه پیریمیدینی تشکیل شده است. تاکنون خواص پزشکی و بیولوژیکی مختلف از جمله خاصیت ضد تشنج، ضد آلرژی، ضد دیابت، ضد فشار خون و ضد مالاریای کوینازولین‌ها گزارش شده است (۱۹، ۲۰ و ۲۱). داروی ارلوتینیب (Erlotinib) با نام تجاری Tarceva به عنوان یکی از مشتقات کوینازولین در درمان سرطان شش کاربرد دارد. این ترکیب یک مهار کننده تیروزین کیناز می‌باشد (۲۲).

در این تحقیق اثرات سیتوتوکسیستی و آپتوزی مشتقات جدیدی از خانواده کوینازولین (شکل ۱) را که در آزمایشگاه دکتر سعید بلالایی دانشگاه صنعتی خواجه نصیر الدین طوسی سنتز شده‌اند برای اولین بار بر روی رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی سرطان خون CML مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

مواد:

محیط کشت سلولی RPMI-1640، سرم جنین گاوی (FBS)، آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین، پودر MTT، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، آکریدین اورنج (AO)، اتیدیوم بروماید (EtBr)، پودر آگاروز، تریس (Tris-HCl)، پروتئیناز K، RNaseA/T1، اتیل دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، نمک بافر فسفات (PBS)، پودر KH_2PO_4 ، پودر $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

روش تهیه غلظت‌های مختلف دارو:

برای تهیه غلظت‌های مختلف دارو از مشتقات کوینازولین ابتدا با توجه به وزن مولکولی این ترکیبات از پودر آنها به مقدار کافی برای غلظت ۱۰ میلی مولار وزن و سپس در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شدند. سپس از این استوک غلیظ، و با توجه به روابط استوکیومتری مقدار مشخصی از آن برداشته شد و برای درست کردن محلول ۱ میلی مولار با محیط کامل رقیق شد. در ادامه مقدار مشخصی از دارو (بر اساس غلظت‌های مورد آزمایش) به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد.

کشت سلول:

رده‌ی سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 (بیوسرا، انگلستان) غنی شده با سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) (بیوسرا، انگلستان) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و پنیسیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) (سیناژن، تهران) در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد. سلول‌ها هر ۲-۳ روز یکبار یکبار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند. در ابتدای تمام آزمایش‌ها سلول‌ها توسط رنگ آمیزی تریپان بلو جهت سالم بودن مورد بررسی قرار گرفتند (۲۳).

بررسی اثرات سیتوتوکسیستی مشتقات کوینازولین:

شکست ناحیه خوشه ژن BCR نامیده می‌شود (۳-۵). جابجایی کروموزوم‌ها آنها را به سمت آرایش مجدد ژنی که تولید پروتئین‌های کیمریک می‌کند سوق می‌دهد که این یکی از وقایع اولیه در پیدایش لوسمی می‌باشد. اینجا بجایی کروموزومی در سرطان لوسمی باعث به وجود آمدن ژن هیبرید BCR-ABL شده که پروتئین $\text{p210}^{\text{BCR-ABL}}$ را کد می‌کند. فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و نقص در فرایند آپتوز می‌گردد (۷، ۶).

در دهه‌های گذشته اکثر روش‌های درمان سرطان خون شامل شیمی درمانی و پرتودرمانی بوده است. شیمی درمانی روشی مؤثر در جلوگیری از پیشرفت بیماری و از بین بردن و مرگ سلول‌های سرطانی است. اکثر داروهایی که در شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند رشد سلول‌ها را متوقف کرده و یا موجب مرگ سلول‌ها می‌شوند. از آن جمله می‌توان به داروهایی اشاره کرد که باعث القا آپتوز می‌شوند (۸، ۷). آپتوز یک فرایند شدیداً کنترل شده می‌باشد که در آن مرگ سلولی از طریق فعال سازی مسیرهای پیام رسانی ویژه‌ای اجرا می‌شود (۹). آپتوز توسط فرایندهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی، مخصوصاً چروکیدگی سلولی، تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و تشکیل اجسام آپتوزی توصیف می‌شود (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). در دهه پیش درمان CML نسبتاً ساده بود. تمام بیماران به عنوان درمان خط اول، ایماتینیب (Imatinib) دریافت می‌کردند و برای کسانی که بدن آنها به این دارو جواب نمی‌داد بهترین جایگزین پیوند سلول‌های بنیادی آلونژیک بود (۱۴). امروزه ایماتینیب مسیلات (Imatinib Mesylate) یا STI571 جهت درمان CML بکار می‌رود که بطور اختصاصی منجر به مهار BCR-ABL می‌گردد، اما کاربرد این دارو سبب بروز اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی می‌شود. مقاومت تومورهای انسانی به عوامل شیمی درمانی یکی از عوامل اصلی شکست درمان سرطان می‌باشد (۱۵، ۱۶).

مقاومت به آپتوز در بدخیمی‌های انسانی یک دلیل برای نگرانی در پیشرفت و اثر گذاری عوامل شیمی درمانی می‌باشد. به طور کلی اعتقاد بر این است که تیمار سلول‌های سرطانی با عوامل شیمی درمانی باعث تخریب آنها از طریق آپتوز می‌شود (۷). شیمی درمانی ضد توموری امروزه یک رشته بسیار فعال است و هر سال مقداری زیادی اطلاعات در مورد این موضوع تولید می‌شود. هر چند اطلاعات زیادی در زمینه شیمی درمانی در مواجهه با جنبه‌های بالینی سرطان وجود دارد ولی نیاز بیشتری برای درمان‌های به روز شده از نظر شیمی دارویی احساس می‌شود (۱۷). با توجه به اینکه بسیاری از داروهای ضد سرطان بسیار سمی و کشنده هستند، بنابراین توسعه داروهای شیمی درمانی جدید مهم و حیاتی می‌باشد و همچنین پتانسیل عوامل ضد سرطان جدید معمولاً بهتر از داروهای قدیمی می‌باشد (۱۸). این حقیقت محققان را تحریک به سنتز ترکیبات جدید ضد سرطان با خاصیت کشندگی بالا و اثرات جانبی کمتر کرده است. اخیراً مشتقات کوینازولین (Quinazolin) در فعالیت‌های زیستی مخصوصاً در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۹). کوینازولین از

ماکرولیتر از بافر لودینگ $6 \times$ شامل ۳۰ درصد گلیسرول و ۲۵ درصد بروموفونول بلو به نمونه‌ها اضافه شد. در این آزمایش از ژل ۱/۵ درصد که با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ گردید، استفاده شد. پس از لود کردن نمونه‌ها در هر یک از چاهک‌ها، الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری:

تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS21 و میکروسافت اکسل ۲۰۱۰ و آزمون student t-test انجام شد و داده‌های با ارزش $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته‌ها

در این تحقیق اثر کشندگی سه مشتق از خانواده بنزن سولفامید کوینازولین، شامل (4CPQ و 4t-CHQ,4-CHQ) با استفاده از آزمون تغییر رنگ MTT بر روی رده‌ی سلولی K562 از سرطان CML مورد سنجش قرار گرفت. در این آزمایش سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف دارو از ۱۰۰ تا ۳۰۰ ماکرومولار در سه زمان ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و داده‌های حاصل از سنجش MTT نشان داد که مشتقات هر سه گروه به صورت وابسته به غلظت و زمان باعث کشته شدن سلول‌های K562 می‌شوند (شکل ۱). همچنین در این بررسی مشخص شد بعضی از این مشتقات کوینازولینی فعالیت قوی تری نسبت به سایر اعضای گروه دارند بطوریکه در غلظت‌های پایین‌تر تعداد بیشتری سلول را می‌کشند. مشتقات هر سه گروه در طی ۲۴ ساعت کشندگی کمتری داشتند و بیشتر در این مدت زمان باعث ایجاد تنش به سلول‌ها می‌شدند و در مقادیر بالای دارویی باعث کشنده شدن ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شدند ولی با افزایش زمان در طی ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت‌های پایین‌تر دارویی باعث کشنده شدن ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شدند. مقدار زیستایی سلول‌های K562 تیمار شده با سه ترکیب فوق در غلظت‌های مختلف دارویی در زمان‌های ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و محاسبه شد. این سه ترکیب دارای ساختمان پایه‌ای مشترک ولی دارای استخلاف‌های متفاوتی می‌باشند که اختلاف آنها در این استخلاف‌ها باعث تغییر در میزان سمیت آنها نیز می‌باشد. بنابراین، میزان فعالیت و کشندگی این ترکیبات مرتبط با ساختار آنها می‌باشد (شکل و جدول ۱).

برای بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های K562 بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت دارو در حد IC50 تغییرات مورفولوژیکی آنها در زمان‌های ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت با استفاده از میکروسکوب نوری معکوس بررسی شد و مشاهده گردید که ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با دارو، تنش وارد شده بر سلول‌ها باعث جمع شدن (aggregation) آنها گردید و در زیر میکروسکوپ به صورت توده‌ای دیده شدند و پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار دارو سلول‌ها همراه با تغییر شکل تخریب شده و اجسام آپتوزی قابل مشاهده بود. در نهایت پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار سلول

برای بررسی اثرات کشندگی مشتقات جدید خانواده کوینازولین 2×10^4 سلول K562 در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف دارویی از این ترکیبات به هر چاهک برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه شد. برای تهیه محلول MTT، به میزان ۵ میلی گرم از این ترکیب را در ۱ میلی لیتر از PBS (بافر نمکی فسفات) حل شد محلول حاصل با استفاده از فیلتر، استریل گردید. در ادامه پس از زمان مورد نظر میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT را به هر چاهک اضافه شد و سپس پلیت را در انکوباتور ۳۷ درجه به میزان ۳-۴ ساعت قرار داده تا واکنش تغییر رنگ کامل انجام گیرد. در ادامه با اضافه کردن ۲۰۰ ماکرولیتر از محلول DMSO با بافر سورنسون با نسبت (۱۶:۲) واکنش متوقف شد. این محلول‌ها باعث حل شدن رسوب فورمازان بنفش رنگ در سلول‌های سالم نیز می‌شود. در ادامه میزان جذب، توسط دستگاه خوانشگر الیزا در طول موج ۵۷۰ nm اندازه گیری شد. این آزمایش‌ها سه مرتبه به طور مستقل انجام شد (۲۴).

مطالعات مورفولوژیکی سلول‌های کنترل و تیمار شده با مشتقات کوینازولین:

جهت انجام این آزمایش مقدار 2×10^4 سلول K562 در پلیت های ۱۲ چاهکی کشت داده شد. و بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های با مشتقات کوینازولین (در غلظت های IC₅₀) برای زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند. تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تیمار شده با دارو و سلول‌های کنترل با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس و میکروسکوب نوری معکوس (المیوس، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تهیه محلول آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از هر یک به طور جداگانه در یک میلی لیتر بافر نمکی فسفات (PBS) حل گردید. در ادامه ۲۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی (2×10^4) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (شرکتیگما-آلمان) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس مشاهده گردید (۲۵).

بررسی آپتوز با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA:

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA به قطعات اولیگونوکلوئیدی با اندازه ۲۰۰-۱۸۰ جفت بازی که طی آپتوز رخ می‌دهد از ژل آگاروز استفاده شد. در این آزمایش میزان 2×10^4 سلول در پلیت‌های ۱۲ چاهکی کشت داده شد و با غلظت مناسب (غلظت های IC₅₀) از ترکیبات کوینازولین تیمار گردیدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، سلول‌ها جمع آوری شده و با PBS سرد شستشو داده شدند. در ادامه ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده شامل (mM Tris, pH:8.0, 0.8% [w/v] SDS, 100mM EDTA) به میکروتیوب‌ها منتقل شد و به آرامی هم زده شد. سپس 10μ از RNase A/T1 به میکروتیوب‌ها افزوده شد و به آرامی مخلوط گردید. در ادامه ۱۰ ماکرولیتر از پروتیناز K به نمونه‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا واکنش هضم آنزیمی انجام گیرد. سپس ۵

با دارو سلول‌ها کامل از هم پاشیده و لاشه‌های سلولی قابل رویت بود (شکل ۲).

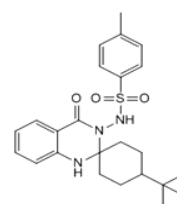
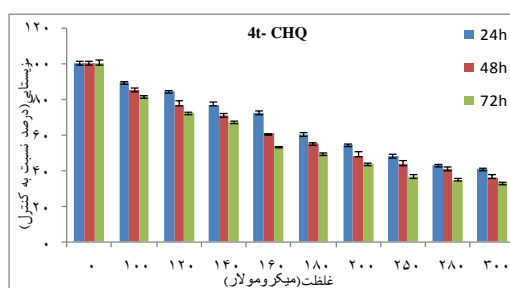
به منظور اثبات مرگ سلولی آپتوزی از رنگ آمیزی اختصاصی سلول‌ها با آکریدین اورنج (AO) و اتیدیوم بروماید (Et/Br) و مطالعه بوسیله میکروسکوپ فلورسنس استفاده می‌شود. در این رنگ آمیزی، سلول‌های زنده دارای هسته طبیعی، رنگ سبز درخشان با ساختار سازمان یافته ولی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپتوز (Early apoptosis) قرار دارند، رنگ سبز دارای نقاط روشن سبز در هسته نشانه‌هایی از تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند (شکل ۲). سلول‌هایی که در مراحل انتهایی آپتوز (Late apoptosis) هستند رنگ اتیدیوم بروماید را از خود عبور داده و به شکل اجسام آپتوزی نارنجی رنگ دیده می‌شوند (شکل ۲).

از ویژگی‌های سلول‌های آپتوزی قطعه قطعه شدن DNA از ژنومی آنها می‌باشد. قطعه قطعه شدن DNA توسط آنزیم CAD (Caspase Activated Dnase) انجام می‌شود. این آنزیم به طور طبیعی توسط آنزیم دیگری به نام ICAD مهار می‌شود ولی در طی آپتوز با فعال شدن کاسپاز ۳ آنزیم ICAD تجزیه می‌شود و باعث فعال شدن آنزیم CAD می‌شود. البته DNA ژنومی سلول‌های K562 تیمار شده با دارو به جای حالت نردبانی به صورت لکه یا اسمیر (Smear) بر روی ژل الکتروفورز دیده می‌شود که علت آن نقص در عملکرد آنزیم CAD می‌باشد. بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل ۳ الگوی ژنومی DNA سلول‌های کنترل و تیمار شده با ترکیبات بنزن سولفامید کوینازولین نشان داده شده است. در این آزمایش مشخص گردید که طی آپتوز با توجه به قطعه قطعه شدن DNA الگوی ژنومی سلول‌های تیمار شده، به صورت اسمیر می‌باشد در حالی که در سلول‌های کنترل الگوی ژنومی در بالای ژل مانده و کمتر به پایین حرکت کرده است که نشان دهنده این موضوع می‌باشد که DNA ژنومی سلول‌های آنها قطعه قطعه نشده است (شکل ۳).

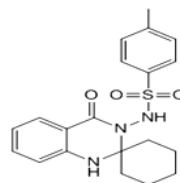
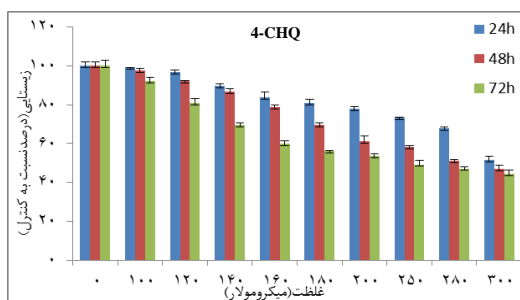
با دارو سلول‌ها کامل از هم پاشیده و لاشه‌های سلولی قابل رویت بود (شکل ۲).

به منظور اثبات مرگ سلولی آپتوزی از رنگ آمیزی اختصاصی سلول‌ها با آکریدین اورنج (AO) و اتیدیوم بروماید (Et/Br) و مطالعه بوسیله میکروسکوپ فلورسنس استفاده می‌شود. در این رنگ آمیزی، سلول‌های زنده دارای هسته طبیعی، رنگ سبز درخشان با ساختار سازمان یافته ولی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپتوز (Early apoptosis) قرار دارند، رنگ سبز دارای نقاط روشن سبز در هسته نشانه‌هایی از تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند (شکل ۲). سلول‌هایی که در مراحل انتهایی آپتوز (Late apoptosis) هستند رنگ اتیدیوم بروماید را از خود عبور داده و به شکل اجسام آپتوزی نارنجی رنگ دیده می‌شوند (شکل ۲).

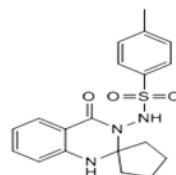
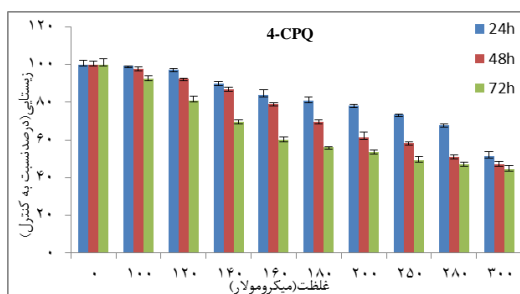
از ویژگی‌های سلول‌های آپتوزی قطعه قطعه شدن DNA از ژنومی آنها می‌باشد. قطعه قطعه شدن DNA توسط آنزیم CAD



N-(4-tert-butyl-4'-oxo-1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-quinazoline]-3'(4'H)-yl)-4methylbenzenesulfonamide(4-CHQ)

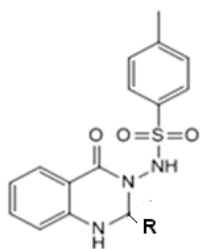


4-methyl-N-(4'-oxo-1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-quinazoline]-3'(4'H)-yl)benzenesulfonamide(4-CHQ)



4-methyl-N-(4'-oxo-1'H-spiro[cyclopentane-1,2'-quinazoline]-3'(4'H)-yl)benzenesulfonamide(4-CPQ)

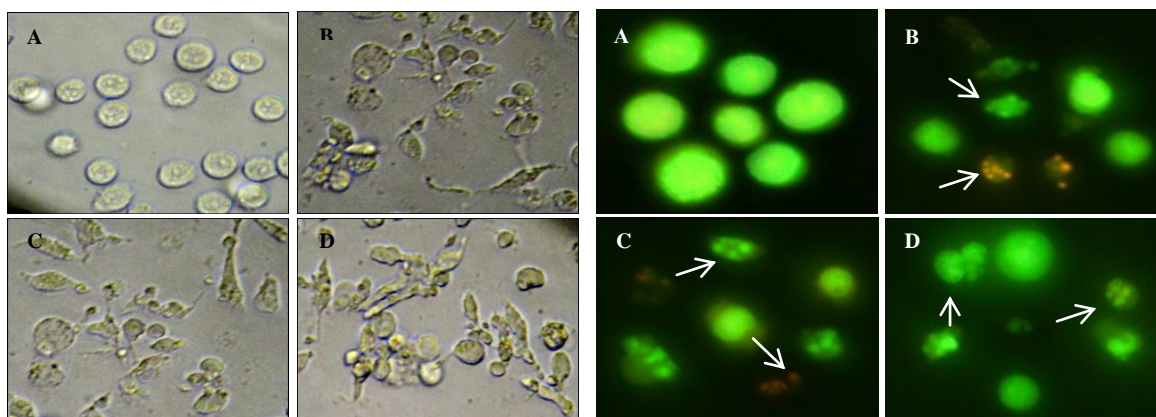
شکل ۱: ساختار (الف) و اثرات سیتوتوکسیک (ب) مشتقات بنزن سولفامید کوینازولین بر روی سلول‌های K562. سلول‌های K562 در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و با غلظتهای مختلف (۱۰۰-۳۰۰ μM) از ترکیبات بنزن سولفامید کوینازولین تیمار شدند و اثرات آنها بر زیستایی این سلولها با استفاده از آزمون تغییر رنگ MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (SD) می‌باشد (P < ۰/۰۵).



جدول ۱: زیستایی سلولهای K562 توسط ترکیبات بنزن سولفامید کوبینازولین وابسته به غلظت و زمان.

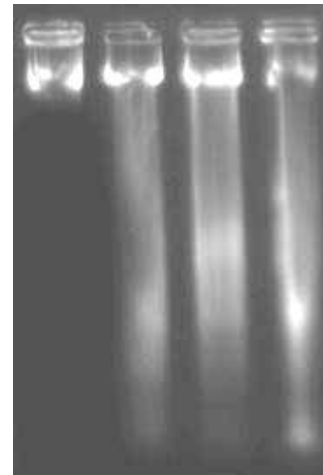
نام ترکیب	گروه R	غلظت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
4t-CHQ		۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
		۱۰۰	۸۱.۹±۰.۱۲	۸۴.۹±۱.۲	۸۹.۷±۰.۲
		۱۲۰	۷۲.۲±۰.۵	۷۶.۹±۲.۲	۸۲.۳±۰.۸۷
		۱۴۰	۶۷.۱±۰.۷	۷۱±۰.۶	۷۵.۹±۱.۱۲
		۱۶۰	۵۳.۵±۲.۲	۶۰.۷±۰.۱۲	۷۰.۴±۱.۱۴
		۱۸۰	۴۹.۲±۰.۲	۵۵±۰.۷۵	۶۰.۴±۰.۷۴
		۲۰۰	۴۳.۵±۱	۴۸.۴±۲.۱	۵۴.۸±۰.۳۴
		۲۵۰	۳۶.۸±۰.۳	۴۴.۱±۱.۶	۴۸.۶±۱
		۲۸۰	۳۴.۸±۰.۸۱	۴۰.۸±۰.۹	۴۳.۳±۰.۲۵
۳۰۰	۳۳.۴±۰.۲۱	۳۶.۲±۱.۷	۴۰.۹±۰.۶۸		
4-CHQ		۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
		۱۰۰	۹۲.۲±۱.۷	۹۷.۷±۰.۸۶	۹۹.۲±۰.۱۴
		۱۲۰	۸۰.۹±۲.۳	۹۲.۳±۰.۲۱	۹۶.۹±۰.۸
		۱۴۰	۶۹.۶±۰.۸۹	۸۶.۹±۱.۱۹	۸۹.۸±۱.۱۲
		۱۶۰	۵۹.۸±۱.۷	۷۸.۹±۰.۷۶	۸۳.۷±۲.۸
		۱۸۰	۵۶±۰.۴۵	۶۹.۴±۱.۲۷	۸۰.۷±۱.۸
		۲۰۰	۵۳.۶±۱.۱۳	۶۱.۲±۲.۷	۷۸±۰.۸
		۲۵۰	۴۹.۲±۲.۱	۵۸.۴±۰.۳	۷۳.۴±۰.۱۶
		۲۸۰	۴۷.۱±۰.۹۶	۵۱±۰.۹	۶۸.۸±۰.۷۴
۳۰۰	۴۴.۳±۲.۱	۴۶.۹±۱.۷	۵۱.۴±۲.۱۵		
4-CPQ		۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
		۱۰۰	۸۸.۷±۲.۶	۹۲.۴±۲.۵	۹۷±۰.۹۶
		۱۲۰	۸۰.۲±۱.۱	۸۶.۶±۱.۷	۹۲.۱±۲.۵
		۱۴۰	۷۲.۹±۲.۳	۸۳.۹±۰.۵۱	۸۹.۸±۱.۷
		۱۶۰	۶۹±۰.۵۶	۷۷.۶±۲.۱	۸۳±۰.۷۶
		۱۸۰	۶۶.۶±۰.۸۵	۷۲.۵±۰.۲۵	۷۸.۵±۱.۸
		۲۰۰	۵۸.۲±۱.۵	۶۵.۲±۲.۵	۷۱.۲±۲.۳
		۲۵۰	۵۰.۹±۰.۸	۵۶.۱±۱.۸	۶۱.۹±۱.۱
		۲۸۰	۴۸.۱±۲.۳	۵۱.۴±۱.۷	۵۹±۰.۷۸
۳۰۰	۴۵.۳±۰.۷۵	۴۶.۱±۲.۹	۵۰.۶±۲.۳		

مقادیر ارائه شده در جدول به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (SD) می باشد.



شکل ۴: تغییرات مورفولوژی سلولهای K562 تیمار شده با ترکیبات بنزن سولفامید کوبینازولین. تصویر میکروسکوپ نوری از سلولهای K562 تیمار شده با ترکیبات کوبینازولین (در غلظت IC50 در مقایسه با کنترل بعد از ۴۸ ساعت (الف)). تصویر میکروسکوپ فلورسینس از سلولهای K562 جهت بررسی وقوع آپتوز بعد از ۴۸ ساعت از تیمار سلولها با غلظت IC50 از ترکیبات کوبینازولین (ب). A: کنترل، B: 4t-CHQ، C: 4-CPQ و D: 4-CHQ

C 4-CPQ 4t-CHQ 4-CHQ



شکل ۳: اثرات مشتقات بنزن سولفامید کوینازولین بر قطعه قطعه شدن DNA در سلولهای K562. سلولهای K562 با ترکیبات بنزن سولفامید کوینازولین 4t-CHQ، 4-CHQ و 4-CPQ با غلظتهای IC50 تیمار شدند و اثرات آپتوزی آنها پس از ۴۸ ساعت بوسیله قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز بررسی گردید.

بحث

در مطالعه حاضر ما نقش احتمالی ترکیبات جدید بنزن سولفامید کوینازولین را بر روی رده سلولی K562 از سرطان لوسمی انسانی را تعیین کردیم. توسعه داروهای جدید برای درمان سرطان بر پایه توانایی این ترکیبات برای متوقف کردن تکثیر سلولی و القاء آپتوز می باشد (۲۷). هسته مرکزی کوینازولین در بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله در سرطان، القاء آپتوز، مهار توپوایزومراز و مهار فعالیت تیروزین کینازی درگیر می‌باشند (۲۸). برخی ترکیبات مشتق شده از کوینازولین در مطالعه آزمایشی بر روی رده سلولی MCF-7 از سرطان سینه و رده HePG2 از سرطان کبد و HCT-8 از سرطان کولون آزمایش شده‌اند و خاصیت آنتی توموری آنها مشخص شده است (۲۹). همچنین فعالیت کشندگی بعضی از مشتقات سنتزی کوینازولین بر روی سه رده سرطان MDA-MB-231 از سرطان سینه، HT-29 از سرطان کولون و T-24 از سرطان مثانه مورد ارزیابی قرار گرفته است (۲۸). نتایج بدست آمده از آزمایش‌های حاضر نشان می‌دهد که هر سه مشتق جدید باعث کشته شدن سلول‌های K562 به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌شوند به طوریکه IC50 ترکیب 4t-CHQ بعد از گذشت ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۵۰، ۲۰۰ و ۱۸۰ میکرومولار می‌باشند که نشان دهنده این موضوع است که بعد از گذشت زمان میزان IC50 به طور معنی داری کاهش یافته است (شکل ۱ و جدول ۱). با توجه به اینکه ساختار پایه‌ای در این ترکیبات یکسان می‌باشد بنابراین میزان اثر این داروها وابسته به استخلاف آنها است با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد در صورتی که این استخلاف یک حلقه پنج ضلعی سیکلوپنتان (ترکیب 4-CPQ) باشد فعالیت آن پایین می‌باشد. همچنین اگر به جای گروه R یک حلقه شش ضلعی سیکلو هگزان (4-CHQ) قرار بگیرد فعالیت سیتوتوکسیک آن نسبت به ترکیب دارای حلقه سیکلو پنتان افزایش معنی داری نخواهد کرد (تغییر زیادی نمی‌کند) ولی اگر بر روی حلقه سیکلو هگزان گروه‌های متیل قرار

بگیرد فعالیت ضد توموری آن افزایش می‌یابد. به طوریکه در ترکیب 4t-CHQ که دارای سه گروه متیل بر روی حلقه سیکلو هگزان خود می‌باشد باعث شده است که IC50 آن در طی ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر ۲۰۰، ۲۵۰ و ۱۸۰ میکرومولار شود که از دو ترکیب دیگر که هیچ گروه متیلی نداشتند فعالیت کشندگی بیشتری دارد. این نتایج نشان می‌دهد ساختار و عملکرد این ترکیبات به هم وابسته می‌باشد. تصاویر گرفته شده از میکروسکوپ نوری معکوس و فلورسنس تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های کنترل و تیمار شده را به خوبی نشان می‌دهند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری سلول‌های کنترل شکل کروی و شفاف خود را حفظ کرده‌اند در حالی که سلول‌های تیمار شده با ترکیبات بنزن سولفامید کوینازولین بر اثر تنش وارد شده به آنها تغییر شکل داده و کوچکتر شده‌اند و نهایتاً متلاشی شده‌اند و لاشه‌های سلولی در تصاویر برگرفته از میکروسکوپ نوری مشخص می‌باشد. همچنین تصاویر میکروسکوپ فلورسنس نشان می‌دهد که سلول‌های کنترل به دلیل اینکه تمامیت غشایی خود را حفظ کرده‌اند به صورت کاملاً سبز درخشان مشاهده می‌شوند در حالی که پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با ترکیبات بنزن سولفامید کوینازولین با غلظت IC50 کروماتین آنها قطعه قطعه شده است و باعث شده است بعضی از آنها که در مراحل اولیه آپتوز می‌باشند به صورت ذرات سبز رنگ دیده شوند ولی آنهایی که در مراحل انتهایی آپتوز می‌باشند رنگ نارنجی را به خود گرفته‌اند (شکل ۲). همچنین با استفاده از الگوی ژنومی DNA (آزمون قطعه قطعه شدن DNA) که یک روش کیفی برای تشخیص آپتوز می‌باشد همراه با داده‌های مربوط به میکروسکوپ فلورسنس می‌توان نتیجه گرفت این ترکیبات باعث القاء مرگ از نوع آپتوز در سلول‌های K562 می‌شوند. گزارش شده است که برخی از ترکیبات مشتق شده از کوینازولین دارای اثرات کشندگی در رده سلولی HeLa و B16 می‌باشند. این ترکیبات در غلظت‌های میکرومولار باعث القای تغییرات مورفولوژیکی و نکروز در رده سلولی B16 می‌شوند و در غلظت‌های نانو مولار باعث ایجاد تغییرات در رشته‌های F-اکتین شده ولی باعث تغییر در چرخه سلولی و القای آپتوز در رده B16 نشدند. این در حالی است که این ترکیبات در سلول‌های NIH-3T3 فیروبلاستی و در رده L1210 از لوسمی موشی باعث القاء تغییرات مورفولوژیکی، تغییر چرخه سلولی و همچنین القاء آپتوز و فعال شدن کاسپاز ۳ گردید (۳۰، ۲۹). این نشان از تخصصی عمل کردن (به شکل وابسته به سلول) ترکیبات کوینازولین دارد.

نتیجه گیری

همانند نتایج قبلی از ترکیبات کوینازولین، در این تحقیق مشخص گردید که ترکیبات جدید بنزن سولفامید کوینازولین نیز به صورت وابسته به غلظت و زمان باعث مرگ سلول‌ها از طریق آپتوز می‌شوند. همچنین مشخص شد که میزان سمیت آنها وابسته به استخلاف متصل به هسته مرکزی آنها می‌باشد. بنابراین در صورت افزایش استخلاف‌های جدید در موقعیت‌های متفاوت این ترکیبات می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تحقیقات بیشتر در زمینه شیمی دارویی باشند.

برخود لازم می دانند بدینوسیله مراتب تشکر خود را از جناب آقای دکتر طباطبایی و دیگر همکاران ابراز نمایند.

تقدیر و تشکر

حمایت مالی این کار از محل طرح پژوهشی و پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت گرفته و نویسندگان

References

- Sporn MB. The war on cancer: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **833**: 137-146.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug Discovery from medicinal plants. *Life Sci* 2005; **78**: 431-441.
- Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Crit Rev Oncol Hemat* 2006; **57**: 145-164.
- Moosavi MA, YazdanparastR, Lotfi A. ERK1/2 inactivation and p38 MAPK-dependent caspaseactivation during guano sine 5-triphosphate-mediated terminal erythroid differentiation of K562 cells. *Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 1685-1697.
- Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol* 2003; **40**: 4-10.
- Mathilde JS, Michel L. Maturation sensitive and resistant t (15; 17) K562 cell lines as tools for APL pathophysiology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. *Oncogene* 2001; **20**: 7287-7291.
- 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**: 175-182.
- Subhashini J, Suranen VK, Madhava C, Reddy M, Rachamalla A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 453-462.
- Pulido MD, Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* 2003; **533**: 227-241.
- Kam PC, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anesthesia* 2000; **55**: 1081-1093.
- Cheung H, Liu X, Rennert OM. Apoptosis: Reprogramming and the Fate of Mature Cells. *Cell Biology* 2012; **8**: 1-8.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**: 770-776.
- Anazetti MC, Melo PS, Duran N, Haun M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology* 2003; **188**: 261-274.
- Marin D. Management of the New Patient with CML in Chronic Phase. *Curr Hematol Malig Rep* 2013; **8**: 37-42.
- Wong S, Mc Laughlin J, Cheng D, Witte ON. Cell context-specific effects of the BCR-AB oncogene monitored in hematopoietic progenitors. *Blood* 2003; **101**: 4088-4097.
- Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 1993; **53**: 747-754.
- Carmen AJ, Carlos M. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 1st ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands 2008; PP: 1-8.
- Dogan HN, DuranA, Rollas S. Synthesis and preliminary anticancer activity of new 1H-4, 5-dihydro - 3 - (3-hydroxy-2-naphthyl) - 4 - substituted- 1, 2, 4- triazolone -5 - thiones.part II. *Indian J Che* 2005; **44**: 2301-2307.
- Selvam TP, Kumar PV. Quinazoline Marketed drugs. *Res in Phar* 2011; **1**: 1-21.
- El-Hashash MA, Guirguis DB, El-Badry YA. Synthesis and evaluation of new 2, 3- and 2, 4-disubstituted quinolone derivatives as potential antibacterial and antifungal agents. *Der Pharma Chemica* 2011; **3**: 147-159.
- Shen H. Illustrated Pharmacology Memory Cards. *Phar Mnemonics* 2008; **13**: 17-24.
- Raymond E, Faivre S, Armand J. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs Suppl* 2000; **1**: 15-23.
- Harvey KA, Whitley Z, Davisson VJ, Siddiqui RA. Characterization of anticancer properties of 2, 6-diisopropylphenol-docosahexaenoate and analogues in breast cancer cell. *Bioorg Med Chem* 2010; **18**: 1866-1874.
- Herr E, Domeneghini CL, Cordova AS, José Nune R, Augusto Yunes R, Creczynski-Pasa TB. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. *Bioorg Med Chem* 2010; **18**: 8026-8034.
- Mahdavi M, Yazdanparast R. Gnidilatimonoein from *Daphne mucronata* Induces Differentiation and Apoptosis in Leukemia Cell Lines. *Arch Pharm Res* 2007; **30**: 1177-1181.
- Kotamraju S, Hogg N, Joseph J, Keefer K, 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**: 17316-17323.
- Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; **98**: 2603-2610.
- Cubedo E, Cordeu L, Bandres E, Rebollo A, Malumbres R. New Symmetrical Quinazoline Derivatives Selectively Induce Apoptosis in Human Cancer Cells. *Cancer Biol Ther* 2006; **5**: 850-859.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst* 1991; **83**: 757-766.
- Jantova S, Letasiova S, Repicky A, Ovadekova R, Lakatos B. The effect of 3-(5-nitro-2-thienyl)-9-chloro-5-morpholin-4-yl [1,2,4] triazolo [4,3-c] quinolone on cell growth, cell cycle, induction of DNA fragmentation, and activity of capsized 3 in murine leukemia L1210 cells and fibroblast NIH-3T3 cells. *Cell Biochem Funct* 2006; **24**: 519-530.