

Biological Evaluation of Aminopyrimidines Derivatives as Growth Inhibitor and Apoptosis Inducer of K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells

Forogh Alemi Serej¹,
Majid Mahdavi²,
Peyman Zare³,
Mammad Ali Hosseinpour Feizi⁴,
Saeed Balalaei⁵

¹ MSc in Biochemistry, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

² Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³ Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴ Professor, Department of Radiobiology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁵ Professor, Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Khaje Nasir Toosi University of Technology, Tehran Iran

(Received March 1 , 2013 ; Accepted August 3 , 2014)

Abstract

Background and purpose: Chronic myeloid leukemia (CML) is the most widely recognized form of leukemia. Nowadays, trying to find new synthetic compounds is one of the basic strategies to find new drugs to treat CML. In present study the effects of some of Pyrimidone derivatives on proliferation, viability, and apoptosis of human leukemia K562 cell line as experimental model for CML have been investigated.

Material and Methods: K562 cells were treated by various concentrations of 4 amino pyrimidone derivatives. Anti- proliferative effects of the compounds were studied using trypan blue exclusion test. Apoptosis was detected by fluorescent microscope and DNA fragmentation assay.

Results: Our study showed that: 1) aminopyrimidone derivatives induced growth inhibition in K562 cells in concentration- and time-dependent manner, 2) The aminopyrimidone derivatives inhibited viability and induced apoptosis in these cells. 3) The apoptotic and growth inhibitory effects of these compounds were dependent on their molecular structure.

Conclusion: According to growth inhibitory and apoptotic effects of new synthetic, aminopyrimidone derivatives could be proposed as new and effective compounds for more investigations in treatment of leukemia.

Keywords: Apoptosis, Aminopyrimidones, Chronic Myeloid Leukemia (CML), K562 cells

بررسی بیولوژیک مشتقاتی از خانواده آمینوپیریمیدون ها به عنوان مهارکننده رشد و القاء آپوپتوز بر روی رده سلولی K562 لوسمی میلوئید مزمن انسان

فروغ عالمی سرج^۱

مجید مهدوی^۲

پیمان زارع^۳

محمد علی حسین پورفیضی^۴

سعید بلالایی^۵

چکیده

سابقه و هدف: لوسمی میلوئید مزمن (CML) از شناخته شده ترین اشکال لوسمی می باشد. امروزه تلاش برای یافتن ترکیبات سنتزی جدید یکی از استراتژی های پایه جهت یافت داروهای جدید برای درمان CML است. در این مطالعه اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ۴ ترکیب آمینوپیریمیدونی بر روی رده سلولی لوسمی K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه از رده سلولی سرطانی K562 که مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) محسوب می شود، استفاده شد. این سلول ها پس از تیمار با ترکیبات مورد مطالعه در زمان ها و غلظت های مختلف، توسط آزمون دفع رنگ تر بیان بلو، مورد بررسی قرار گرفته اند. برای تأیید القای آپوپتوز توسط این ترکیبات، از آزمون قطعه قطعه شدن DNA و تصاویر میکروسکوپ فلئوروسانس استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اولاً ترکیبات جدید سنتز شده آمینوپیریمیدونی، باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول های K562 می شوند. ثانیاً این ترکیبات باعث کاهش زیستایی و القای آپوپتوز در سلول های K562 می شوند. ثالثاً میزان تأثیر این ترکیبات بر سلول های K562، بسته به ساختار آن ها، با یکدیگر متفاوت است.

استنتاج: به طور کلی با توجه به اثرات مهار رشد و القای آپوپتوز توسط ترکیبات تازه سنتز شده آمینوپیریمیدونی، می توان این ترکیبات را به عنوان ترکیباتی جدید و مؤثر برای مطالعات بیش تر در درمان بیماران لوسمی پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، آمینوپیریمیدون، لوسمی میلوئید مزمن سلول K562

مقدمه

هتروسیکلیک، به فراوانی در ترکیبات طبیعی یافت می شوند و در ترکیبات شناخته شده مانند تیمارین (ویتامین B1) و باز آلی سیتوزین حضور دارد (۱).

ترکیبات آمینوپیریمیدونی، ترکیبات هتروسیکلیک واجد دو اتم نیتروژن در ساختار حلقه و یک استخلاف آمینو می باشند. این خانواده از ساختارهای

مؤلف مسئول: مجید مهدوی - تهریز - گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. E-mail: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳. استادیار پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴. استاد رادیوبیولوژی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

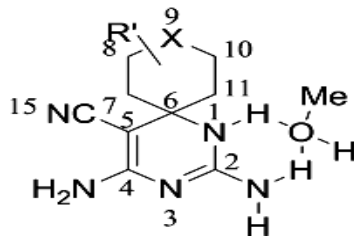
۵. استاد شیمی آلی دانشکده علوم دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۲/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۵/۱۲

در مطالعه حاضر از رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) استفاده شده است. CML ۱۵ تا ۲۰ درصد از کل لوسمی‌ها را شامل می‌شود و در کودکان به ندرت مشاهده می‌شود. تعداد افرادی که از این بیماری جان سالم به در می‌برند کمی بیش‌تر از ۴۰ درصد است. CML دارای سه فاز بیماری است که اولین فاز آن فاز مزمن می‌باشد. این فاز می‌تواند از چند ماه تا چند سال (بین ۲ تا ۵ سال) به طول بیانجامد. ممکن است فرد در این دوره هیچ علامتی از بیماری را نداشته باشد (۹). CML در اثر افزایش بی‌رویه تقسیم سلول‌های نابالغ میلوئید، مگاکاریوستیک و اریترئوئید ایجاد می‌شود. مشخصه این نوع سرطان، کروموزوم نامعمولی به نام کروموزوم فیلادلفیا می‌باشد که در نتیجه یک جابه‌جایی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ حاصل شده (t(9;22)(q34;q11) و ایجاد یک ژن اتصال‌ی جدید به نام BCR-ABL می‌کند. محصول این ژن یک پروتئین اتصال‌ی جدید است که ویژگی پروتئین‌کینازی هردو پروتئین اصلی را حفظ کرده است. اما این پروتئین جدید غیرتنظیمی است و جاگیری صحیحی در سیتوزول ندارد. این پروتئین BCR-ABL چندین مسیر سیگنالینگ را فعال می‌کند که محرک تقسیم سلولی می‌باشند. هم‌چنین آپوپتوز را مهار می‌کند و اتصالات سلولی را کاهش می‌دهد، در نتیجه فرآیند بلوغ سلول‌ها متوقف شده و سلول‌های نابالغ وارد جریان خون می‌گردند. بعد از چند سال CML به یک بحران شدید تبدیل می‌شود که به آن لوسمی مزمن گفته می‌شود (۱۰). تاکنون روش‌های درمانی متنوعی برای درمان لوسمی پیشنهاد شده است که یکی از آن‌ها استفاده از ترکیبات سنتتیک شیمیایی می‌باشد. به‌طور کلی شیمی‌درمانی روشی است که به نحوی در تقسیم سلولی یا حیات سلول ایجاد وقفه می‌کند و یا به‌طور کل آن را از بین می‌برد. هرچند هدف شیمی‌درمانی ایجاد تداخل در تقسیم سلول‌های سرطانی است، ولی بر روی برخی دیگر از سلول‌های طبیعی بدن از قبیل فولیکول مو،

هم‌چنین تاکنون ترکیبات دارویی فراوانی از این ترکیبات سنتز و یا شناخته شده است. از جمله این ترکیبات می‌توان به پریمتامین و تری‌متو‌پریم که از داروهای ضد مالاریای شناخته شده می‌باشند و تریامترین و آمیلورید که ترکیبات دیورتیک کاهش‌دهنده پتاسیم می‌باشند و به‌عنوان کاهش‌دهنده فشارخون استفاده می‌شوند، اشاره کرد (۲). ترکیبات آمینوپیریمیدونی به‌طور وسیعی به‌عنوان ترکیبات مهارگر رشد سلول‌های سرطانی مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته‌اند. از جمله شناخته شده‌ترین این ترکیبات می‌توان به داروی ایماتینیب میسلات که یک ۲-فیل آمینوپیریمیدون می‌باشد و در درمان لوسمی میلوئید مزمن کاربرد دارد اشاره کرد (۳). برخی دیگر از ترکیبات آمینوپیریمیدونی که در زمینه ضد سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند عبارتند از، ۲-فیل آمینوپیریمیدون‌ها که همانند ایماتینیب میسلات مستقیماً پروتئین Bcr-Abl را مورد هدف قرار می‌دهند (۴) و تعدادی از اعضای خانواده ی فیل ۲- آمینوپیریمیدون‌ها که به‌تازگی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و اثرات مهاري آن‌ها بر روی CDK1 و CDK2 به اثبات رسیده است (۵)، اشاره کرد. هم‌چنین یک سری از ترکیبات سنتتیک ۶-آمینو-۴-هیدروکسی ۲-تیوپیریمیدون بر روی رده سلولی MAD-MB231 از سلول‌های سرطان سینه، مورد بررسی قرار گرفته‌اند که مهار رشد آن‌ها IC50 نشان داده شده است (۶). از سویی یک سری دیگر از ترکیبات ۴- (پیریدین-۳-ایل) پیریمیدون-۲-آمین اثرات مهاري بر روی چندین کیناز انکوژنیک از جمله ABL1، AKT1، LCK، C-SRC، PIM1، FLT3، FYN و KDR را نشان داده‌اند (۷). ترکیب (تینوپیریمیدون ۲-ایل) آمینوپیریمیدون به‌عنوان یک مهارگر انتخابی PI3K و mTOR شناسایی شده است. مسیر PI3K/AKT/mTOR یکی از مسیرهای مهم در ایجاد سرطان می‌باشد از این رو از مهارگرهای این مسیر می‌توان برای درمان سرطان استفاده کرد (۸).

شماره ۱، ترکیب d). که اثرات مهار رشد و القای آپوپتوز آن ها بر روی رده سلولی K562 به طور مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است.



ترکیب	X	R'
a	C	H
b	C	9-tert-Bu
c	C	9-Et
d	C	8-Me

تصویر شماره ۱: ساختار ترکیبات آمینوپیریمیدون

مواد و روش ها

تهیه غلظت های مختلف دارو

به منظور تهیه غلظت‌های مختلف دارو، پودر خشک مشتقات آمینوپیریمیدون در حلال دی متیل سولفو کساید (DMSO) (سیناژن، تهران) حل شده و استوک اولیه ترکیبات با غلظت ۱۰۰ میلی مولار تهیه شد و سپس غلظت‌های مختلف از آن‌ها تهیه گردید.

کشت سلول

رده سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد 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 پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) (سیناژن، تهران) در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد. سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک بار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند.

سلول‌های پوششی دستگاه گوارشی و در مردان در تکامل اسپرم، نیز دارای اثرات نامطلوب و مهار رشدی می‌باشد. به همین دلیل ریزش مو، تهوع و از دست دادن قدرت باروری از عوارض شیمی درمانی می باشد (۱۱). از این رو تلاش برای یافتن ترکیبات جدید با کارایی بالاتر و عوارض جانبی کم تر ادامه دارد. ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۴ ترکیب آمینوپیریمیدونی تازه سنتز شده می باشند (تصویر شماره ۱) که در آزمایشگاه دکتر سعید بلالایی دانشگاه صنعتی خواجه نصیر الدین طوسی سنتز شده (۱۲) و برای اولین بار بر روی رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی سلول‌های سرطان خون CML مورد بررسی قرار گرفت. این رده سلولی یکی از رده های مقاوم CML است که در مراحل اولیه تمایزی سلول‌های خونی به وجود می آید و به نوعی خصوصیات یک سلول بنیادی خونی را نشان می‌دهد. علاوه بر آن به علت در دسترس بودن به آن، به عنوان یک رده مورد پژوهش در آزمایشگاه جهت کنترل رشد و تکثیر آن استفاده گردید.

ترکیبات آمینوپیریمیدونی مورد مطالعه عبارتند از:

1,3-diazaspiro[5.5]-2,4- -1
2,4-Diamino- diene-5-carbonitril
با وزن مولکولی ۲۰۵/۱۳۱۷ و فرمول مولکولی C₁₀H₁₅N₅ (تصویر شماره ۱، ترکیب a).

2, 4-Diamino-1,3-diazaspiro[5.5]-9-tert- -2
butyl- 2, 4-diene- 5- carbonitril
با وزن مولکولی ۲۶۱/۱۹۶۷ و فرمول مولکولی C₁₄H₂₃N₅ (تصویر شماره ۱، ترکیب b).

2, 4- Diamino- 1, 3- diazaspironitril [5.5]- 9- -3
ethyl- 2, 4- diene- 5- carbonitril
با وزن مولکولی ۲۳۳/۱۶۵۰ و فرمول مولکولی C₁₂H₁₉N₅ (تصویر شماره ۱، ترکیب c).

2, 4- Diamino- 1,3-diazaspiro [5.5]- 8- -4
methyl-2, 4- diene- 5- carbonitril
با وزن مولکولی ۲۱۹/۱۴۷۳ و فرمول مولکولی C₁₁H₁₇N₅ (تصویر

بررسی رشد و زیستایی مشتقات آمینو پیریمیدونی در سلول های K562

به منظور بررسی اثر مشتقات آمینو پیریمیدون بر رشد و زیستایی سلولی، از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر استفاده گردید. برای این منظور تعداد 10^5 سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف از این ترکیبات به هر چاهک برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه گردید. در هر بازه زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (سیگما، آمریکا) مورد شمارش قرار گرفت (۱۸). این آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه به طور مستقل انجام شد.

بررسی اثرات مشتقات آمینو پیریمیدونی بر ظاهر سلول‌های K562

به منظور بررسی اثرات مشتقات آمینو پیریمیدونی بر ظاهر سلول‌های K562، تعداد 10^5 سلول در ظروف ۲۴ چاهکی کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت مشتقات آمینو پیریمیدونی طی فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با مشتقات آمینو پیریمیدونی با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (المپوس، ژاپن) در قیاس با نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش ۲۵ میکرولیتر از سوپانسیون سلولی (10^5) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدیل اورنج (AO) و اتیدیوم برماید (EtBr)، (شرکت سیگما-آلمان) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و 10^5 میکرولیتر از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلوروسانس مشاهده گردید (۱۳).

بررسی مرگ سلولی آپاتوز با استفاده از آزمون قطعه شدن DNA

جهت بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین منظور سلول‌های تیمار شده با مشتقات آمینو پیریمیدونی با $20 \mu\text{g/ml}$ میکرولیتر بافر لیزکننده شامل اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) 100 mM میلی مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) 0.8% درصد وزنی - حجمی و بافر تریس-اسید کلریدریک 20 mM میلی مولار با $\text{pH}=8$ (شرکت مرک-آلمان) لیز و سپس $10 \mu\text{g/ml}$ میکرولیتر RNase A/T1 و پروتیناز K (شرکت فرمنتاس-آلمان) هر کدام به طور جداگانه افزوده شد و در 50°C درجه سانتی‌گراد برای حداقل ۹۰ دقیقه قرار گرفت. پس از افزودن $5 \mu\text{g/ml}$ میکرولیتر بافر لودینگ $6 \times$ (۳۰ درصد گلیسرول و ۲۵ درصد برومو فنول 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 (۱۴، ۱۵). برای به دست آوردن درصد تقریبی مرگ آپاتوزی سلول‌های تیمار شده با ترکیبات دی هیدروپیرانو کرومونی، سلول‌های که در مرحله اولیه و ثانویه آپاتوز بودند با استفاده از میکروسکوپ فلوروسانس شمارش گردید و درصد تقریبی آپاتوز سلول‌ها به دست آمد (۱۴).

تجزیه و تحلیل آماری

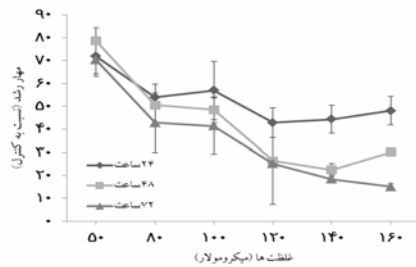
تمامی داده‌های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 و میکروسافت اکسل 2010 و آزمون student t-test انجام شد و داده‌های با ارزش $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته‌ها

کاهش رشد و زیستایی مشتقات آمینو پیریمیدونی در سلول های K562

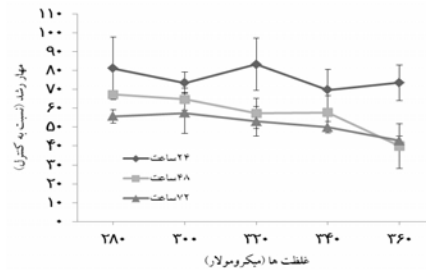
اثرات غلظت‌های مختلف هر دو ترکیب به طور جداگانه در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در

۴- ب نیز به ترتیب مربوط به رشد و زیستایی سلول‌های تیمار شده با ترکیب d می‌باشند. همان‌طور که در نمودارها مشخص است، رشد سلول‌های تیمار شده با دارو در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل به صورت وابسته به غلظت و زمان در هر ۴ نمودار مربوط به رشد، کاهش یافته است. میزان IC50 (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰ درصدی می‌گردد) برای ترکیبات a, b, c و d به ترتیب برابر ۳۵۰، ۸۰، ۹۰ و ۲۰۰ میکرومولار، ۴۸ ساعت پس از تیمار این سلول‌ها با این ترکیبات می‌باشد.

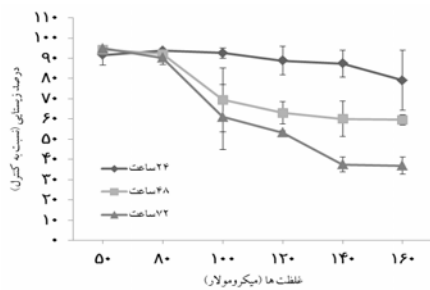


(الف)

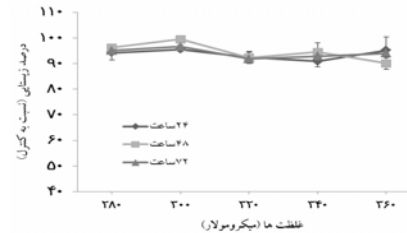
غلظت‌های مختلف، به ترتیب غلظت‌های ۲۸۰-۳۶۰ میکرومولار برای ترکیب a، ۵۰-۱۶۰ میکرومولار برای ترکیب b و c، ۸۰-۲۶۰ میکرومولار برای ترکیب d بر روی درصد رشد و زیستایی سلول‌های K562 به صورت ۳ بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. بازه غلظت‌های مورد بررسی پس از چند بار آزمون غلظت‌های مختلف به دست آمد. نمودار شماره ۱- الف نشان دهنده میزان رشد سلول‌های K562 و نمودار شماره ۱- ب نشان گر درصد زیستایی این سلول‌ها پس از تیمار آن‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب a بوده است.



(الف)

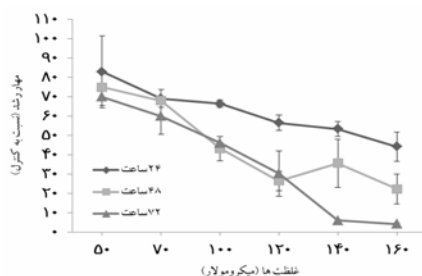


(ب)



(ب)

نمودار شماره ۲: سلول‌های K562 پس از تیمار آنها با غلظت‌های مختلف ترکیب b در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. الف: نمودار رشد سلول‌ها ب: نمودار زیستایی سلول‌ها. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می‌باشد. ($P < 0.05$).



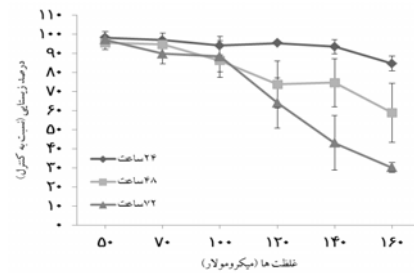
نمودار شماره ۱: سلول‌های K562 پس از تیمار آن‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب a در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. الف: نمودار رشد سلول‌ها ب: نمودار زیستایی سلول‌ها. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می‌باشد. ($P < 0.05$).

نمودار شماره ۲ الف نشان دهنده میزان رشد سلول‌های K562 و نمودار شماره ۲- ب نشان گر درصد زیستایی این سلول‌ها پس از تیمار آن‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب b بوده است.

به همین ترتیب نمودار شماره ۳- الف و ۳- ب به ترتیب نشان گر درصد رشد و درصد زیستایی سلول‌های تیمار شده با ترکیب c، و نمودارهای شماره ۴- الف و

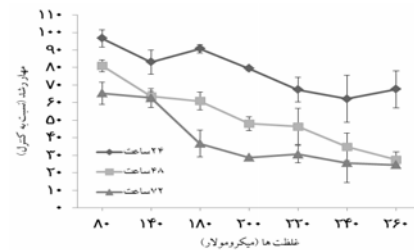
(الف)

تیمار شده با ۳ عضو از اعضای خانواده آمینوپیریمیدونی و ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول ها توسط این ترکیبات، مورد بررسی قرار گرفت. در تصاویر به دست آمده، سلول های سبز رنگ با نقاط روشن در هسته و سلول های نارنجی چروکیده و سلول های کاملاً قطعه قطعه شده به رنگ نارنجی، در گروه هایی که دارو مصرف کرده اند مشاهده می شوند، این در حالی است که در گروه کنترل مورد بررسی توسط میکروسکوپ فلئوروسانس، سلول ها به رنگ سبز یکنواخت حضور دارند. تصاویر حاکی از این امر است که ترکیب b، سلول های K562 را ۷۲ ساعت پس از تیمار این سلول ها توسط غلظت ۸۰ میکرومولار این ترکیب، غالباً به مراحل نهایی آپوپتوز و تشکیل آپوپتوتیک بادی ها کشانده است (تصویر شماره ۲ الف). این در حالی است که القا آپوپتوز توسط ترکیب c کم تر از ترکیب b مشاهده می شود و سلول های نارنجی کم تری در تصاویر میکروسکوپ فلئوروسانس، نسبت به تصاویر به دست آمده از تیمار سلول ها توسط ترکیب b، مشاهده می شود (تصویر شماره ۲ ب). در تصاویر گرفته شده از سلول های تیمار شده با ترکیب d سلول ها غالباً در مراحل اولیه آپوپتوز بوده و به رنگ سبز همراه با نقاط روشن دیده می شوند (تصویر شماره ۲ ج). ترکیب a به دلیل آن که تغییر معنی داری را بر روی زیستایی سلول ها در آزمون دفع رنگ تریپان بلو نشان نداد در این تست مورد بررسی قرار نگرفته است. درصد تقریبی مرگ آپاپتوزی سلول های K562 توسط میکروسکوپ فلئوروسانس در حداقل ۱۰ نما برای هر نمونه مورد شمارش قرار گرفته و درصد آپوپتوز القا شده توسط هر ترکیب محاسبه گشت. همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می شود درصد تقریبی آپاپتوز القا شده به وسیله ترکیبات b، c و d پس از ۷۲ ساعت در سلول های K562 به ترتیب $52 \pm 1/3$ ، $65 \pm 2/6$ و $57 \pm 0/9$ می باشد، که ارتباط نزدیکی با میزان زیستایی (یا کاهش میزان زیستایی) سلول های تیمار شده با این ترکیبات

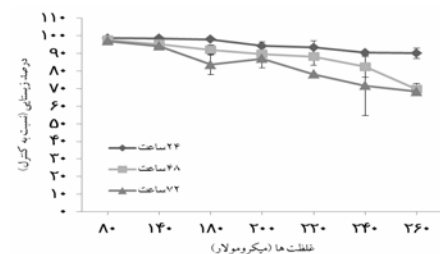


(ب)

نمودار شماره ۳: سلول های K562 پس از تیمار آن ها با غلظت های مختلف ترکیب c در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. الف: نمودار رشد سلول ها ب: نمودار زیستایی سلول ها. سلول ها. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می باشد. ($P < 0/05$).



(الف)

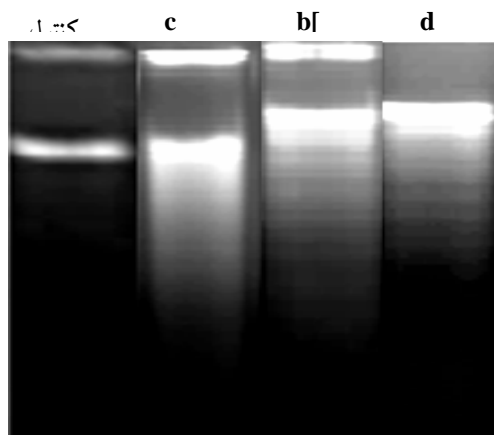


(ب)

نمودار شماره ۴: سلول های K562 پس از تیمار آنها با غلظت های مختلف ترکیب d در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. الف: نمودار رشد سلولها ب: نمودار زیستایی سلول ها. ی سلول ها. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می باشد. ($P < 0/05$).

مطالعه آپاپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلئوروسانس جهت بررسی القا آپوپتوز در سلول های K562 توسط ترکیبات آمینوپیریمیدونی، تغییرات ریخت شناسی آپوپتوز در مراحل ابتدایی و پیشرفته، توسط میکروسکوپ فلئوروسانس در گروه کنترل و گروه های

پیریمیدونی باعث تغییر الگوی ژنومی سلول های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول های کنترل گردید (ترکیب a به دلیل آن که تغییر معنا داری را بر روی زیستایی سلول ها در آزمون دفع رنگ ترپان بلو نشان نداد در این تست مورد بررسی قرار نگرفته است). در الگوی ژنومی سلول های تیمار شده با ۳ ترکیب انتخابی برای این آزمون، لکه (Smear) بر روی ژل الکتروفورز دیده می شود در حالی که این حالت در سلول های کنترل مشاهده نمی شود.

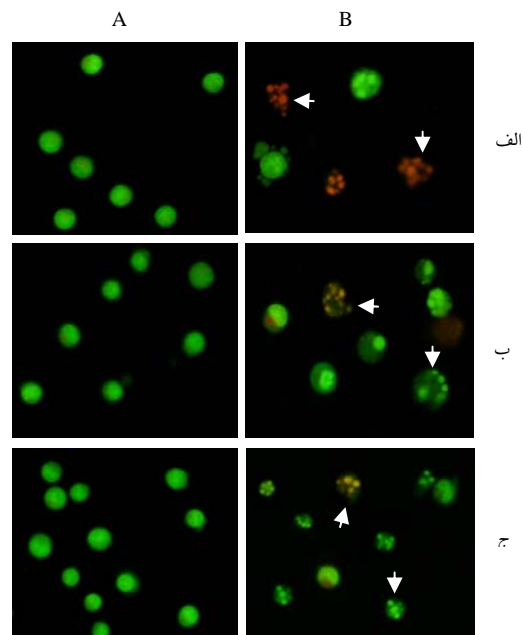


تصویر شماره ۳: اثرات ترکیبات آمینوپیریمیدونی بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562. ترکیب b با غلظت ۸۰ μM، ترکیب c با غلظت ۹۰ μM، ترکیب d با غلظت ۲۰۰ μM بر سلول های K562 اثر داده شدند. بررسی اثرات ترکیبات بر روی DNA سلول ها ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول ها توسط این ترکیبات انجام گرفت.

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که مشتقات آمینوپیریمیدونی مورد مطالعه، باعث مهار رشد رده سلولی K562 می گردند. البته تأثیر هر یک از این ترکیبات با یکدیگر متفاوت است و IC50 های به دست آمده دارای تفاوت های فاحشی با یکدیگر می باشند که به نظر می رسد این تفاوت ها را می توان به نحوی به گروه جانبی (R) متصل به ساختار پایه ترکیبات نسبت داد. به این ترتیب که ترکیب b در بین ۴ ترکیب مورد بررسی دارای بالاترین میزان IC50 (۸۰ μM) در ۴۸ ساعت بوده است. این ترکیب با دارا بودن یک گروه تیرد- بوتیل (R= tert-Bu) دارای بزرگ ترین گروه

دارد که می تواند تأیید کننده نوع مرگ سلولی آپاپتوزی باشد.



تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول های K562 جهت بررسی وقوع آپاپتوز. پس از تیمار سلول ها با غلظت های ۸۰ ، ۹۰ و ۲۰۰ میکرومولار از ترکیبهای b (الف)، c (ب) و d (ج) به مدت ۷۲ ساعت خصوصیات ظاهری آپاپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفته است. (A): تصویر فلورسنت سلول های تیمار نشده (کنترل). (B): تصویر فلورسنت سلول های تیمار شده با ترکیبات b، c و d. وجود سلول های سبز یا نارنجی با هسته متراکم (پیکان های سفید) حاکی از وقوع آپاپتوز می باشد.

جدول شماره ۱: بررسی درصد القاء آپاپتوز در سلول های K562 توسط میکروسکوپ فلوروسانس ۷۲ ساعت پس از تیمار با ترکیبات b، c و d. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می باشد.

درصد القاء آپاپتوز	۷۲ ساعت پس از تیمار
52 ± 13	ترکیب b (۸۰ μM)
65 ± 26	ترکیب c (۹۰ μM)
57 ± 09	ترکیب d (۲۰۰ μM)

مطالعه آپاپتوز با استفاده از ژل الکتروفورز آگاروز به منظور اثبات القاء آپاپتوز توسط ترکیبات آمینوپیریمیدونی در سلول های K562، از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. همان طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است، ترکیبات آمینو

خود نشان می‌دهند (که در مقدمه به آن‌ها اشاره شد)، در مطالعه حاضر نیز القای آپوپتوز توسط مشتقات آمینوپیریمیدونی سنتتیک جدید، برای اولین بار بر روی رده سلولی K562 مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی نتایج ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده با این ترکیبات توسط میکروسکوپ فلئوروسانس، به وضوح حضور سلول‌هایی را در مراحل اولیه (early apoptosis) و پیشرفته آپوپتوز (late apoptosis) را نشان می‌داد، این تغییرات عبارتند از حضور سلول‌های سبز رنگ با نقاط روشن در هسته، و سلول‌های نارنجی چروکیده و یا نارنجی کاملاً قطعه قطعه شده (تصویر شماره ۲). هم چنین برای اطمینان بیش تر وقوع آپوپتوز توسط آزمون قطعه قطعه شدن DNA نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از این آزمون نیز تایید کننده القای آپوپتوز توسط این ترکیبات در سلول‌های K562 می‌باشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به اثرات متفاوت ترکیبات تازه سنتز شده اسپرو-آمینوپیریمیدونی بر مهار رشد و القای آپوپتوز در رده سلولی K562، این ترکیبات را می‌توان به عنوان ترکیباتی جدید و موثر برای مطالعات بیش تر در درمان CML پیشنهاد نمود.

سپاسگزاری

حمایت مالی این کار از محل طرح پژوهشی و پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت گرفته و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند بدین وسیله مراتب تشکر خود را از جناب آقای دکتر طباطبایی ابراز نمایند.

References

1. Dudhe R, Sharma P K, Verma P, Chaudhary A. Pyrimidine as anticancer agent: A review, Journal of Advanced Scientific Research. 2011; 2(3): 10-17.

متصل به ترکیب، در بین ۴ ترکیب آمینوپیریمیدونی مورد بررسی می‌باشد. از طرفی ترکیب c در بین سایر ترکیبات، پس از b دارای مقام دوم از نظر قدرت مهار رشدی سلول‌های سرطانی K562 می‌باشد. این ساختار دارای یگ گروه اتیل بر روی حلقه می‌باشد (R= 9-Et) و این تنها تفاوت آن با ترکیب b است که باعث کاهش IC50 از $80 \mu\text{M}$ به $90 \mu\text{M}$ در ۴۸ ساعت پس از تیمار، شده است. این امر نشان گر ارتباط مستقیم بین گروه R با اثر گذاری این دو ترکیب می‌باشد. کم شدن اثر مهار رشدی این ترکیب را هم می‌توان با کوچک تر شدن گروه جانبی آن توجیح کرد. ترکیب بعدی این دسته یعنی ترکیب d تنها دارای یک متیل به عنوان گروه R می‌باشد که باز در آن گروه R کوچک تر از ترکیب قبل شده است و IC50 از $90 \mu\text{M}$ به $200 \mu\text{M}$ افزایش یافته است. در انتها ضعیف ترین اثر مهار رشدی در این گروه متعلق به ترکیب a می‌باشد که دارای IC50 برابر $350 \mu\text{M}$ در ۴۸ ساعت پس از تیمار، می‌باشد. این ترکیب در واقع ترکیب پایه گروه بوده و هیچ گروه R ای به آن متصل نیست. بهترین فعالیت را در بین ترکیبات بررسی شده ترکیب b (با IC50 معادل $80 \mu\text{M}$) از خود نشان داد که با این میزان فعالیت، حتی این ترکیب هم به عنوان یک ترکیب ضعیف محسوب می‌شود. به منظور دستیابی به یک ترکیب مؤثر لازم است تا مشتقات بیش تری از این دسته مورد مطالعه قرار گیرند. آزمایشگاه ما در حال بررسی فعالیت ترکیبات دیگری از این خانواده می‌باشد. از آنجایی که ترکیبات سنتتیک آمینوپیریمیدونی دیگری که اخیراً مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، القای آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی از

2. Mehta BR, Robinson BH. Lithium toxicity induced by triamterene-hydrochlorothiazide. Postgrad Med J. 1980 Nov; 56(661): 783-4.

3. Maziarz RT1, Mauro MJ. Transplantation for chronic myelogenous leukemia: yes, no,

-
- maybe so An Oregon perspective. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Sep; 32(5): 459-69.
- Fabbro DI, Ruetz S, Buchdunger E, Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Liebetanz J, Mestan J, O'Reilly T, Traxler P, Chaudhuri B, Fretz H, Zimmermann J, Meyer T, Caravatti G, Furet P, Manley PW. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther*. 2002 Feb-Mar; 93(2-3): 79-98
 - Lee JI, Kim KH, Jeong S. Discovery of a novel class of 2-aminopyrimidines as CDK1 and CDK2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Jul 15; 21(14): 4203-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.05.081. Epub 2011 May 27.
 - Elsayed Sha, Jean-Claude BJ, Butler IS, Mostafa SI. Synthesis, structural characterization and anticancer activity of some new complexes of 6-amino-4-hydroxy-2-thiopyrimidine. *Journal of Molecular Structure* 2012; 1028; 208-214.
 - El-Deeb IM1, Lee SH. Design and synthesis of new anticancer pyrimidines with multiple-kinase inhibitory effect. *Bioorg Med Chem*. 2010 Jun 1; 18(11): 3860-74. doi: 10.1016/j.bmc.2010.04.037. Epub 2010 Apr 20.
 - Sutherland DP1, Sampath D, Berry M, Castaneda G, Chang Z, Chuckowree I, Dotson J, Folkes A, Friedman L, Goldsmith R, Heffron T, Lee L, Lesnick J, Lewis C, Mathieu S, Nonomiya J, Olivero A, Pang J, Prior WW, Salphati L, Sideris S, Tian Q, Tsui V, Wan NC, Wang S, Wiesmann C, Wong S, Zhu BY. Discovery of (thienopyrimidin-2-yl) aminopyrimidines as potent, selective, and orally available pan-PI3-kinase and dual pan-PI3-kinase/mTOR inhibitors for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 2010 Feb 11; 53(3):1086-97. doi: 10.1021/jm901284w.
 - Bozzone DM. *Leukemia: Biology of cancer*, First edition. New York: Info base Publishing 2009; 11-128.
 - Schulz WA. *Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook*, first ed. New York: Springer 2007; 71-72.
 - DeVita VT Jr1, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2008 Nov 1; 68(21):8643-53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
 - Balalaie S, Moghimi H, Bararjanian M, Rominger F, Bijanzadeh HR, Sheikhamadi M. Efficient synthesis of spiro-aminopyrimidones, and their anti-bacterial activities. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2013; 50 (6): 1304-1312.
 - Mahdavi M1, Yazdanparast R. Gnidilatimonoein from *Daphne mucronata* induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Arch Pharm Res*. 2007 Feb; 30(2): 177-81.
 - Mahdavi M1, Davoodi J, Zali MR, Foroumadi A. Concomitant activation of caspase-9 and down-regulation of IAP proteins as a mechanism of apoptotic death in Hep G2, T47D and HCT-116 cells upon exposure to a derivative from 4-aryl-4H-chromenes family. *Biomed Pharmacother*. 2011 Jun; 65(3): 175-82. doi: 10.1016/j.biopha.2011.03.001. Epub 2011 Apr 8.
 - Kotamraju S1, Hogg N, Joseph J, Keefer LK, Kalyanaraman B. Inhibition of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cells by nitric oxide. Peroxyl radical scavenging as an antiapoptotic mechanism. *J Biol Chem*. 2001 May 18; 276(20): 17316-23. Epub 2001 Feb 1.