مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره پانزدهم/ تابستان ۱۳۸۹/ ۶۳-۵۱

القاء آپوپتوز و مهار چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S در سلول‌های K562 لوسمی میلوئید مزمن انسانی توسط آدنوزین ۵ٰ- تری فسفات از طریق تجزیه آن به آدنوزین

سید محمد امین موسوی[۱]، امیر حسین احمدی[۲]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (مؤلف مسؤول)، تلفن: ۳۳۹۲۲۴۶-۰۴۱۱

moosav_m@tabrizu.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: آدنوزین ۵ٰ- تری فسفات (ATP) نه تنها به عنوان منبع رایج انرژی در تمامی سلول‌ها به شمار می‌رود، بلکه در تحریک مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی نیز که منجر به آپوپتوز و یا تمایز می‌شود نیز، نقش ایفا می‌کند. در طول سالیان گذشته گزارش‌های متعددی دربارهٔ اثرات ضد سرطانی این ترکیب بر رده‌های سلولی سرطان‌های مختلف ارائه شده است. همچنین چندین مکانیسم در مورد نحوهٔ عملکرد ATP ارائه شده است و به نظر می‌رسد مکانیسم اثر ATP تا حدود زیادی بستگی به نوع سلول هدف دارد. در مطالعهٔ حاضر اثرات ATP و مکانیسم عمل آن بر ردهٔ سلولی K562 به عنوان مدلی برای لوسمی میلوئید مزمن (CML) مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: ردهٔ سلولی K562 انسانی پس از کشت، تحت تأثیر ATP در غلظت و فاصله‌های زمانی مختلف قرار گرفت. اثرات ATP بر رشد سلول‌های K562 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. برای بررسی آپوپتوز از روش‌های فلوسایتومتری و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. محتوای DNA و چرخهٔ سلولی با دستگاه فلوسایتومتر مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی مکانیسم اثر ATP اثرات ATPγS (آگونیست غیر قابل تجزیهٔ ATP) و نوکلئوتیدهای حاصل از تجزیهٔ ATP (آدنوزین، ADP و AMP) بر روی سلول‌های K562 مطالعه شد. از دی پریدامول برای بررسی ورود آدنوزین به داخل سلول و از یوریدین برای بررسی القاء قحطی پیریمیدینی استفاده شد.

یافته‌ها: داده‌های حاصل از مطالعهٔ ما نشان داد که ATP در فواصل زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت و در غلظت‌های بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار سبب مهار رشد و توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S گردید. این اثرات ATP به وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز منجر گردید. همچنین مطالعهٔ مکانیسم عمل ATP در سلول K562 نشان داد که این نوکلئوتید از طریق تبدیل به آدنوزین و سپس القاء قحطی پیریمیدینی اثرات خود را اعمال می‌کند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعهٔ حاضر، از آنجایی که روش‌های درمانی کنونی CML که بیشتر آنها مبتنی بر شیمی درمانی است تاکنون چندان مؤثر واقع نشده‌اند و همراه اثرات جانبی از جمله مقاومت دارویی می‌باشند، ATP با توجه به خاصیت‌های قوی مهار رشدی و القاء آپوپتوز در سلول‌های K562، می‌تواند به عنوان ترکیبی مؤثر در درمان این لوسمی به صورت یک دارو و یا در ترکیب با داروهای دیگر مد نظر قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: ATP، آپوپتوز، آدنوزین، لوسمی میلوئید مزمن، K562

وصول مقاله: ۸۹/۳/۱۹ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۵/۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۱۲

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (CML) به دلیل یک جابه جایی دو طرفه بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چند توان ایجاد می‌شود (۲و۱). انکوژن Bcr-Abl حاصل از این جابه جایی، پروتئین $p210^{Bcr-Abl}$ را کد می‌کند که علاوه بر تکثیر بی رویه و مستقل از فاکتور رشد سلول‌های پیش ساز میلوئید باعث اختلال در مرگ طبیعی و برنامه‌ریزی شدهٔ (آپوپتوز) آنها نیز می‌شود (۲و۱).

تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، درمان با اینترفرون آلفا، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد(۳). در کنار این راهکارها استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کینازی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. کاربرد یکی از این مهارکننده‌ها که به طور اختصاصی Bcr-Abl را مهار می‌کند و ایماتینب مسیلات (Imatinib mesylate) یا STI571 (با نام تجاری Gleevec) نامیده می‌شود در حال حاضر خط اول درمانی CML محسوب می‌شود (۴). به هر حال استفاده از این مهارکننده‌ها نیز با برخی اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی همراه است که اشاره به این دارد که هیچ یک از روش‌های درمانی فعلی منجر به درمان قطعی CML نگردیده است. لذا تلاش برای یافتن ترکیباتی که توانایی تومورکشی بیشتر و اثرات جانبی کمتر داشته باشند ادامه دارد. در این میان استفاده از نوکلئوتیدهای آدنین‌دار می‌تواند راهگشا باشد (۵). نوکلئوتیدهای آدنین دار خارج سلولی اثرات فیزیولوژیک متعددی را از خود بروز می‌دهند که از آن جمله می‌توان به مهار تجمع پلاکت‌ها، اثرات قلبی عروقی و دخالت در انتقال پیام‌های عصبی اشاره کرد (۵). در سالیان اخیر توجه وافری به اثرات ضد سرطانی نوکلئوتیدها جلب شده است، که از مهمترین آنها می‌توان به اثرات مؤثر آدنوزین ۵ٰ- تری فسفات (ATP) بر سلول‌های سرطانی اشاره کرد (۶). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که ATP دارای اثرات مهار رشدی و یا حتی کشندگی علیه بسیاری از رده‌های سلولی پستانداران مانند فیبروبلاست‌های سرطانی موش، سلول‌های لنفوما، برخی موارد لوسمیک، سلول‌های کارسینومای پانکراس، سلول‌های سرطان سینه و سلول‌های کارسینومای پوست می‌باشد (۶). از آنجایی که سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی در مقابل ATP حساس‌تر می‌باشند، درمان با ATP به عنوان راهکاری مناسب مورد توجه قرار گرفته است (۶). در سال ۱۹۹۸ انجام یک آزمایش مرحله دو کلینیکی در بیمارانی که از سرطان پیشرفتهٔ ریه رنج می‌بردند نشان داد که ATP دارای اثرات مفیدی بوده به طوری که در دو سوم بیماران سبب پایداری در وضعیت بیماری گردیده است (۷). تاکنون مکانیسم‌های مختلفی برای اثرات ATP ارائه شده است و به نظر می‌رسد مکانیسم‌های اثر آن تا حدود زیادی وابسته به نوع سلول مورد مطالعه باشد (۶). از جملهٔ این مکانیسم‌ها القاء مسیرهای پیام رسانی از طریق گیرنده‌های سطح سلولی پورینی P2 می‌باشد (۸). این گیرنده‌ها به دو زیر خانواده‌ی P2X (شامل ۷ نوع گیرنده) و P2Y (شامل ۸ نوع گیرنده) طبقه‌بندی می‌شوند که فعال شدن هر یک اثرات متفاوتی چون آپوپتوز، تمایز یا حتی تکثیر سلولی را به دنبال دارد (۸). به عنوان مثال ATP با فعال کردن گیرندهٔ سطح سلولی $P2X_7$ سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی A375 ملانومای انسان و یا PC-3 سرطان پروستات

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

می‌شود (۸). علاوه بر اثر ATP از طریق گیرنده‌های سطح سلولی و مسیرهای پیام رسانی، برخی مطالعات اثرات این نوکلئوتید را از طریق محصولات حاصل از تجزیه‌ی متابولیکی آن می‌دانند (۹). وجود اکتونوکلئوتیدازها در سطح غشای سلولی و یا در محیط بین سلولی سبب هیدرولیز ATP به محصولاتی چون آدنوزین´ ۵-دی فسفات (ADP)، آدنوزین´ ۵-مونو فسفات (AMP) و آدنوزین می‌شود. در برخی مطالعات اثرات ATP به واسطه‌ی تجزیه‌ی آن به آدنوزین گزارش شده است (۱۰و۶). به هر حال در یک سلول همه‌ی این مسیرها می‌تواند با هم رخ دهد و یا یکی از آنها اتفاق بیافتد (۶). با توجه به وجود زمینه‌هایی در مورد نقش ATP در مهار رشد سرطان‌های مختلف و کارکرد احتمالی بالینی آن، هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی مکانیسمی اثرات ATP بر ردهٔ سلولی K562 به عنوان مدلی برای CML می‌باشد، تا راه را برای کاربرد احتمالی بالینی آن هموارتر نماید.

روش بررسی

مواد

محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Biosera انگلستان تهیه شد. فلاسک‌های کشت سلول و ظروف ۲۴ و ۹۶ چاهکی استریل از شرکت SPL life science کره جنوبی خریداری شد. آدنوزین´ ۵-تری فسفات (ATP)، آدنوزین´ ۵-دی فسفات (ADP)، آدنوزین´ ۵-مونو فسفات (AMP)، آدنوزین (Adenosine)، دی پریدامول (Dipyridamole)، یوریدین (Uridine)، آدنوزین´ ۵-تری-o-۳-تیو تری فسفات[1] (ATPγS) و پروپیدیوم یودید (Propidum iodide) از شرکت سیگما-آلدریش آمریکا خریداری گردید. اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[2] (EDTA)، سدیم دودسیل سولفات[3] (SDS)، تریس (Tris-HCl) از شرکت Merck خریداری شدند. آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین از سیناژن (تهران-ایران) تهیه شدند. نمک تترازولیوم MTT [4] از شرکت Roche applied science آلمان خریداری گردید.

ردهٔ سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI 1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی(FBS) ۱۰٪ و آنتی بیوتیک‌های استروپتومایسین (۱۰۰µg/mL) و پنی‌سیلین (U/mL ۱۰۰) بود، استفاده گردید. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، رطوبت ۹۵٪ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سلول‌ها هر سه روز یکبار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند.

آزمون تکثیر و زیستایی سلولی

برای بررسی تکثیر و زیستایی از آزمون MTT استفاده شد. این آزمون که نوعی آزمون رنگ سنجی محسوب می‌شود بر پایهٔ شکسته شدن نمک تترازولیوم MTT زرد به کریستال‌های فورمازان بنفش توسط سلول‌هایی می‌باشد که از نظر متابولیکی فعال هستند. این احیاء سلولی با دخالت کوفاکتور نوکلئوتید پیریدین NADH و NADPH و دهیدروژنازهای میتوکندریایی صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازانی که تشکیل می‌شوند قابل حل شدن هستند و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند با استفاده از اسپکتروفتومترهای چند

1. Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate

2. Ethylenediaminetetraacetic acid
3. Sodium dodecyl sulfate
4. [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

چاهکی به طور کمی بررسی شود. به منظور انجام این آزمون ابتدا تعداد 10^3 سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از گذشت ۲٤ ساعت سلول‌ها برای زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و غلظت‌های مختلف مورد تیمار قرار گرفتند. با فرا رسیدن زمان‌های مختلف پس از تیمار، میزان ۱۰ µL از نمک MTT (Roche-آلمان) به درون هر چاهک اضافه شد. سپس به مدت ٤ ساعت فرصت داده شد تا واکنش تبدیل MTT به فورمازان انجام گیرد. پس از طی ٤ ساعت ۱۰۰ µL از بافر حل کننده (Roche-آلمان) برای لیز سلول‌های موجود و حل کردن کریستال‌های فورمازان تولید شده استفاده شد. پس از گذشت یک شب جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر چند چاهکی در طول موج ۵۱۰ nm مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل چرخهٔ سلولی

جهت بررسی چرخهٔ سلولی و محتوای DNA سلول‌های تیمار شده از دستگاه فلوسایتومتر استفاده شد. به این منظور سلول‌ها در ظروف ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد و با غلظت‌های متفاوت دارو و برای زمان‌های مختلف تیمار گردیدند. بعد از جمع‌آوری و سانتریفیوژ در دور ۸۰۰g، سلول‌ها با PBS سرد شستشو و توسط اتانول ۷۰٪ تثبیت گردید. این سلول‌ها تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای بررسی مراحل چرخه سلولی، نمونه‌های کنترل و تیمار شده را به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰ میلی گرم پروپیدیوم ایودید (PI) و ۲۰ میلی‌گرم RNase (حل شده در ۱ میلی‌لیتر PBS) مخلوط کرده و توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردیدند (۱۱). دستگاه فلوسایتومتر از نوع Partec مدل Pas و ساخت کشور آلمان می‌باشد. با استفاده از نرم افزار خاص دستگاه، درصد جمعیت سلولی در مراحل G1، S و G2/M مشخص شد.

مطالعه آپوپتوز با میکروسکوپ فلورسنت

وقوع آپوپتوز با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک تحت تأثیر بافر لیزکننده Tris-HCl EDTA 10 mM, SDS 0.1 $^{W}/_{V}$, 10 mM, (pH 7.4)]] قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ DNA با استفاده از ترکیب فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل جداسازی شد. DNA جداسازی شده با اتانول مطلق و NaCl ۵ مولار به مدت یک شب رسوب داه شد. در نهایت رسوب DNA در بافر TE (Tris-HCl, 10 EDTA 10 mM) حل شد و روی ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ۱۰ ولت بارگذاری (Load) شد.

نوع مطالعه وتجزیه و تحلیل داده‌ها

در مطالعه پژوهشی حاضر که تجربی-آزمایشگاهی می‌باشد، مقایسه میزان رشد و زیستایی بین سه گروه از سلول‌های تحت تیمار ATP که هر گروه شامل ۵ غلظت متفاوت از ATP می‌شد با سه گروه از سلول‌های تیمار نشده در شرایط آزمایشگاه صورت گرفت. از آزمون‌های آنالیز واریانس و t-test برای یافتن اختلافات معنادار استفاده گردید که در این آزمون‌ها داده‌هایی با $p<0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ATP سبب مهار رشد و القاء مرگ در سلول‌های K562 می‌شود

داده‌های به دست آمده از آزمون MTT نشان داد که ATP دارای اثرات مهار رشدی بر روی سلول‌های K562 می‌باشد (نمودار ۱). همانطور که در نمودار ۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

مشاهده می‌شود اثر مهار رشدی ATP وابسته به غلظت می‌باشد به طوریکه مثلاً میزان مهار رشد در ۷۲ ساعت و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار به ترتیب ۲۹٪، ۳۹٪، ٤۳٪، ۵۲٪ و ۵۸٪ بود. همچنین اثرات ATP وابسته به زمان نیز می‌باشد به طوریکه به عنوان مثال در غلظت ۵۰۰ میکرومولار میزان مهار رشد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳۰٪، ۴۵٪ و ۵۸٪ بود.

ATP سبب توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S می‌شود

از آنجایی که تغییر و مهار چرخهٔ سلول عموماً پیش مقدمه اکثر فرایندها از جمله مهار رشد و مرگ سلولی می‌باشد، لذا اثرات **ATP** بر چرخهٔ سلولی سلول‌های تیمار شده نیز بررسی گردید. نتایج نشان داد که سلول‌های تیمار شده با ATP در غلظت ۵۰۰ میکرو مولار با گذشت زمان، در مقایسه با سلول‌های کنترل، توقف چشمگیر چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S را نشان داد (شکل ۱)، به عنوان مثال در میان سلول‌های کنترل، سلول‌های موجود در مراحل G_1، S و G_2 به ترتیب ۶۰٪، ۲۴٪ و ۱۶٪ از جمعیت کل سلولی را تشکیل می‌دادند در حالی که این مقادیر برای سلول‌های تیمار شده با ATP به مدت ۲۴ ساعت به ترتیب معادل ۴۸٪، ۳۴٪ و ۱۸٪، در ۴۸ ساعت معادل ۳۲٪، ۶۰٪ و ۳٪ و در ۷۲ ساعت معادل ۲۷٪، ۳۰٪ و ۵٪ بود (شکل ۱). این داده‌ها نشان داد که ATP سبب توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S شده است. در ضمن در ۷۲ ساعت ۳۸٪ از جمعیت سلولی در بازهٔ قبل از مرحلهٔ G_1 (sub-G_1 peak) مشاهده شدند. وجود این پیک نشان‌دهندهٔ وقوع آپوپتوز می‌باشد. به این ترتیب نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های K562 در اثر ATP دچار آپوپتوز پس از توقف در مرحلهٔ S (Post S-phase arrest apoptosis) شده‌اند.

ATP سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود

اگرچه داده‌های حاصل از بررسی محتوای DNA و چرخه‌ی سلولی به روش فلوسایتومتری (شکل ۱) نشان داد که ATP به احتمال قوی سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود با این وجود و به منظور تایید بیشتر موضوع از آزمون قطعه قطعه شدن DNA نیز استفاده گردید. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است ATP سبب تغییر در الگوی DNA ژنومی سلول‌های K562 در قیاس با کنترل شد به طوریکه DNA ژنومی در سلول‌های تیمار شده با ATP به صورت لکه (smear) بر روی ژل مشاهده گردید که نشان دهندهٔ قطعه قطعه شدن DNA ژنومی می‌باشد.

اثر ATP در مهار رشد سلول‌های K562 مستقل از گیرنده‌ی $P2X_7$ می‌باشد

به منظور بررسی مکانیسم اثر ATP احتمال دو مکانیسم عمدهٔ مورد اشاره در مقدمه مورد بررسی قرار گرفت. به عبارت دیگر این که ATP از طریق گیرنده‌های سطح سلولی اثرات خود را القاء می‌کند یا تجزیهٔ متابولیکی آن از طریق اکتو آنزیم‌های متصل به غشا و یا موجود در محیط کشت مکانیسم اصلی اثرات ATP را به عهده دارند مورد بررسی قرار گرفت.

بدین منظور از ATPγS که آگونسیت تجزیه ناپذیر ATP به شمار می‌رود برای سنجش این مطلب که آیا اثر ATP به واسطهٔ تجزیهٔ آن می‌باشد یا خیر استفاده شد. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود ATPγS در مقایسه با ATP اثرات مهار رشدی کمتری از خود نشان داد. به عنوان مثال بعد از ۷۲ ساعت و بر اساس آزمون MTT میزان مهار رشد در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار ATPγS به ترتیب ٦٪، ۸٪، ١٦٪ و ۲۰٪ می‌باشد که این میزان در مقایسه با غلظت‌های مشابه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

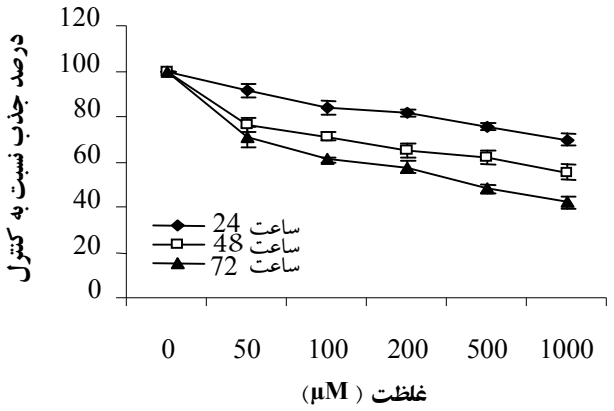
ATP در ۷۲ ساعت یعنی ۲۹٪، ۳۷٪، ۴۲٪ و ۵۲٪ به طور معنادار ($p<۰/۰۵$) کمتر است (نمودار ۳). این داده‌ها نشان داد که حداقل بخشی از اثرات ATP در سلول‌های K562 به واسطه‌ی هیدرولیز آن بوده است نه از طریق گیرنده‌های سطح سلولی. ذکر این نکته بسیار حائز اهمیت است که سلول‌های K562 فاقد گیرندهٔ اصلی خارج سلولی اثرات ATP (یعنی گیرندهٔ $P2X_7$) می‌باشند که خود توجیهی بر عدم کارایی ATPγS بر این سلول‌هاست. برای مشخص شدن دقیق‌تر این فرضیه و تعیین این موضوع که اثر ATP به واسطهٔ نوکلئوتیدهای حاصل از تجزیهٔ آن (ADP، AMP) یا آدنوزین است آزمایشی طراحی شد تا اثرات ADP، AMP و آدنوزین بر روی این ردهٔ سلولی مورد مطالعه قرار گیرد. به این منظور اثر ATP، ADP، AMP و آدنوزین در دو حالت محیط کشت دارای FBS غیر فعال شده با حرارت[1] (۱ ساعت در دمای ۵۹ درجهٔ سانتی‌گراد) و محیط کشت دارای FBS فعال (حرارت نیافته) بر روی ردهٔ سلولی K562 مورد ارزیابی قرار گرفت. خصوصیت محیط کشت غیر فعال شده با حرارت اینست که آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ATP در آن فاقد فعالیت هستند و به این ترتیب اگر اثر ATP به واسطهٔ تجزیهٔ آن باشد در محیط کشت حاوی FBS غیر فعال شده با حرارت اثرات ATP کمتر خواهد شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در محیط کشت حاوی FBS فعال هر چهار مولکول ATP، ADP، AMP و آدنوزین دارای اثرات مهار رشدی بر سلول‌های K562 بودند این درحالیست که در محیط کشت حاوی FBS غیر فعال شده با حرارت تنها آدنوزین دارای اثرات مهار رشدی معنادار ($p<۰/۰۵$) در قیاس با کنترل بوده است و مولکول‌های ATP، ADP و AMP اثرات مهار رشدی از خود نشان نداده‌اند. این نتایج به طور واضح نشان داد که قسمت عمدهٔ اثرات ATP در سلول‌های K562 به سبب تبدیل آن به آدنوزین بوده است. به منظور تأیید بیشتر موضوع و اینکه آدنوزین چگونه واسطه‌گری اثرات ATP را بر عهده دارد آزمایش زیر طراحی گردید. این آزمایش بر مطالعاتی استوار است که اشاره دارند آدنوزین می‌تواند با تأثیرگذاری بر گیرنده‌های سطح سلولی از جمله گیرندهٔ A_3 و یا با ورود به سلول و القاء قحطی پیریمیدینی اثر مهار رشدی و آپوپتوزی خود را القاء نماید. به این ترتیب برای تعیین مکانیسم عملکرد آدنوزین در سلول‌های K562 از مهارکنندهٔ دی پریدامول (Dipyridamole) که بر هم زنندهٔ عملکرد ناقلین غشایی آدنوزین در انتقال آن به داخل سلول می‌باشد استفاده شد. به این منظور سلول‌های K562 در سه گروه تیمار شده با ۲۰ µM دی پریدامول، تیمار شده با ۵۰۰ µM ATP و تیمار شده با ترکیب ۲۰ µM دی پریدامول + ۵۰۰ µM ATP به مدت ۷۲ ساعت در معرض دارو قرار گرفتند. همانطور که در نمودار ٤ نشان داده شده است، وجود دی پریدامول در محیط سبب کاهش اثرات مهار رشدی ۵۰۰ µM ATP در سلول‌های K562 از ٤٨٪ به ۲۱٪ شد. ذکر این نکته ضروری است که خود دیپریدامول در غلظت ۲۰ µM دارای ۱۱٪ اثر مهار رشدی در مقایسه با کنترل در سلول‌های K562 بوده است. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که مکانیسم عمل آدنوزین از طریق ورود به سلول بوده و گیرنده‌های سطح سلولی دخالتی در این امر نداشته‌اند.

تاکنون مکانیسم‌های مختلفی در مورد نحوهٔ عملکرد آدنوزین در داخل سلول ارائه شده است که از

1. Heat inactivated Fetal Bovine Serum

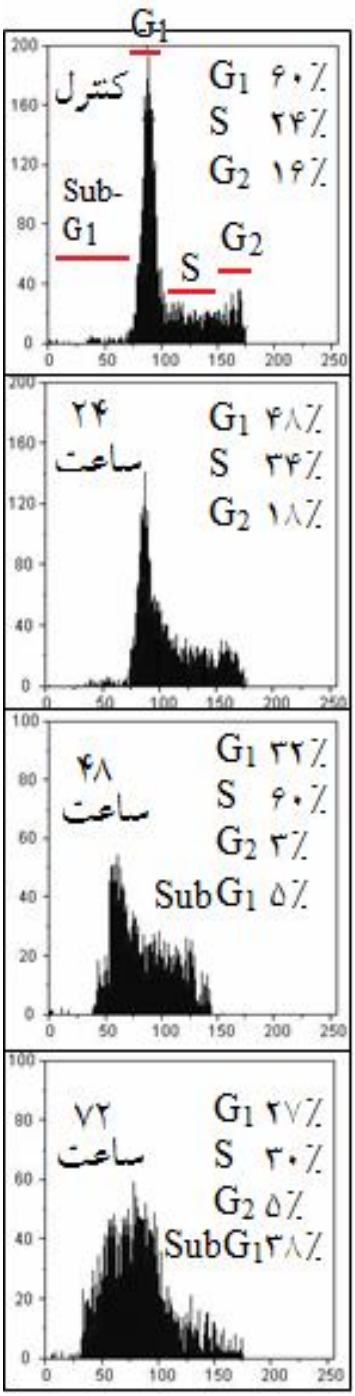
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

آن جمله می‌توان به قحطی پیریمیدینی اشاره کرد. برای تعیین چگونگی عملکرد آدنوزین در داخل سلول‌های K562 از یوریدین به عنوان تأمین‌کنندهٔ پیریمیدین سلول‌ها استفاده شد تا مکانیسم القاء قحطی پیریمیدینی توسط آدنوزین مورد ارزیابی قرار گیرد. همانطور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود یوریدین با غلظت ۵۰۰ µM خود سبب مهار رشد به میزان ۱۰٪ شد. با این حال اضافه کردن همزمان ۵۰۰ µM یوریدین به محیط کشت حاوی سلول‌های تحت تیمار ۵۰۰ µM ATP باعث از بین رفتن قابل توجه اثرات مهار رشدی ATP شد به طوریکه میزان مهار رشد از ٤٨٪ به ١٨٪ کاهش یافت.

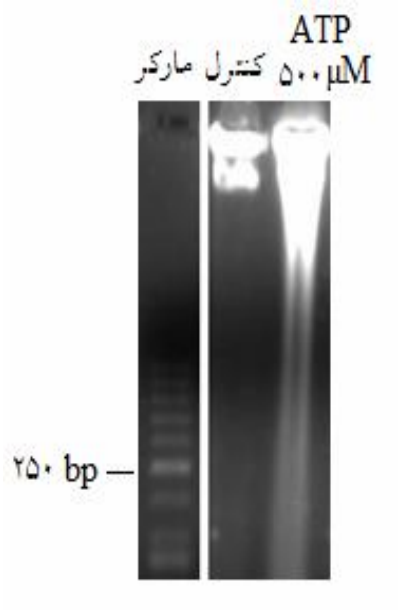


نمودار ۱: اثرات ATP بر رشد سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ATP با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اعداد به دست آمده از نمودار برای غلظت‌های ATP از نظر آماری معنادار ($p<۰/۰۵$) می‌باشند.

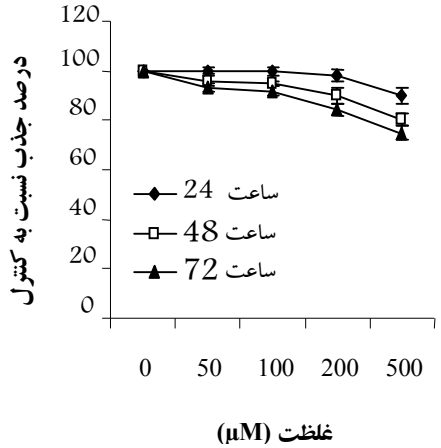
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]



شکل۱: بررسی اثرات ATP بر چرخه‌ی سلولی K562. سلول‌های K562 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت ۵۰۰ میکرو مولار ATP تیمار شد و درصد سلول‌ها در هر مرحلهٔ چرخهٔ سلولی به کمک دستگاه فلوسایتومتر مطابق مواد و روش‌ها بررسی شد.

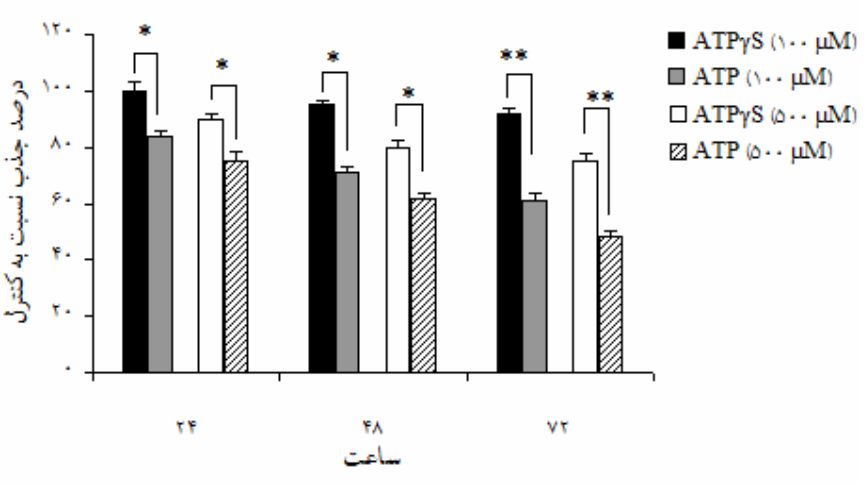


شکل۲: اثرات ATP بر قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های K562. بعد از تیمار سلول‌های K562 با ATP (۵۰۰ میکرو مولار) و بدون آن به مدت ۷۲ ساعت، DNA ژنومی استخراج شد و به کمک الکتروفورز میزان قطعه قطعه شدن DNA به عنوان شاخص آپوپتوز بررسی گردید.



نمودار ۲: اثرات ATPγS بر رشد سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ATPγS با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

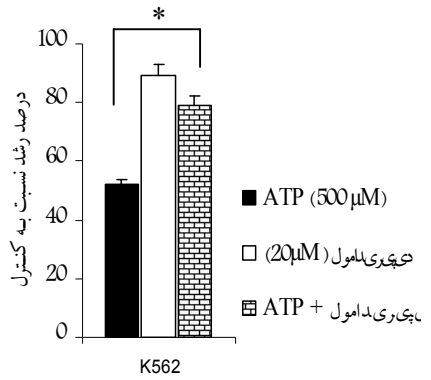


نمودار ۳: مقایسهٔ اثرات ATP و ATPγS در سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های مشابه ATP و ATPγS با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اختلاف نشان داده شده با *($p<۰/۰۰۱$) و **($p<۰/۰۰۰۱$) از نظر آماری معنادار می‌باشد.

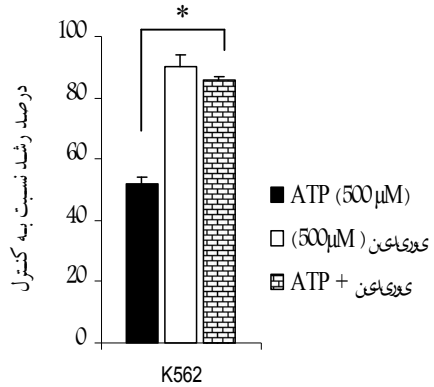
جدول ۱: مقایسهٔ اثرات ATP، ADP، AMP و Ado (آدنوزین) بر سلول‌های K562 در محیط کشت حاوی سرم فعال و غیر فعال

درصد مهار رشد نسبت به کنترل	تیمار	محیط کشت
۰	کنترل	محیط کشت فعال
۴۸±۳	ATP (۵۰۰ µM)	(محیط کشت + سرم ۱۰٪)
۵۴±۲	ADP (۵۰۰ µM)	
۵۵±۴	AMP (۵۰۰ µM)	
۴۱±۲	Ado (۵۰۰ µM)	
۰	کنترل	محیط کشت غیر فعال شده با حرارت
۱۰±۳	ATP (۵۰۰ µM)	(۵۹ °C، ۶۰ دقیقه)
۱۳±۲	ADP (۵۰۰ µM)	
۱۷±۱	AMP (۵۰۰ µM)	
۴۵±۴	Ado (۵۰۰ µM)	

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]



نمودار ٤: مقایسهٔ اثرات ATP، دی پریدامول و ترکیب ATP + دیپریدامول. سلول‌ها با غلظت ۵۰۰ میکرومولار ATP، ۲۰ میکرومولار دیپریدامول و یا ترکیب ATP و دیپریدامول با فاصلهٔ زمانی ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اختلاف نشان داده شده با *(P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنادار می‌باشد.



نمودار ۵: مقایسه‌ی اثرات ATP، یوریدین و ترکیب ATP + یوریدین. سلول‌ها با غلظت ۵۰۰ میکرومولار ATP و ۵۰۰ میکرومولار یوریدین و ترکیب ATP و یوریدین با فاصلهٔ زمانی ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. اختلاف نشان داده شده با *(P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنادار می‌باشد.

بحث

مطالعهٔ حاضر به منظور بررسی مکانیسم‌های مولکولی اثرات ATP بر یکی از رده‌های سلولی معروف لوسمی، K562 صورت پذیرفت. این ردهٔ سلولی به عنوان مدلی مناسب برای مرحلهٔ بلاست CML (Blast) و مقاوم به دارو محسوب می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که ATP سبب مهار چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S و القاء آپوپتوز در ردهٔ سلولی K562 گردید. اثر مهار رشدی نوکلئوتیدهای آدنیندار در انواع مختلف رده‌های سلولی تاکنون گزارش شده است. برای اولین بار Rapaport با بررسی اثرات ترکیباتی که سبب افزایش ذخیرهٔ ATP سلولی می‌شدند نشان داد که ATP سبب مهار همانندسازی DNA در سلول‌های سرطانی می‌شود و سبب مهار رشد چند ردهٔ سلولی سرطان پانکراس، کلون، ملانوما، روده و سینه می‌شود (۱۱). در مورد سرطان ریه نیز نشان داده شده است که ATP در غلظت-های ۰/۵ تا ۳ میلی مولار سبب مهار رشد چهار ردهٔ سلولی سرطان ریه به صورت وابسته به غلظت می‌شود و این اثر مهار رشدی همراه با تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها می‌باشد (۱۲). اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ATP و آدنوزین بر روی رده‌ی سلولی TE-13 سرطان معده نیز مشاهده شده است (۱۳). همچنین بررسی‌ها بر روی ردهٔ سلولی HT-1376 سرطان مثانه نشان می‌دهد که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

ATP قادر به مهار رشد این ردهٔ سلولی در شرایط در شیشه و in vivo می‌باشد (۱۴). داده‌های حاصله در این مطالعه مبنی بر اینکه ATP سبب توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S در ردهٔ سلولی K562 می‌شود از این جنبه که می‌تواند بیانگر علت مهار رشد سلول‌های K562 باشد مهم است. چنین اثری از ATP قبلاً نیز در موارد متعددی گزارش شده است. تجمع ATP در داخل سلول و توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S مکانیسم پیشنهادی برای اثر مهار رشدی ATP در رده‌های سلولی CAPAN-1، BxPC سرطان پانکراس، HT29 آدنوکارسینومای کلون، Hs294T ملانوما، Hs584T سرطان سینه و Hs586INT سرطان روده می‌باشد (۱۱). Spungin و همکارانش نیز نشان دادند که طولانی شدن مرحلهٔ S و توقف چرخهٔ سلولی در این مرحله سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌شود (۱۵). در بررسی ردهٔ سلولی TE-13 سرطان معده مشاهده می‌شود که ATP در غلظت ۰/۱ میلی مولار سبب توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S می‌شود (۱۳). همچنین با توجه به وجود ارتباط بین جمعیت سلول‌های موجود در مرحلهٔ S و پاسخ مثبت به شیمی درمانی، ATP از این نظر می‌تواند به عنوان یک ترکیب قابل استفاده در کنار داروهای شیمی درمانی مورد توجه قرار گیرد. در واقع این مطلب که سلول‌های مرحلهٔ S چرخهٔ سلولی حساسیت بیشتری به داروهای شیمی درمانی دارند منجر به جستجو برای یافتن ترکیباتی شده است که به chemosenstizer معروف بوده و سبب تجمع سلول‌های سرطانی در مرحلهٔ S قبل از شیمی درمانی می‌گردد (۱۶).

داده‌های به دست آمده از فلوسایتومتری و آزمون قطعه قطعه شدن DNA در مطالعهٔ حاضر نشان داد که سلول‌های K562 تیمار شده با ATP بعد از مهار چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S دچار آپوپتوز می‌شوند. القاء آپوپتوز توسط ATP تاکنون در سلول‌های مختلفی گزارش شده است. به عنوان نمونه تاکنون وقوع آپوپتوز در سلول‌های بنیادی خونی موش (۱۷)، ردهٔ سلولی Li-7A سرطان کبد (۱۰) و موارد بسیار دیگر گزارش شده است. از آنجایی که اختلال در فرایند آپوپتوز عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به شمار می‌رود و مقاومت به آپوپتوز از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی در برابر شیمی درمانی است (۱۸)، اثر ATP از این جنبه نیز حائز اهمیت می‌باشد.

تاکنون مکانیسم‌های مختلفی در مورد نحوهٔ اثر ATP ارائه شده است که مهمترین آنها عبارتند از: ۱) ATP سبب القاء قحطی پیریمیدینی وابسته به آدنوزین می‌شود (۱۹، ۲۰) ATP سبب افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی می‌شود که این مسأله به گیرندهٔ سطح سلولی $P2X_7$ نسبت داده می‌شود (۲۰).

در برخی از رده‌های سلولی مانند ردهٔ U937 لوسمی، هیدرولیز ATP به آدنوزین و القاء قحطی پیریمیدینی علت اصلی اثرات ATP معرفی شده است (۶). نتایج ما نشان می‌دهد که در مورد سلول‌های K562 نیز همین مکانیسم به عنوان علت اصلی اثرات ATP می‌تواند دخیل باشد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شد ناچیز بودن اثرات ATPγS در قیاس با ATP، اثرگذار بودن آدنوزین در میان نوکلئوتیدهای ATP، ADP، AMP و آدنوزین بر سلول‌های K562 در محیط کشت غیر فعال شده با حرارت (جدول ۱) به همراه عدم بیان گیرندهٔ سطح سلولی $P2X_7$ که گیرندهٔ اصلی سطح سلولی در القاء آپوپتوز به شمار می‌رود (۲۱)، تأیید کنندهٔ این مطلب است که ATP به واسطهٔ تجزیه به آدنوزین اثر خود را القاء می‌کند. با این حال مکانیسم

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

عمل آدنوزین در سلول‌های مختلف متفاوت است. به عنوان نمونه در برخی از انواع سلول‌ها (مانند تیموسیت موش وانسان و یا ردهٔ سلولی Li-7A سرطان کبد) آدنوزین با تحریک فعالیت گیرندهٔ سطح سلولی خود سبب القاء آپوپتوز می‌شود (۶). در مطالعهٔ ما چون: ۱) دی پریدامول به عنوان مهارکنندهٔ ناقل آدنوزین به داخل سلول سبب کاهش اثرات ATP می‌شود و ۲) استفاده از یوریدین به عنوان منبع پیریمیدین سبب کاهش اثرات ATP می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که در سلول‌های K562، آدنوزین از طریق ورود به سلول و القاء قحطی پیریمیدینی اثر مهار رشدی و آپوپتوزی خود را اعمال می‌کند. در حقیقت آدنوزین با ورود به سلول سبب مهار آنزیم PRPP سنتتاز[1] می‌شود (۲۲). این آنزیم در مسیر بیوسنتز ابتدا به ساکن[2] نوکلئوتیدهای پیریمیدینی، ریبوز-۵- فسفات و ATP را به AMP و ۵-فسفوریبوزیل-۱- پیروفسفات[3] (PPriboseP یا PRPP) تبدیل می‌کند (۲۲). به این ترتیب با مهار عملکرد این آنزیم سطح PRPP در سلول کاهش یافته و تولید نوکلئوتیدهای پیریمیدینی دچار اختلال می‌شود. با توجه به نیاز سلول به همهٔ نوکلئوتیدها برای فعالیت‌های حیاتی خود اختلال در مسیر بیوسنتز نوکلئوتیدها سبب مهار رشد و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شود (۲۲).

نتیجه‌گیری

به طور کلی داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که ATP قادر به مهار رشد و القاء آپوپتوز پس از توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ S بوده و این اثر به واسطهٔ تجزیهٔ ATP به آدنوزین و در نهایت القاء قحطی پیریمیدینی توسط آدنوزین حاصل از ATP می‌باشد. این اثرات به همراه فقدان اثرات جانبی خاص گزارش شده توسط ATP که در مطالعات انسانی تأیید شده است، این ترکیب را به عنوان دارویی قوی و مؤثر در درمان CML معرفی می‌نماید.

تشکر و قدردانی

حمایت مالی این کار از محل طرح‌های پژوهشی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت گرفته و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند بدین وسیله مراتب تشکر خود را از جناب آقای دکتر رستمی، دکتر حقیقت و دیگر همکاران ابراز نمایند.

1. 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetase
2. De novo
3. 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]

References

1. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96: 3343-56.
2. O'Dwyer M. Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. The Oncologist 2002; 7: 34-8.
3. 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: 8652-67.
4. Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Witte ON. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. Blood 2003; 101: 4088-97.
5. Agteresch HJ, Dagnelie PC, Berg J, Wilson JHP. Adenosine triphosphate, established and potential clinical applications. Drugs 1999; 58: 211-232.
6. Schneider C, Wiendl H, Ogilvie A. Biphasic cytotoxic mechanism of extracellular ATP on U-937 human histiocytic leukemia cells: involvement of adenosine generation. Biochim Biophys Acta 2001; 1538: 190-205.
7. Haskell CM, Mendoza E, Pisters KM, Fossella FV, Figlin RA. Phase II study of intravenous adenosine 5́-triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and Stage IV non-small cell lung cancer. Invest New Drugs 1998; 16: 81–85.
8. White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. Trends Pharmacol Sci 2006; 27: 211-7.
9. Peck ML, Herschlag D. Adenosine 5'-O-(3-thio) triphosphate (ATPgammaS) is a substrate for the nucleotide hydrolysis and RNA unwinding activities of eukaryotic translation initiation factor eIF4A. RNA 2003; 9: 1180-87.
10. Wen LT, Knowles AF. Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor. Br J Pharmacol 2003; 140: 1009–18.
11. Rapaport E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. J Cell Physiol 1983; 114: 279-83.
12. Agteresch HJ, Rooijen MH, Berg JW, Minderman-Voortman GJ, Wilson JHP, Dagnelie PC. Growth inhibition of lung cancer cells by adenosine 5́-triphosphate. Drug Develop Res 2003; 60:196-203.
13. Wang MX, Ren LM, Shan BE. Inhibitory effects of extracellular adenosine triphosphate on growth of esophageal carcinoma cells. World J Gastroenterol 2005; 11:5915-9.
14. Shabbir M, Ryten M, Thompson C, Mikhailidis D, Burnstock G. Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer. BJU International 2007; 101: 106-12.
15. Spungin B, Friedberg I. Growth inhibition of breast cancer cells induced by exogenous ATP. J Cell Physiol 1993; 157: 502-8.
16. De Nully Brown P, Jensen PO, Diamant M, Mortensen BT, Hovgaard D, Gimsing P Nissen NI. S-phase induction by interleukin-6 followed by chemotherapy in patients with refractory multiple myeloma. Leuk Res 1998; 2: 983-9.
17. Yoon MJ, Lee HJ, Lee YS, Kim JH, Park JK, Chang WK, and et al. Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells. Biol Pharm Bull 2007; 30: 671-6.
18. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell 2002; 108: 153-64.
19. Haskell CM, Wong M, Williams A, lee Y. Phase I trial of extracellular adenosine 5́-triphosphate in patients with advanced cancer. Med Pediatr Oncol 1996; 27: 165-73.
20. Morelli A, Ferrari D, Bolognesi G, Rizzuto R, Di Virgilio F. Proapoptotic plasma membrane pore: $P2X_7$ Receptor. Drug Development Research 2001; 52: 571-8.
21. Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q, and et al. Expression of $P2X_7$ in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. Leuk Res 2004; 28: 1313-22.
22. Gudas LJ, Cohen A, Ullman B, Martin Jr. Analysis of adenosine-mediated pyrimidine starvation using cultured wild-type and mutant mouse T-lymphoma cells. Somatic Cell Genet 1978; 4: 201-19.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14]