

## اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی کاربنوکسولون در رده سلولی K562 لوسمی انسانی

سید محمد امین موسوی<sup>۱</sup>، سروش مؤسس غفاری<sup>۲</sup>، مسعود اسدی<sup>۳</sup>، ایرج اسودی کرمانی<sup>۴</sup>

۱- استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۹۵۸ moosav\_m@tabrizu.ac.ir

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

۳- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی، بیمارستان شهید قاضی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** لوسمی یک بیماری بدخیم و پیشرونده است که در آن اختلالات ژنتیکی در سلول‌های خونساز منجر به تکثیر بی‌رویه سلول‌ها می‌شود. با وجود آنکه تاکنون داروهای متفاوتی برای درمان لوسمی ارائه شده، هیچ یک منجر به درمان کامل بیماری نگردیده است، لذا هنوز هم تلاش برای دست یابی به ترکیبات ضد سرطانی ادامه دارد. اخیراً اثراتی ضد سرطانی از ترکیبی به نام کاربنوکسولون [Carbenoxolon (CBX)]، در چندین رده سلولی گزارش شده است. در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات ضد سرطانی CBX بر رده سلولی K562 به عنوان مدل لوسمی میلوئید مزمن (CML) مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** رده سلولی K562 پس از کشت، تحت تأثیر CBX در غلظت‌ها و فواصل زمانی مختلف قرار گرفت. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و آزمون جذب نمک تترازولیوم (MTT) به ترتیب به منظور بررسی مهار رشد و مرگ سلولی در سلول‌های K562 استفاده شد. برای بررسی نوع مرگ سلولی از میکروسکوپ فلورسنس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.

**یافته‌ها:** CBX سبب مهار رشد سلول‌های K562 به صورت وابسته به زمان و غلظت می‌شود. به طوریکه میزان مهار رشد نسبت به کنترل در ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار به ترتیب ۱۱٪، ۴۱٪، ۵۹٪، ۷۹٪ و ۹۲٪ می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از آزمون قطعه قطعه شدن DNA و میکروسکوپ فلوروسنت نشان دهنده وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی CBX بر سلول‌های K562 لوسمی میلوئید انسانی، این دارو می‌تواند به عنوان کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان خون مورد بررسی قرار گیرد.

**کلیدواژه‌ها:** آپوپتوزیس، کاربنوکسولون، لوسمی، K562

وصول مقاله: ۸۹/۵/۶ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۹/۱۰ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۱۴

### مقدمه

است، که پروتئین  $P210^{Bcr-Abl}$  را کد می‌کند و باعث تکثیر بی‌رویه و نیز اختلال در آپوپتوزیس<sup>۲</sup> (مرگ برنامه ریزی شده سلولی) می‌گردد (۲ و ۱). آپوپتوزیس، یک فرآیند تنظیم شده ی مرگ سلولی است که باعث حذف آسیب‌ها یا سلول‌های ناخواسته بدون آسیب در ارگانسیم‌های چند سلولی به منظور کنترل رشد و ثابت

لوسمی میلوئیدی مزمن<sup>۱</sup> (CML) یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابه جایی دوطرفه بین ژن *abl* بر روی کروموزوم ۹ و ژن *bcr* بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توان بوجود می‌آید. نتیجه این جابه جایی تشکیل هیبرید *Abl-Bcr*

2. Apoptosis

1. chronic myeloid leukemia

ترکیب با فرمول مولکولی  $C_{34}H_{50}O_7$  برای اولین بار در سال ۱۹۵۹ سنتز شد. در سال ۱۹۶۰ CBX به دلیل شباهت ساختاری که با استروئیدها داشت، به عنوان یک عامل ضد التهاب معرفی گردید. سپس این ترکیب به عنوان اولین ترکیب درمانی فعال در درمان زخم معده در انسان مطرح شد (۹-۶). بعدها خواص دیگر CBX در درمان زخم دهان، زخم دوازدهه و تحریک تولید مخاط در برابر شیرۀ معده کشف شد. گذشته از اثرات ذکر شده، اخیراً خواص ضد سرطانی قابل توجهی از CBX گزارش شده است. برخی بررسی‌ها حاکی از آنست که CBX می‌تواند سبب القاء استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد نفوذپذیری گذرای میتوکندری<sup>۸</sup> (MPT) شود. نفوذپذیر شدن میتوکندری فرآیندی مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است، بطوریکه القاء نفوذ پذیری، منجر به آزادسازی سیتوکروم c می‌شود (۱۰). سیتوکروم c به عنوان یک عامل تحریک کننده آپوپتوزیس به شمار می‌رود (۱۱). نشان داده شده که Glycyrrhizin و سایر مشتقات Glycyrrhetic acid از تکثیر و رشد سلول‌های سرطانی در سرطان‌های کبد، سینه و پوست جلوگیری می‌کنند (۱۲). به علاوه، میانکنش CBX با رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی<sup>۹</sup> (GR) و مینرالوکورتیکوئیدی<sup>۱۰</sup> (MR) می‌تواند سبب القاء آپوپتوزیس توسط این دارو گردد (۱۳). همچنین بر اساس مطالعات صورت گرفته CBX قادر به القاء پروتئین‌های شوک حرارتی<sup>۱۱</sup> HSP70، HSP27، HSP40، HSP40 می‌باشد (۱۴ و ۱۵). القاء بیان HSP ها می‌تواند منجر به وقوع آپوپتوزیس شود (۱۶).

نگاه داشتن شرایط محیط داخل بدن<sup>۳</sup> می‌گردد و از طریق تغییرات ریخت شناسی از جمله چروک خوردگی سلولی<sup>۴</sup>، متراکم شدن کروماتین<sup>۵</sup> و تشکیل اجسام آپوپتوتیک<sup>۶</sup> مشخص می‌گردد (۳). بطور کلی، داروهایی که در شیمی درمانی بکار می‌روند منجر به القاء آپوپتوزیس و مهار رشد می‌شوند (۴) اما اثرات جانبی این داروها و مقاومتی که سلول‌های سرطانی نسبت به آنها نشان می‌دهند، از مشکلات و موانع مهم در شیمی درمانی به شمار می‌روند. در حال حاضر داروهایی که در درمان لوسمی بکار گرفته می‌شوند، عمدتاً به دلیل ایجاد مقاومت به دارو اثر خود را از دست می‌دهند، به عنوان مثال ایماتینیب مسیلات (Imatinib Mesylat) (STI571) که امروزه به عنوان خط اولیه درمان CML بکار می‌رود، بطور اختصاصی منجر به مهار Abl-Bcr می‌گردد، اما کاربرد این دارو سبب بروز اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی می‌شود (۵).

این موارد نشانگر این واقعیت است که هنوز هم دانش بشری به جایگاه قابل قبولی در درمان سرطان‌های لوسمی دست نیافته است، لذا تلاش در جهت بکارگیری داروهایی با پتانسیل بالا که آثار سوء داروهای شیمی درمانی را ندارند و می‌توانند در درمان سلول‌های سرطانی مؤثر واقع شوند، ادامه دارد. در این میان داروی کاربنوکسولون<sup>۷</sup> (CBX) [3-(3-carboxy-1-oxopropoxy)-11-oxo-olean-12-en-29-oic acid] می‌تواند حائز اهمیت باشد (شکل ۱). CBX یک داروی نیمه سنتتیک مشتق شده از ترکیب طبیعی گلیسیرتینیک اسید (Glycyrrhetic acid (GE)) می‌باشد. این

8. Mitochondrial permeability transition  
9. Glucocorticoid receptors  
10. Mineralocorticoid receptors  
11. Heat shock proteins

3. Hemostasis  
4. Shrinking  
5. Chromatin condensation  
6. Apoptotic body  
7. Carbenoxolone

تایی (SPL Life Science - کره جنوبی) حاوی  $2 \times 10^4$  سلول افزوده شد. سپس تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از هموسایتومتر و رنگ ترپان بلو (Sigma - آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت. این آزمایش سه مرتبه به طور مستقل انجام شد.

#### بررسی اثرات سمیت سلولی

جهت بررسی اثرات CBX بر میزان سمیت و مرگ سلولی، آزمون نمک تترازولیوم<sup>۱۳</sup> (MTT) بکار گرفته شد که بر پایه شکسته شدن نمک MTT تترازولیوم زرد به فورمازان کریستالی ارغوانی رنگ بواسطه فعالیت میتوکندریائی سلول‌های زنده فعال از نظر متابولیکی می‌باشد. کریستال‌های فورمازان تشکیل شده قابل حل بوده و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند بطور کمی توسط اسپکتروفتومترهای چند چاهکی بررسی گردد (۱۷). به این منظور سوسپانسیون سلولی حاوی  $10^4$  سلول در محیط کشت درون چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی ریخته شد. پس از تیمار با غلظت‌های  $50 \mu\text{M}$  تا  $300 \mu\text{M}$  از CBX به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت،  $10 \mu\text{l}$  نمک تترازولیوم (Merck - آلمان) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد. پس از ۴ ساعت  $100 \mu\text{l}$  از کیت و بافر حل کننده برای لیز سلول‌های موجود و حل کردن کریستال‌های فورمازان استفاده شد. پس از گذشت یک شب جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (Bio-rad) چند چاهکی در طول موج  $510 \text{nm}$  ثبت گردید.

#### بررسی تغییرات ریخت‌شناسی آپوپتوزیس

برای انجام این آزمایش  $25 \mu\text{l}$  از سوسپانسیون حاوی  $10^5 \times 5$  سلول با  $1 \mu\text{l}$  از محلول آکریدین اورنج<sup>۱۴</sup>

با توجه به اهمیت CBX در ایجاد MPT و نیز نقش آن در القاء پروتئین‌های شوک حرارتی، این دارو می‌تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه در درمان سلول‌های لوسمیک به عنوان عامل القاء کننده آپوپتوزیس مطرح گردد. در این مطالعه اثر مهار رشدی و آپوپتوزی CBX برای اولین بار بر روی رده سلولی K562 لوسمی انسانی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

#### روش بررسی

##### کشت سلول

به منظور انجام تحقیق تجربی - آزمایشگاهی حاضر، رده سلولی K562 در فروردین ۱۳۸۹ از بانک سلولی ایران خریداری شد و به آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه تبریز انتقال یافت. سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Biosera - انگلستان) غنی شده با سرم جنین گاوی<sup>۱۲</sup> (FBS) ۱۰ درصد (Biosera - انگلستان) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) و پنی‌سیلین ( $100 \text{U/ml}$ ) (سیناژن - ایران) در انکوباتور (-Memmert آلمان) با شرایط  $5\% \text{CO}_2$ ، دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض و سلول‌ها پاساژ گردید. برای انجام آزمایشات، پاساژ ۴ یا ۵ سلول‌ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی بکار گرفته شد.

##### بررسی رشد سلولی

برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ ترپان بلو استفاده شد. بدین منظور، غلظت‌های  $50 \mu\text{M}$  تا  $300 \mu\text{M}$  از CBX (Sigma - آمریکا) در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت به هر چاهک پلیت ۹۶

13. Methyl Thiazol Tetrazolium  
14. Acridine Orange

12. Fetal Bovine Serum

### یافته‌ها

#### CBX سبب مهار رشد سلولی و زیستایی در سلول‌های K562 می‌گردد

در شکل ۱ ساختار CBX مشاهده می‌شود. برای بررسی اولیه اثرات این ترکیب بر رشد و تکثیر سلول‌ها از آزمون تریپان بلو استفاده گردید. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده، CBX سبب مهار رشد سلول‌های K562 در غلظت‌های متفاوت  $50 \mu\text{M}$  تا  $300 \mu\text{M}$  پس از زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت گردید. در غلظت  $300 \mu\text{M}$  میزان مهار رشد نسبت به کنترل در زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۳۸٪، ۴۶٪ و ۹۲٪ بود. همچنین در ۴۸ ساعت میزان مهار رشد نسبت به کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار به ترتیب ۱۱٪، ۴۱٪، ۵۹٪، ۷۹٪ و ۹۲٪ بود (نمودار ۱-الف). میزان زیستایی این سلول‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۱-ب). در غلظت  $300 \mu\text{M}$  میزان زیستایی نسبت به کنترل در زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۳۸٪، ۴۹٪ و ۸۵٪ کاهش یافت. همچنین در ۴۸ ساعت میزان زیستایی نسبت به کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار به ترتیب ۵٪، ۲۲٪، ۴۱٪، ۶۷٪ و ۸۵٪ کاهش یافت. این نتایج نشان دهنده اینست که CBX علاوه بر مهار رشد سلولی در سلول‌های K562، باعث کاهش زیستایی سلولی نیز شده است و این اثرات CBX به صورت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) به صورت وابسته به زمان و غلظت تغییر کرده است.

#### CBX سبب مرگ سلولی در سلول‌های K562 می‌شود

نتایج حاصل از بررسی اثر CBX بر مرگ سلولی در سلول‌های K562 در غلظت‌های  $50 \mu\text{M}$  تا  $300 \mu\text{M}$  با استفاده از آزمون نمک تترازولیوم MTT در ۱۲، ۲۴ و

(AO) و اتیدیوم بروماید<sup>۱۵</sup> (EtBr) (Sigma-آمریکا) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و  $10 \mu\text{l}$  از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس مشاهده گردید.

#### بررسی قطعه قطعه شدن DNA<sup>۱۶</sup>

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. تعداد  $5 \times 10^5$  سلول با غلظت  $150 \mu\text{M}$  میکرومولار از دارو تیمار شد. پس از سانتریفوژ، سلول‌ها با  $20 \mu\text{l}$  بافر لیز کننده شامل (20 mM Tris, pH 8.0, 0.8 % [W/V] SDS<sup>۱۷</sup>, 100 mM EDTA<sup>۱۸</sup>) (Merck-آلمان) لیز و سپس  $10 \mu\text{l}$  RNase A/T1 و پروتیناز K (Fermentas-آلمان) هر کدام بطور جداگانه افزوده شد و در  $50^\circ\text{C}$  برای حداقل ۹۰ دقیقه قرار گرفت. پس از افزودن  $5 \mu\text{l}$  بافر لودینگ  $6 \times$  (۳۰٪ گلیسرول و ۲۵٪ بروموفنول بلو)، هر یک از نمونه‌های موجود در چاهک‌های ژل آگارز  $1/5$  درصدی بارگذاری شد. با انجام الکتروفورز قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

#### نوع مطالعه و تحلیل آماری داده‌ها

این مطالعه از نوع تجربی-آزمایشگاهی بوده و تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2003 و استفاده از آزمون آماری Student-t-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. داده‌های با ارزش  $p < 0.05$  از نظر آماری معنادار تلقی شدند.

15. Ethidium Bromide

16. DNA fragmentation

17. Sodium dodecyl sulfate

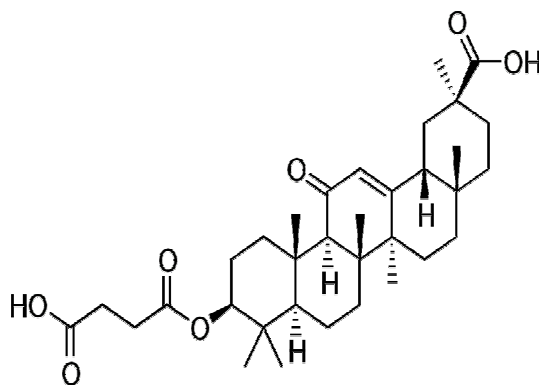
18. Ethylenediamine tetraacetic acid

سلول‌های K562 تیمار شده با CBX پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، دارای کروماتین بسیار فشرده یا قطعه قطعه به رنگ سبز یا نارنجی درخشان می‌باشند که حاکی از القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس در این سلول‌ها توسط CBX می‌باشد. به منظور بررسی بیشتر آپوپتوزیس، از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. با توجه به شکل ۳، مشاهده لکه (Smear) در سلول‌های تیمار شده با CBX بر روی ژل آگارز و عدم مشاهده ی آن در سلول‌های کنترل، نشان دهنده وقوع مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های K562 می‌باشد. لازم به ذکر است که قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 در طی آپوپتوزیس حالت نردبانی متداول را نشان نمی‌دهد (۱۸).

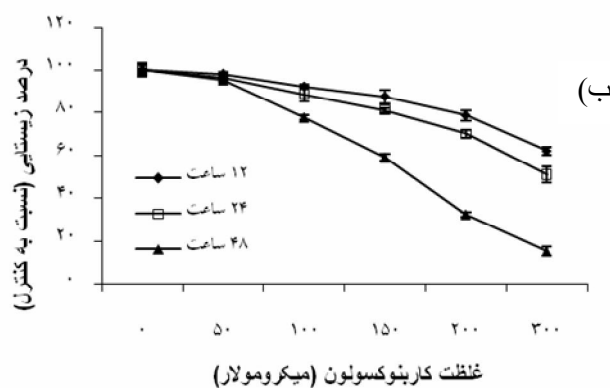
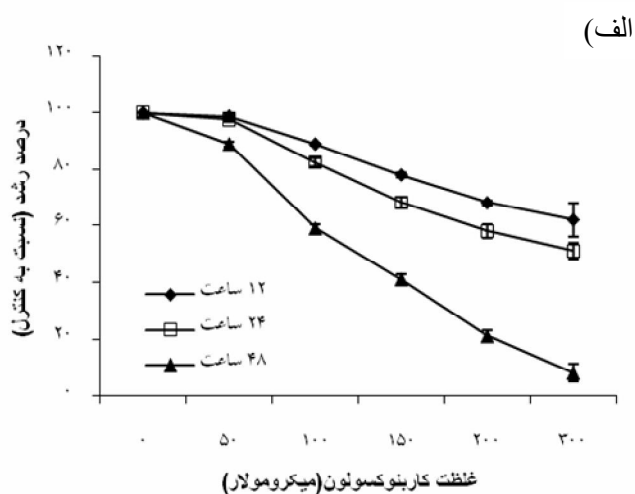
۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌گردد، در غلظت  $300 \mu\text{M}$  میزان جذب (OD) نسبت به کنترل در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۳۱ و ۰/۲۲ بود. همچنین در ۴۸ ساعت میزان جذب نسبت به کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار به ترتیب ۰/۵۳، ۰/۳۲، ۰/۳۰، ۰/۲۲ و ۰/۲۲ بود که بدین مفهوم است که با گذشت زمان و افزایش غلظت میزان سمیت CBX بطور معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) افزایش یافته، بطوریکه بیشترین میزان سمیت CBX در سلول‌های K562 در غلظت ۳۰۰ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد.

**CBX سبب القاء آپوپتوزیس در سلول‌های K562 می‌گردد**

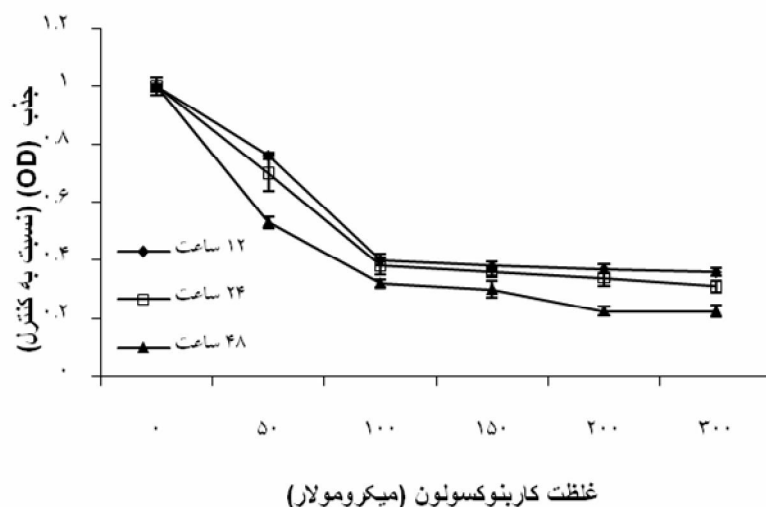
در مشاهدات حاصل از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی با Ao/Et Br (شکل ۲) مشخص گردید که



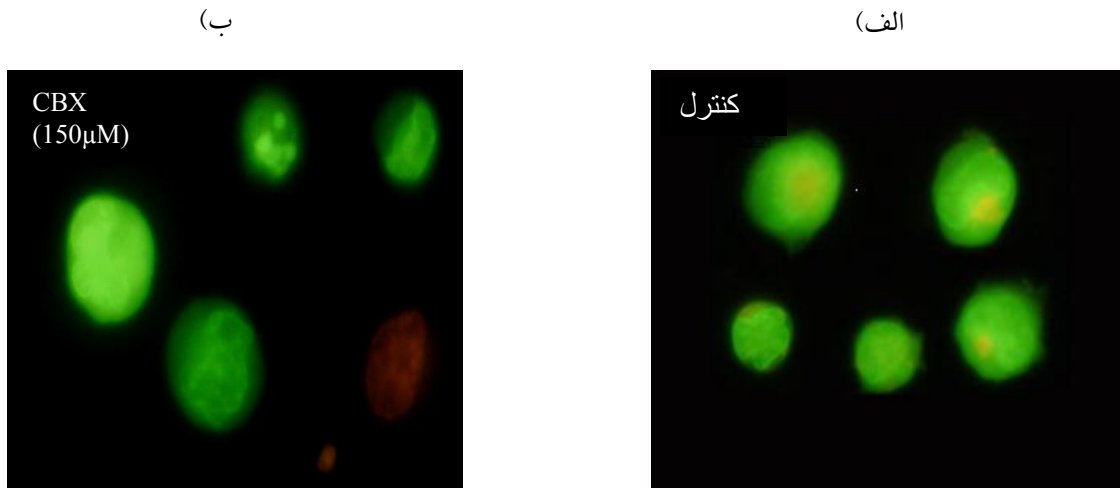
شکل ۱: ساختار مولکولی CBX. CBX یک ۳-همی سوکسینات از گلیسیریتینیک اسید می‌باشد.



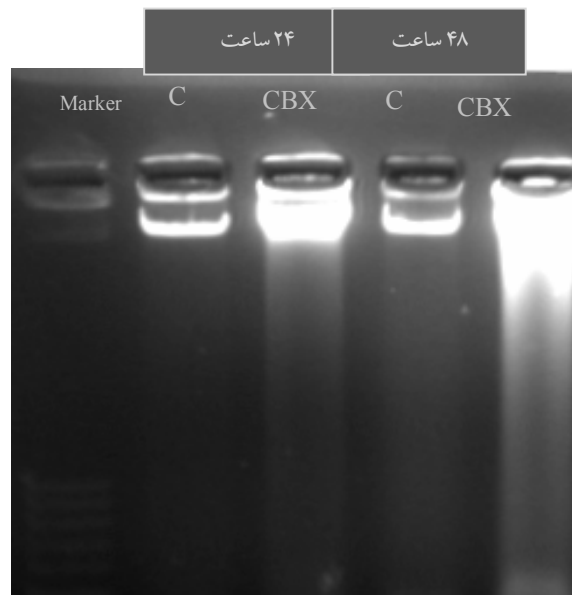
نمودار ۱: اثرات CBX بر روی رشد و زیستایی سلول‌های K562 توسط آزمون دفع رنگ تریپان بلو. سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از CBX و در فاصله‌های زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. سپس میزان مهار رشد (الف) و زیستایی سلول‌ها (ب) بر اساس مواد و روش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. CBX به صورت وابسته به زمان و غلظت سبب کاهش میزان رشد و تکثیر سلولی می‌گردد. نتایج به صورت درصد رشد سلولی نسبت به کنترل ارائه شده است. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند. نتایج از سه آزمایش مستقل و حاصل سه بار تکرار بوده و تمامی داده‌های نمایش داده شده نسبت به کنترل از نظر آماری معنادار ( $P < 0.05$ ) می‌باشند.



نمودار ۲: اثر CBX بر میزان تکثیر سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰ تا ۳۰۰ میکرومولار در زمانهای ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند سپس میزان مرگ سلولی با استفاده از آزمون نمک تترازولیوم (MTT) مطابق مواد و روشها مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب بر اساس غلظت‌های متفاوت CBX در زمانهای مختلف در سلول‌های تحت تیمار کاهش معناداری ( $P < 0.05$ ) نشان می‌دهد که حاکی از سمیت CBX در سلول‌های K562 می‌باشد. نتایج از سه آزمایش مستقل و حاصل سه بار تکرار بوده و به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562. پس از تیمار سلول‌ها با ۱۵۰ میکرومولار CBX به مدت ۴۸ ساعت خصوصیات ظاهری آپوپتوزیس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفته است. (الف): تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562 در محیط کشت RPMI بدون اضافه نمودن دارو به محیط. (ب): تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562 در محیط کشت RPMI پس از اضافه نمودن دارو به محیط. وجود سلول‌های سبز و یا نارنجی با هسته متراکم حاکی از وقوع آپوپتوزیس می‌باشد.



شکل ۳: آزمون قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 تیمار شده با ۱۵۰ میکرومولار از CBX در زمان‌های متفاوت ۲۴، ۴۸ و ۶۴ ساعت. مشاهده حالت لکه در سلول‌هایی که، تحت تیمار CBX قرار گرفتند و عدم مشاهده آن در سلول‌های کنترل حاکی از القاء آپوپتوزیس توسط CBX در این سلول‌ها می‌باشد.

### بحث

Hela انسانی نشان داده شده که غلظت ۴۰۰ میکرومولار و غلظت‌های بالاتر از CBX منجر به مهار رشد و کاهش زیستایی در این سلول‌ها پس از ۱۶ ساعت تیمار با CBX می‌گردد (۱۴)، در حالیکه داده‌های بدست آمده از این مطالعه نشان داد که این دارو غلظت‌های پائین‌تر (در محدوده ۵۰ تا ۳۰۰ میکرومولار) و در مدت زمان کمتری (از ۱۲ ساعت) باعث مهار رشد و کاهش زیستایی در سلول‌های K562 می‌گردد. داده‌های بدست آمده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA و میکروسکوپ فلورسنس در مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های K562 تیمار شده با CBX علاوه بر مهار رشد، دچار آپوپتوزیس نیز می‌شوند. القاء آپوپتوزیس توسط CBX تا کنون در چندین مدل *In vivo* و *In vitro* گزارش شده است. به عنوان مثال CBX از طریق هیدرولیز به گلیسیریتینیک اسید (GE)

در حال حاضر داروهائی که برای درمان لوسمی بکار می‌روند، اغلب به دلیل ایجاد مقاومت دارویی باعث عدم تأثیر و در نهایت مرگ بیمار می‌شوند (۱۹). بنابراین مطالعات جهانی وسیعی برای یافتن داروهای جدید با بکارگیری رده‌های سلولی در جریان است. اخیراً اثرات مهار رشدی و القای آپوپتوزی دارویی به نام CBX در برخی رده‌های سلولی گزارش شده است. مطالعه حاضر برای اولین بار به منظور بررسی اثر CBX بر رشد و زیستایی سلول‌های K562 به عنوان مدلی مناسب برای مرحله بلاست CML صورت پذیرفت. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که CBX قادر به مهار رشد و زیستایی به صورت وابسته به زمان و غلظت در رده سلولی K562 می‌باشد. اثرات مهار رشدی CBX تا کنون در چند رده سلولی گزارش شده است. در سلول‌های

چندین مکانیسم در ارتباط با نحوه اثر CBX مطرح است. مطالعات وسیعی در زمینه فعالیت آنتی اکسیدانتی CBX صورت گرفته که بیانگر ایجاد نفوذپذیری گذرای میتوکندری در نتیجه القاء استرس اکسیداتیو توسط این دارو می باشد که می تواند منجر به راه اندازی مسیر داخل سلولی آپوپتوزیس گردد (۱۰). CBX دارای ساختاری شبه گلوکوکورتیکوئیدی است و قادر است متابولیسم آندوژن را تحت تأثیر قرار دهد. القاء آپوپتوزیس توسط گلوکوکورتیکوئیدها در سلولهای ویژه لنفوییدی و سلولهای ALL گزارش شده است (۲۵). CBX با دارا بودن ساختاری شبه گلوکوکورتیکوئیدی قادر به میانکشی با رستپورهای گلوکوکورتیکوئیدی (GR) و مینرالوکورتیکوئیدی (MR) و در نتیجه القاء آپوپتوزیس بواسطه ی اتصال به GRE<sup>۲۱</sup> می باشد. بیان GR سیتوزولیک در رده سلولی K562 نشان داده شده است و لذا این امکان وجود دارد که اثرات القاء آپوپتوزی CBX بواسطه ساختار شبه گلوکوکورتیکوئیدی این دارو و اتصال به گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی در رده سلولی K562 و در نتیجه کاهش بیان برخی ژنهای درگیر در مسیرهای آپوپتوتیک باشد (۲۷ و ۲۶). GC ها به عنوان عوامل شیمی درمانی دارای ارزش درمانی هستند و منجر به القای آپوپتوزیس در سلولهای حساس می شوند (۲۶). همچنین اخیراً در بررسی های صورت گرفته توسط Kawashima و همکارانش مشاهده شده است که CBX دارای اثر القایی بر پروتئین های شوک حرارتی HSP27، HSP40، HSP70 و HSP90 می باشد. به نظر می رسد که سطح القاء HSP ها توسط CBX بستگی به غلظت آن و رده های سلولی بکار گرفته شده داشته و می تواند از این

سبب القاء آپوپتوزیس در تیموسیت ها و اسپلنوسیت های موشی در شرایط *In vivo* می گردد (۲۰). در این مطالعات نشان داده شده است که در شرایط *In vivo* ۲/۵mg از GE پس از ۲۴ ساعت تیمار منجر به القاء آپوپتوزیس در تیموسیت های موشی می گردد، در حالیکه در شرایط *In vitro*، در تیموسیت های C57BL/6 تیمار شده با غلظت های بالای GE هم نشانه هایی از القاء آپوپتوزیس مشاهده نشد (۲۱). به علاوه مطالعات دیگر نشان داده اند که CBX قادر به القاء آپوپتوز از طریق ایجاد نفوذپذیری گذرای میتوکندری کبد رت (در محدوده غلظتی ۳۰۰-۲۰ میکرومولار) و همچنین در ناحیه بازال<sup>۱۹</sup> جفت رت می باشد (۲۳ و ۲۲). نتایج مطالعه ما نشان داد که غلظت ۱۵۰ میکرومولار از CBX پس از ۲۴ ساعت، منجر به قطعه قطعه شدن DNA و تغییرات ریخت شناسی مشابه آپوپتوزیس در سلول های K562 می گردد. این بدان مفهوم است که نوع مرگ سلولی القاء شده توسط CBX در سلول های K562 در محدوده غلظتی مورد مطالعه از نوع آپوپتوز می باشد. لازم به ذکر است که در آزمون قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562 تیمار شده با CBX به جای حالت نردبانی (Ladder)، حالت لکه (Smear) مشاهده شد که می تواند به دلیل نقص در عملکرد آنزیم CAD<sup>۲۰</sup> باشد (۲۴). همچنین از آنجا که آپوپتوزیس یک مکانیسم دفاعی سلول در برابر سرطانی شدن می باشد و با توجه به اینکه اختلال در فرایند آپوپتوزیس به عنوان یک عامل مهم در ایجاد و گسترش سرطان به شمار می آید، لذا اثر CBX در القاء آپوپتوزیس حائز اهمیت می باشد.

19 basal

20 Caspase activated DNA

21 Glucocorticoid receptor element

### نتیجه گیری

به طور کلی داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که CBX قادر به مهار رشد و القاء آپوپتوزیس در رده سلولی K562 می‌باشد. اثرات ضد سرطانی CBX و آنالوگهای دارویی آن در چندین سرطان مختلف تایید شده است. این یافته‌ها بیانگر اینست که داروی CBX می‌تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان خون مورد بررسی قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز و بیمارستان شهید قاضی تبریز که هزینه‌هایی قسمتی از طرح را متقبل نموده‌اند ابراز می‌دارند.

طریق نیز منجر به وقوع آپوپتوزیس گردد (۱۴). به علاوه مطالعات آزمایشگاهی متفاوت اثر مهار داروی CBX را بر مهار ارتباط بین سلولی از نوع اتصال منفذدار ( Gap junction) تایید کرده است (۲۸ و ۲۹). با توجه به مروری بر مطالعه‌های انجام شده و مقایسه‌ای که مابین نتایج این مطالعه با آنها انجام شد، می‌توان داروی CBX را به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان لوسمی مطرح کرد و اثرات مهار رشدی و القاء آپوپتوزی آنرا در رده سلولی K562 مورد توجه قرار داد. اینکه اثرات CBX در سلول‌های K562 از طریق کدام مکانیسم می‌باشد، موضوعی است که در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

### References

1. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343-56.
2. Ten Bosch GJA, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJM, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD34<sup>+</sup> T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 1996; 88: 3522-27.
3. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 391-98.
4. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based highthroughput screening assay. 4 structure-activity relationships of fused rings at the 7, 8-positions. *J Med Chem* 2007; 50: 2858-64.
5. Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Witte ON. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. *Blood* 2003; 101: 4088-4097.
6. Chin Y-W, Balunas MJ, Balunas MJ, Chai HB and Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J* 2006; 8: 239-53.
7. Zahedi Khorasani M, Hosseinzadeh A, Vakili A. Effect of cental microinjection of Carbenoxolone in an experimental model of focal cerebral ischemia. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22: 349-354.
8. Isbrucker RA, Burdock GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006; 46: 167-192.
9. Hausmann W, Tarnoky AL. Biochemical effects of short-term treatment with Carbenoxolone disodium. *Brit J Pharmacol* 1966; 26: 412-20.
10. Salvi M, Fiore C, Battaglia V, Palermo M, Armanini D, Toninello A. Carbenoxolone induces oxidative stress in Liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening. *Endocrinol* 2005; 146: 2306-12.

11. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 463-70.
12. Vibha JB, Choudhary K, Singh M, Rathore M S, Shekhawat NS. A study on pharmacokinetics and therapeutic efficacy of *Glycyrrhiza glabra* a miracle medicinal herb. *Bot Res Intl* 2009; 2: 157-63.
13. Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, Bouard S, Palfi S. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* 2005; 6: 1-17.
14. Kawashima D, Asai M, Katagiri K, Takeuchi R, Ohtsuka K. Reinvestigation of the effect of carbenoxolone on the induction of heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 2009; 14: 535-43.
15. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy a comprehensive review. *Pharmthera* 2004; 101: 227- 57.
16. Kimura H, Yukitake H, Tajima V, Suzuki H, Chikatsu T, Morimoto S and et al. ITZ-1 a client-selective Hsp90 inhibitor, efficiently induces heat shock factor 1 activation. *Chem Boil.* 2010; 17: 18-27
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
18. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. GTP induces S-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in K562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. *J Bio Chem. Mol Biol* 2006; 39: 492-501.
19. Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly Imatinib Mesylate-resistant Bcr/Abl<sup>+</sup> human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 788-95.
20. Chintharlapalli S, Papineni S, Jutooru I, Mc Alees A, Safe S. Structure-dependent activity of glycyrrhetic acid derivatives as peroxisome proliferator-activated receptor ; agonists in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1588-98.
21. Horigome H, Horigome A, Homma M, Hirano T, Oka K. Glycyrrhetic acid-induced apoptosis in thymocytes: impact of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 277: 624-30.
22. Pivato LS, Constantin RP, Ishii-Iwamoto EL, Yamamoto NS, Constantin J, Bracht A. Metabolic effects of carbenoxolone in the rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20:230-40.
23. Waddell BJ, Susan Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ. Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *BOR* 2000; 63: 1913-17.
24. Mirkina II, Mernenko OA, Satpaev DK, Karelin AA, Blishchenko EY. Cytolytic processes induced by TNF in L929 and K562 differ in DNA fragmentation mechanisms. *Immunol Lett* 1996; 52: 105-8.
25. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Riml S, Kofler. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 45-55.
26. Greenstein S, Ghias K, Krett NL and Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1681-94.
27. Voutsas IF, Gritzapis AD, Alexis MN, Katsanou ES, Perez S, Baxevanis CN, and et al. A novel quantitative flow cytometric method for measuring glucocorticoid receptor (GR) in cell lines: Correlation with the biochemical determination of GR. *J Immunol Methods* 2007; 324: 110-19.
28. Khorasani MZ, Hosseinzadeh SA, Vakili A. Effect of central microinjection of carbenoxolone in an experimental model of focal cerebral ischemia. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22: 349-54.
29. Winmill RE, Hedrick MS. Gap junction blockade with carbenoxolone differentially affects fictive breathing in larval and adult bullfrogs. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 138: 239-51.