

# بررسی اثرات ضد تکثیری داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های سرطانی رده K562 (لوسمی میلوئید مزمن) اثر هیدرالازین بر سلول‌های K562

سونیا دده‌خانی<sup>۱</sup>، یعقوب پاژنگ<sup>۲\*</sup>، مهدی ایمانی<sup>۳</sup>

## چکیده

مقدمه: امروزه سرطان به عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود و لوسمی یکی از مهلک‌ترین انواع سرطان‌ها می‌باشد. لوسمی میلوئید مزمن (CML) از شناخته‌شده‌ترین انواع لوسمی هست. داروی هیدرالازین از گروه دارویی کاردیوواسکولار است که امروزه با شناخت اثرات مهارگری آن بر روی DNA متیل ترانسفراز، این دارو به عنوان عامل مهارگری در تکثیر سلول‌های سرطانی مدنظر محققان قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی اثر داروی هیدرالازین بر روی رشد سلول‌های رده K562 انجام شد. روش بررسی: در این مطالعه تجربی ابتدا سلول‌های K562 کشت داده شدند. سپس غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از داروی هیدرالازین تهیه و سلول‌های K562 به مدت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار شدند. خاصیت سیتوتوکسیته این دارو توسط روش رنگ‌سنجی MTT سنجیده شد. همچنین برای بررسی وقوع آپوپتوز از الکتروفورز DNA سلول‌های تیمار شده و رنگ‌آمیزی هوخست استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و آزمون ANOVA انجام شد. نتایج: آزمون MTT نشان دهنده خاصیت سیتوتوکسیک داروی هیدرالازین بود. مهار رشد سلول‌ها توسط بالاترین غلظت از داروی هیدرالازین (۸۰ میکرومولار) و ۷۲ ساعت بیشترین میزان بود. غلظت IC<sub>50</sub> داروی هیدرالازین ۸۱ میکرومولار به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز DNA و رنگ‌آمیزی Hoescht وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده را تأیید کرد. نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که داروی هیدرالازین باعث القاء مرگ سلولی از طریق آپوپتوز می‌شود و این اثر به صورت وابسته به غلظت دارو و زمان تیمار است. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری بر روی تأثیرات این دارو در مدل‌های حیوانی و انسانی انجام شود.

واژه‌های کلیدی: هیدرالازین، DNA متیل ترانسفراز (DNMT)، رده سلولی K562، اثرات ضد سرطانی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی گرایش بیوشیمی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۲- استادیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۳- استادیار بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۴۱۱۹۷۳۲۹، پست الکترونیکی: y.pazhang@urmia.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۸

## مقدمه

بیماری سرطان یکی از اصلی‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جهان است. به طوری که سرطان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان و سومین علت مرگ‌ومیر در ایران گزارش شده است. در حال حاضر سرطان مسئول ۲۵٪ از مرگ‌ومیرها در کشورهای پیشرفته و ۱۵٪ از مرگ‌ومیرها در سراسر جهان می‌باشد (۵-۱). در این میان لوسمی حدود ۸ درصد کل سرطان‌های جمعیت انسانی را شامل و به عنوان پنجمین سرطان شایع در جهان شناخته شده است (۶). لوسمی بیماری کلونال سلول‌های بنیادی به شمار می‌رود که به علت بدخیمی و تکثیر و عدم تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز ایجاد می‌شود و مشخصه آن ظاهر شدن تعداد زیادی سلول تمایز نیافته و نابالغ در خون و مغز استخوان است. سرطان خون بر اساس منشاء سلولی و همچنین بر اساس شدت و سرعت پیشرفت بیماری به چهار دسته تقسیم می‌شود: لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)، لوسمی لنفوسیتی حاد (ALL)، لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) (۷).

CML (Chronic Myeloid Leukemia) یکی از قابل درک‌ترین انواع سرطان است. در ۹۵٪ مبتلایان به این نوع سرطان کروموزوم فیلادلفیا دیده می‌شود. این کروموزوم در نتیجه جابجایی دو طرفه بین قطعه دوردست ژن ABL بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۹ به ناحیه BCR بر روی کروموزوم ۲۲ ایجاد می‌شود و ژن الحاقی BCR-ABL تشکیل می‌شود که mRNA کیمیر را رونویسی می‌کند و پروتئین ادغامی ایجاد می‌کند که فعالیت تیروزین کینازی مداوم و فعالی دارد (۸-۱۰). فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌ها و جلوگیری از آپوپتوز می‌شود. کروموزوم فیلادلفیای مثبت در لوسمی میلوئید مزمن یک بدخیمی کشنده است. در CML اگزون b2 یا b3 ژن نقطه مستعد شکست BCR و اگزون a2 ژن ABL در کنار هم قرار می‌گیرند و باعث تولید یک انکوپروتئین ۲۱۰ کیلودالتونی می‌شود. پروتئین ادغامی P210 BCR-ABL به طور معنی‌داری بهتر از ABL P145 به F-آکتین متصل می‌شود و باعث تکثیر بیش از

حد پروژنتیورهای CML می‌شود. این پروتئین ترکیبی باعث تغییر در مقاومت به آپوپتوز و تغییر رفتار چسبندگی سلولی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که کاهش بیان این انکوپروتئین یا سرکوب نقش کینازی آن باعث کاهش چشم‌گیر ناهنجاری‌ها می‌شود (۱۱،۱۲). رده سلولی K562 یکی از رده‌های CML می‌باشند که سلول‌های گرد غیرچسبنده‌اند و دارای سیتوپلاسم بازوفیلیک فاقد گرانول و دارای دو یا چند هسته است. سلول‌های این رده در سوسپانسیون کشت رشد می‌یابند و متوسط زمان ۲ برابر شدن آن‌ها تقریباً ۱۲ ساعت است. این سلول‌ها دارای کروموزوم فیلادلفیا و انکوژن BCR-ABL هستند (۱۳). در این مطالعه آزمایش‌ها بر روی رده‌های سلولی K562 انجام شد. در ایجاد تومورها علاوه بر تغییرات ژنتیکی، تغییرات اپی ژنتیک نیز دخیل هستند. فرآیندهای اپی ژنتیک در ایجاد و توسعه بدخیمی‌های خونی اهمیت خاصی دارند. مهم‌ترین تغییرات اپی ژنتیک شامل تغییر در متیلاسیون بوده که تماماً با تومورزایی مرتبط می‌باشند. بسیاری از مسیرهای مختلف سلولی سهیم در فنوتیپ نئوپلاستیک توسط مکانیسم‌های اپی ژنتیکی در سرطان تحت تأثیر قرار می‌گیرند. متیلاسیون DNA شناخته‌شده‌ترین مارکر اپی ژنتیک به شمار می‌رود (۱۴). متیلاسیون DNA شامل افزوده شدن گروه متیل روی باز سیتوزین موجود در نواحی غنی از دی نوکلئوتید CpG در سطح ژنوم است که به جزایر CpG معروف‌اند (۱۵). به هر حال هنگامی که یک سلول سرطانی می‌شود الگوی متیلاسیون DNA در آن ممکن است به طور اساسی دچار تغییر شود (۱۶). معمولاً متیلاسیون هیستون‌ها باعث فشرده‌تر شدن ساختار کروماتین شده و به خاموشی ژن می‌انجامد این تغییرات با کاهش بیان تومورسپرسورها و کاهش بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوز با بروز بیماری سرطان در ارتباط است (۱۷). متیلاسیون پروموتور APC (Adenomatous Polyposis Coli) در سلول‌های سرطانی اغلب باعث خاموشی آن می‌شود (۱۸). هیدرالازین دارویی است که برای درمان فشارخون بالا تجویز می‌شود. مطالعات نشان

پس از سانتی‌فیوژ و شمارش سلول‌های K562 توسط رنگ تریپان بلو و لام نئوبار، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۴۰۰۰ سلول K562، به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف ریخته شد. ۳ چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که حاوی سلول‌های بدون تیمار بودند و تنها حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول بودند. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت همراه با رقت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میکرومولار داری هیدرالازین به سلول‌های بقیه چاهک‌ها اضافه شد (غلظت نهایی ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از داری هیدرالازین در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط شد). سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شد. در پایان روز سوم ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma) بر روی هر چاهک اضافه شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم محلول MTT را احیا کرده و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش‌رنگ فورمازان در می‌آورد. پس از ۴ ساعت به هر چاهک پلیت ۵۰ میکرولیتر DMSO خالص اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه آنکوباسیون و حل شدن ذرات فورمازان، نور جذب شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Biotek) ثبت گردید (۲۱). درصد زنده‌مانی سلول‌ها با فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times (\text{OD کنترل} - \text{OD نمونه}) = \text{درصد بقای سلولی}$$

$$\text{Viability} - 100 = \text{درصد سلول کشی}$$

محاسبه IC<sub>50</sub> داروها توسط نرم‌افزار Compusyn:

با محاسبه درصد سلول‌کشی و زنده‌مانی سلول‌ها و با استفاده از نرم‌افزار Compusyn غلظت IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration-50) (غلظتی از دارو که ۵۰٪ از سلول‌ها را می‌کشد) مربوط به داری هیدرالازین به دست آمد (نمودار ۱). این نرم‌افزار توسط دو دانشمند به نام‌های چو و تالالای ارائه شده است.

در این مطالعه تمام ملاحظات اخلاقی در نظر گرفته شده شده است.

می‌دهد که در سطح مولکولی داری هیدرالازین باعث مهار فعالیت آنزیم DNA متیل ترانسفراز می‌شود و بر این اساس می‌تواند باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی مختلف می‌شود. این دارو با کاهش متیلاسیون DNA و مهار آنزیم DNA متیل ترانسفراز باعث فعالیت دوباره APC و بیان ژن تومورسوپرسور در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۸، ۱۹). با توجه به این‌که طبق مطالعات انجام شده تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تأثیر داری هیدرالازین بر روی سرطان خون انجام نگرفته لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر داری هیدرالازین بر روی سلول‌های رده K562 (لوسمی میلوئید مزمن) بود.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و طی مراحل زیر به مدت تقریباً یک سال انجام شد.

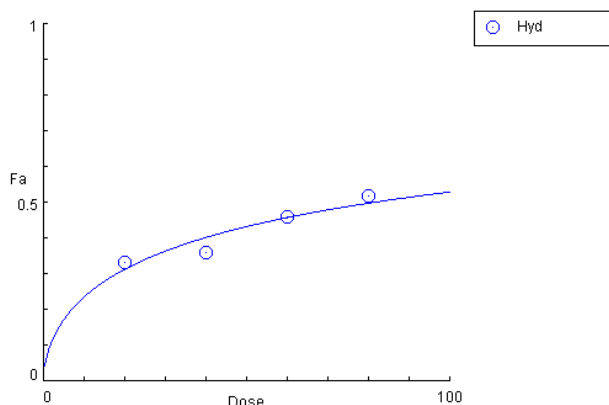
تهیه سلول‌های سرطانی رده K562 و کشت آن‌ها: سلول‌های سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه و کشت داده شد. برای کشت سلول از محیط کشت RPMI (Gibco) حاوی ۱۰٪ FBS (Sigma) و ۱٪ استریپ (Sigma) در انکوباتور (Memmert) با ۵٪ CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه استفاده شد. برای بررسی سلول‌ها از میکروسکوپ فاز معکوس استفاده شد (۲۰).

تهیه غلظت‌های مختلف از داری هیدرالازین:

پودر داری هیدرالازین (Sigma) تهیه شد. برای تهیه غلظت‌های مختلف از داری هیدرالازین ابتدا با توجه به وزن مولکولی این ترکیب مقدار کافی برای غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار وزن و در حلال آب مقطر استریل شده حل شد. با استفاده از این محلول استوک سایر غلظت‌ها به دست آمد و به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. سپس از محلول تهیه شده یک میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه شد تا سلول‌ها با غلظت‌های نهایی مورد نظر (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر) تیمار شوند.

آزمون سنجش خاصیت سیتوتوکسیته داری هیدرالازین با روش MTT:

## Dose-Effect Curve



نمودار ۱: محاسبه غلظت IC50 برای داروی هیدرالازین توسط نرم‌افزار COMPUSYN.  
IC50=80.7533

۱۰ میلی‌مولار، Tris ۵۰ میلی‌مولار و ۵٪ SDS (درصد ۸، PH) به روی سلول‌ها اضافه و به همراه ۵ میکرولیتر پروتئیناز (K Sigma) در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت گذاشته شدند. DNA سلول‌ها توسط روش فنول /کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) استخراج شد. جهت رسوب DNA محلول رویی به دقت برداشته و در میکروتیوب تمیز ریخته و به روی آن ۳۰ میکرولیتر محلول ۶NaCl مولار و دو برابر حجم محلول، اتانول مطلق به هر نمونه اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک شب در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا اسیدنوکلیک‌های استخراج شده ته نشین گردد. در روز بعد رسوب DNA در بافر TE (EDTA - Tris) (شامل ۱۰ میلی‌مولار و EDTA ۱۰ میلی‌مولار، pH=۸) حل و جهت الکتروفورز آماده گردید. DNA آماده شده توسط دستگاه الکتروفورز (Bio Rad) با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت در ژل یک درصد آگارز حاوی اتیدیوم بروماید جداسازی شد. مولکول‌های DNA بر حسب وزن خود بر روی ژل حرکت و ایجاد باند نمودند. در نهایت توسط دستگاه، عکس‌برداری از ژل صورت گرفت (۲۲).

تشخیص آپوپتوز با رنگ‌آمیزی هوخست:

به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آن که مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است از میکروسکوپ فلوروسنت و

بررسی اثرات مورفولوژیک داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های K562:

تعداد  $5 \times 10^5$  سلول در یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI با FBS ۱۰٪ در چهار چاهک یک پلیت ۲۴ خانه‌ای ریخته شد. یک چاهک بدون تیمار و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و تنها حاوی سلول و یک میلی‌لیتر محیط کشت بود و چاهک‌های بعدی با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از داروی هیدرالازین به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> تیمار شدند. شکل ظاهری سلول‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و عکس‌برداری شد.

الکتروفورز DNA:

تعداد  $2 \times 10^6$  سلول در محیط کشت RPMI با FBS ۱۰٪ در دو فلاسک ریخته شد. یک فلاسک بدون تیمار و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و فلاسک بعدی با غلظت IC<sub>50</sub> محاسبه شده برای داروی هیدرالازین، تیمار شد. این فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول‌های هر فلاسک به صورت مجزا در میکروتیوب‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند تا استخراج DNA روی آن‌ها انجام بگیرد. ۶۰۰ میکرولیتر بافرلیز (حاوی کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA

## نتایج

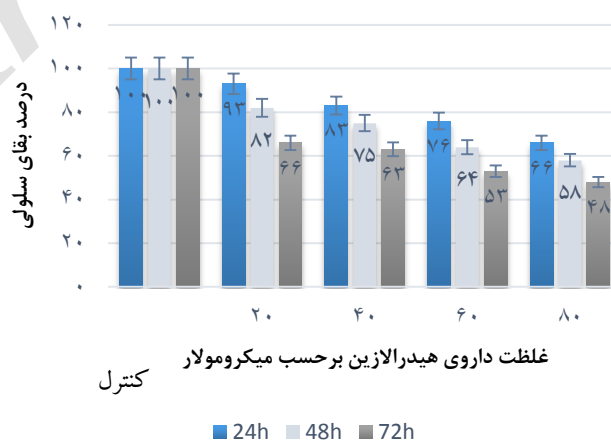
بررسی اثرات سیتوتوکسیک داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های سرطانی رده K562:

به منظور بررسی اثرات سمی داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های رده K562 از آزمایش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. بدین منظور در هر چاهک  $4 \times 10^3$  سلول در هر چاه کشت داده شد و با غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار گردید. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان‌دهنده تأثیر این دارو بر کاهش رشد سلولی در مقایسه با گروه کنترل بودند و همچنین دیده شد که تأثیر این دارو در کاهش رشد سلول‌ها ارتباط معنی‌دار مستقیمی با غلظت دارو و مدت‌زمان تیمار با دارو داشت. به طوری که در مدت ۷۲ ساعت تیمار با دارو و غلظت ۸۰ میکرومولار از هیدرالازین بیشترین کاهش رشد سلول‌ها مشاهده شد که برابر با ۵۲ درصد کاهش رشد سلولی بود (نمودار ۲). در تمامی غلظت‌ها و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش رشد سلول‌ها معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). داده‌های حاصل به نرم‌افزار COMPUSYN وارد و  $IC_{50}$  داروی هیدرالازین در غلظت‌های تیمار داده شده محاسبه گردید که مقدار آن برابر با ۸۱ میکرومولار بود (نمودار ۱). یعنی در این غلظت ۵۰٪ از سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل از بین رفته بودند (میزان جذب و درصد سلول‌ها در تمام مراحل آزمایش با گروه کنترل مقایسه شد).

رنگ‌آمیزی هوخست (33342) استفاده شد. به این ترتیب که در دو چاهک یک پلیت ۲۴‌خانه‌ای محیط کشت حاوی غلظت  $2 \times 10^5$  سلول در یک میلی‌لیتر ریخته شد، سلول‌های یکی از چاهک‌ها با غلظت  $IC_{50}$  هیدرالازین تیمار شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون محتویات هر چاهک به میکروتیوپ انتقال داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دور  $2000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ شد. برای فیکس کردن سلول‌ها روی رسوب سلولی ۲۰۰ میکرولیتر متانول ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها، بر روی  $100$  میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در بافر PBS، ۲ میکرولیتر از رنگ هوخست اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. در نهایت بعد از سانتریفیوژ و حل کردن رسوب سلولی در  $100$  میکرولیتر از بافر PBS،  $10$  میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از تهیه اسمیر سلول‌ها با لام پوشانده شده و با بزرگنمایی  $100\times$  توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکس‌برداری گردید (۲۳).

تجزیه و تحلیل آماری:

نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم شد و داده‌های به دست آمده نیز توسط نرم‌افزار SPSS و ANOVA جهت بررسی ارتباط غلظت داروی تیمار شده و زمان تیمار در مقایسه با نمونه کنترل در سطح  $P < 0.05$  تجزیه و تحلیل شد.



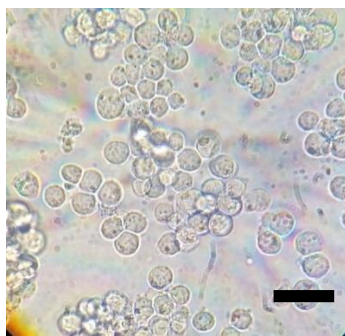
نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های سرطانی رده K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار.

مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل  $\pm$  انحراف استاندارد است [  $P < 0.001$  (\*\*),  $P < 0.01$  (\*\*\*) ,  $P < 0.05$  (\*) ]

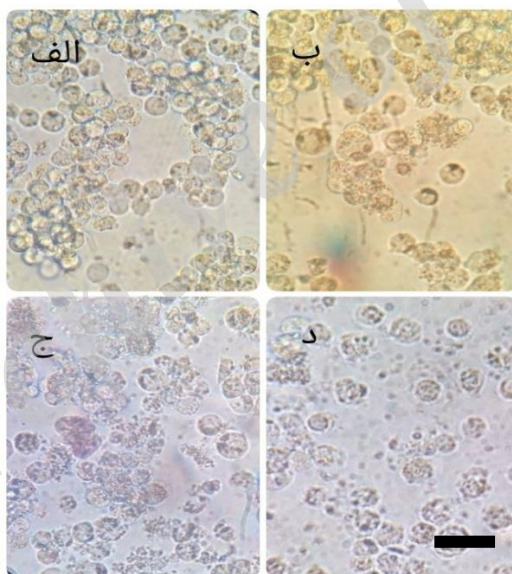
و به هم ریختگی در مورفولوژی سلول‌ها می‌شود. به طوری که شکل ظاهری سلول‌ها نشان دهنده وقوع آپوپتوز در آن‌ها است و با افزایش غلظت و زمان اثر دارو تعداد سلول‌های دارای مورفولوژی آپوپتوتیک بیشتر می‌شود. در سلول‌های کنترل غشای سلول یکدست است ولی در سلول‌های آپوپتوز شده در غشا برآمدگی ایجاد می‌شود (شکل ۱) و (شکل ۲).

اثرات مورفولوژیک داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های K562:

شکل ظاهری سلول‌ها بعد از تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از داروی هیدرالازین پس از ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و عکس‌برداری شد. مشاهدات نشان داد که تیمار با دارو باعث تغییر در شکل ظاهری سلول‌ها



شکل ۱: سلول‌های کنترل K562  
Scale bar 40  $\mu$ m

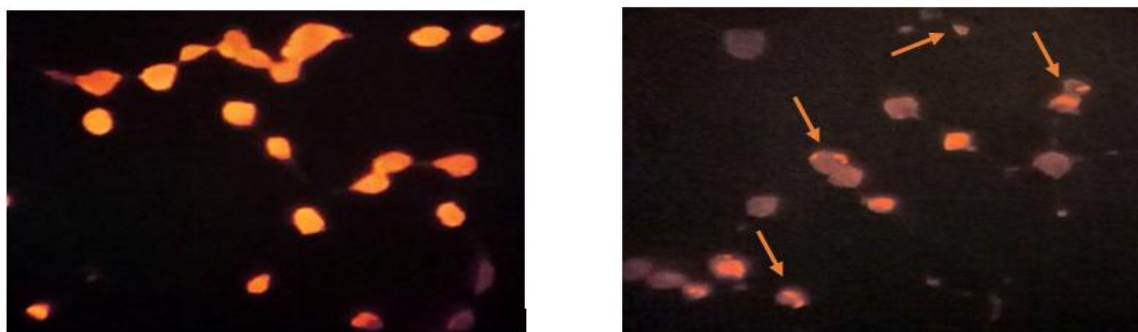


شکل ۲: اثرات مورفولوژیک داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های K562 بعد از ۷۲ ساعت

الف) غلظت ۲۰ میکرومولار (ب) غلظت ۴۰ میکرومولار (ج) غلظت ۶۰ میکرومولار (د) غلظت ۸۰ میکرومولار. با افزایش دوز داروی هیدرالازین تعداد سلول‌هایی آپوپتوز شده (دارای غشا قطعه قطعه شده و دارای برجستگی) افزایش یافته است.

میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و عکس‌برداری شد. سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل دارای هسته و DNA قطعه‌قطعه شده بودند که نشان دهنده وقوع آپوپتوز است (شکل ۳).

بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده توسط داروی هیدرالازین توسط رنگ‌آمیزی هوخست: بدین منظور سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت IC<sub>50</sub> هیدرالازین تیمار شده و پس از رنگ‌آمیزی هوخست با



شکل ۳: سلول‌های K562 رنگ‌آمیزی شده با Hoechst زیر میکروسکوپ فلورسانس

چپ) سلول‌های بدون تیمار، راست) سلول‌های تیمار شده توسط غلظت IC<sub>50</sub> داروی هیدرالازین به مدت ۷۲ ساعت، پیکان‌ها نشان دهنده سلول‌های آپوپتوتیک هستند که در مقایسه با سلول‌های کنترل دارای هسته‌های قطعه قطعه شده هستند.

شکل ۴ مشاهده می‌شود DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار شده بر روی الکتروفورز حرکت می‌کند و ایجاد اسمیر می‌کند که نشان دهنده قطعه قطعه شدن DNA و وجود آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده است در حالی که DNA سلول‌های کنترل به صورت تک باند بر روی ژل ظاهر می‌شود (شکل ۴).

بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده توسط داروی هیدرالازین توسط الکتروفورز DNA جهت بررسی آپوپتوز سلول‌های K562 با غلظت IC<sub>50</sub> محاسبه شده داروی هیدرالازین که معادل ۸۱ میکرومولار به دست آمد، به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. همان‌گونه که در



شکل ۴: بررسی وضعیت مرگ سلولی سلول‌های K562

الف. DNA سلول‌های بدون تیمار بر روی ژل الکتروفورز

ب. DNA سلول‌های تحت تیمار با غلظت IC<sub>50</sub> هیدرالازین بعد از ۷۲ ساعت بر روی ژل الکتروفورز

### بحث

شناخته شدن اهمیت تغییرات اپی‌ژنتیک به‌ویژه تغییرات الگوی متیلاسیون DNA در پیشرفت سرطان می‌تواند به این دارو به عنوان گزینه‌ای برای درمان سرطان بیشتر توجه کرد (۲۶-۲۴). تحقیقات نشان داده است که هایپرمتیلاسیون پروموتور APC (ژن نوعی از تومور ساپرسور) باعث خاموش شدن ژن

داروی هیدرالازین از گروه داروهای کاردیوواسکولار است که برای درمان پرفشاری خون تجویز می‌شود و اثر عمده این دارو گشاد کردن شریانچه‌ها به وسیله شل کردن عضلات صاف جدار عروق است. مطالعات نشان داده است که داروی هیدرالازین دارای تأثیر مهار آنزیم DNA متیل ترانسفراز هم است که با

مقاومت نشان می‌دهند، هایپر متیلاسیون DNA وجود دارد لذا استفاده از داروهایی مثل هیدرالازین که عوامل دمتیله‌کننده می‌باشند، می‌تواند نقش مهمی در غلبه بر مقاومت دارویی را بازی کند.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نیز اثرات داروی هیدرالازین بر روی رشد سلول‌های k562 بررسی شد. مشابه تحقیقات گذشته این دارو توانست رشد سلول‌های سرطانی را به طور معنی‌داری وابسته به زمان و غلظت مهار کند ( $P < 0.05$ ). بیشترین اثر مهار در ۷۲ ساعت و غلظت ۸۰ میکرومولار دیده شد. همچنین یافته‌های مطالعه حاضر نشان دهنده نقش مؤثر داروی هیدرالازین در القاء آپوپتوز خصوصاً در غلظت‌های بالاتر در رده سلولی K562 است. از آنجایی که این دارو مورد تأیید سازمان FDA (Food and Drug Administration) می‌باشد، لذا عوارض جانبی آن شناخته شده است و با توجه به این‌که در سلول‌های سرطانی مورد مطالعه در این تحقیق باعث کاهش رشد شده است، لذا می‌توان این دارو را که امروزه به عنوان درمان بیماری‌های قلبی و پرفشاری خون استفاده می‌شود، به عنوان گزینه‌ای برای درمان سرطان خون نیز بیشتر مورد مطالعه قرار داد. تمام مسیرهای درگیر در کاهش پیشرفت سلول‌های سرطانی توسط این دارو به روشنی مشخص نشده است و نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. با توجه به این‌که این دارو در رفع مقاومت دارویی در شیمی‌درمانی هم تأثیر دارد می‌توان بر روی این دارو در درمان سرطان بیشتر تمرکز کرد. همچنین مشاهده شده است که این دارو همراه با داروهای دیگر می‌تواند در درمان سرطان خاصیت سینرژیستی نشان دهد و اثرات سلول‌کشی آن به شدت بالا رود. لذا پیشنهاد می‌شود اثر مهار این دارو به صورت ترکیبی با داروهای دیگر بر روی در انواع سرطان بررسی شود.

تومور ساپرسور می‌شود و از این طریق می‌تواند منجر به ایجاد سرطان شود. این هایپرمتیلاسیون روی پروموتور APC در سرطان دهانه رحم نیز دیده می‌شود. تحقیقات Yinhong Song در سال ۲۰۰۸ نشان داد که تیمار سلول‌های HELA و CASKI به مدت ۷۲ ساعت و غلظت ۴۰ میکرومولار تیمار با داروی هیدرالازین باعث فعالیت دوباره این پروموتور و بیان ژن تومور ساپرسور در سلول‌های HELA و caski شد. همچنین این تیمار باعث کاهش رشد سلول‌ها شد و سلول‌ها در فاز S در چرخه سلولی متوقف شدند و درصد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های تیمار شده در این دو رده نسبت به سلول‌های تیمار نشده به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کردند (۱۸). همچنین مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۶ توسط Chavez در زمینه بررسی تأثیر ضد سرطانی داروی هیدرالازین بر روی سلول‌های سرطانی ریه، کولون و سر و گردن نشان داده است که داروی هیدرالازین به همراه والپروئیک اسید، مهار قوی در رشد این سلول‌ها را دارند (۱۹). در سال ۲۰۰۵ Pilar Zambrano و همکاران ۱۶ بیمار را در ۴ گروه را با دزهای ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در روز از داروی هیدرالازین به صورت خوراکی تیمار کردند. بیوپسی تومورها و نمونه خون محیطی بیماران قبل و بعد از تیمار گرفته شده و متیلاسیون پروموتور ژن‌های APC, MGMT, ER, GSTP1, DAPK, RAR $\beta$ , FHIT و p16 توسط تکنیک MSP (Methylation-Specific PCR) و RT-PCR در هر نمونه توموری مورد ارزیابی قرار گرفته شده است و نتایج نشان داده است که تیمار با داروی هیدرالازین در دزهای بین ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در روز قابل تحمل است و در دمتیلاسیون و فعالیت دوباره تومور ساپرسورها مؤثر است (۲۶). امروزه در درمان سرطان به روش شیمی‌درمانی، مقاومت دارویی در بیماران به عنوان یک مانع بزرگ در درمان موفقیت‌آمیز شیمی‌درمانی وجود دارد. نشان داده شده است که در سلول‌هایی که نسبت به خاصیت داروهای شیمی‌درمانی



## References:

- 1- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International j cancer 2010; 127(12): 2893-917.
- 2- Swapnil K, Vijay S, Chandrakant M. *Targeted Drug Delivery: A Backbone for Cancer Therapy*. Asian J Pharmacy and Technology 2013; 3(1): 40-6.
- 3- Garrett MD. *Cell cycle control and cancer*. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*- 2001; 81(5): 515-22.
- 4- Balunas MJ, Kinghorn AD. *Drug discovery from medicinal plants*. Life sciences 2005; 78(5): 431-41.
- 5- Parkin DM. *Global cancer statistics in the year 2000*. The lancet oncology 2001; 2(9): 533-43.
- 6- Işikdağ İ, Özkay Y, İncesu Z. *Synthesis and anticancer activity of some bisquinoxaline derivatives*. Turk J. Pharm. Sci 2011; 8(2): 179-88.
- 7- Mossoomy Z, Mesgari M. *Detection of leukemia epidemiology in Iran using GIS and statistical analyses*. Pediatric Hematology and Oncology 2008; 32: 441-8.
- 8- Delluc S, Tourneur L, Michallet AS, Boix C, Varet B, Fradelizi D, et al. *Autologous peptides eluted from acute myeloid leukemia cells can be used to generate specific antileukemic CD4 helper and CD8 cytotoxic T lymphocyte responses in vitro*. Haematologica 2005; 90(8): 1050-62.
- 9- Roussel MJ, Lanotte M. *Maturation sensitive and resistant t (15; 17) NB4 cell lines as tools for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes*. Oncogene 2001; 20(49): 7287.
- 10- Dai Z, Quackenbush RC, Courtney KD, Grove M, Cortez D, Reuther GW, et al. *Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway*. Genes & development 1998; 12(10): 1415-24.
- 11- Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. *Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies*. Leukemia 2003; 17(7): 1211-62.
- 12- Catherine M, Verfaillie R, Scott M, Robert C.H. *Gene therapy for chronic myelogenous leukemia*. molecular med today 1999; 5(8): 359-66.
- 13- Melo JV. *2 BCR-ABL gene variants*. Baillière's clinical haematology 1997; 10(2): 203-22.
- 14- Koeffler HP, Golde DW. *Human myeloid leukemia cell lines: a review*. Blood 1980; 56(3): 344-50.
- 15- Esteller M. *Epigenetics in cancer*. New England Journal of Medicine 2008; 358(11): 1148-59.
- 16- Lande-Diner L, Cedar H. *Silence of the genes—mechanisms of long-term repression*. Nature Reviews Genetics 2005; 6(8): 648-54.
- 17- Lyko F, Brown R. *DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies*. J the National Cancer Institute 2005; 97(20): 1498-506.

- 18- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell 2007; 129(4): 823-37.
- 19- Song Y, Zhang C. *Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression*. Cancer chemotherapy and pharmacology 2009; 63(4): 605-13.
- 20- Chavez-Blanco A, Perez-Plasencia C, Perez-Cardenas E, Carrasco-Legleu C, Rangel-Lopez E, Segura-Pacheco B, Taja-Chayeb L, et al. *Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines*. Cancer cell international 2006; 6(1): 2.
- 21- Xu MH, Zhang GY. *Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines*. World J Gastroenterology: WJG 2005; 11(11): 1693-6.
- 22- 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*. Biomedicine & Pharmacotherapy 2011; 65(3): 175-82.
- 23- Bellosillo B, Piqué M, Barragán M, Castaño E, Villamor N, Colomer D, et al. *Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Blood 1998; 92(4): 1406-14.
- 24- Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. *Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Clinical and diagnostic laboratory immunology 2001; 8(2):460-4.
- 25- Singh N, Dueñas-González A, Lyko F, Medina-Franco JL. *Molecular modeling and molecular dynamics studies of hydralazine with human DNA methyltransferase 1*. ChemMedChem 2009; 4(5): 792-9.
- 26- Davis CD, Uthus EO. *DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions*. Experimental biology and med 2004; 229(10): 988-95.
- 27- Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Revilla-Vazquez A, Benitez-Bribiesca L, et al. *Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine*. J translational med 2006; 4(1): 32
- 28- Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, et al. *A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes*. BMC cancer 2005; 5(1): 44.

## Anti-proliferative Effects of Hydralazine on K562 Cell Line (CML)

Sonya Dadakhani<sup>1</sup>, Yaghub Pazhang<sup>\*2</sup>, Mehdi Imani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 17 Apr 2017

Accepted: 27 Jul 2017

### Abstract

**Introduction:** Cancer is the second leading cause of death in the world and among the types of cancer, leukemia is one of the deadliest. Chronic myeloid leukemia (CML) is the best known types of leukemia. Hydralazine is in the cardiovascular medical group, which is considering as inhibitory factor on the proliferation of cancer cells by knowing its inhibitory effects on DNA methyltransferase. The purpose of this study was to evaluate the inhibitory effects of hydralazine on K562 cells proliferation.

**Methods:** First, the K562 cells were cultured. After, the different concentrations of the hydralazine were prepared and the cells were treated for 24, 48 and 72 hours. Next, the inhibitory effects of this drug on K562 cells proliferation was measured by MTT assay. Hoechst (33342) staining and DNA electrophoresis was used to check apoptosis. Data analyses were performed using SPSS software (Version 20) and ANOVA test ( $P < 0.05$ ).

**Results:** MTT assay results showed that hydralazine has the highest cytotoxic activity in  $80\mu\text{M}$  at 72 hours. Drug  $\text{IC}_{50}$  was obtained 81 micromolar. And also the results of Hoechst staining and DNA electrophoresis showed that hydralazine was caused apoptosis.

**Conclusion:** In the present study, it was shown that hydralazine induces cells death by apoptosis and this effect was dose-dependent and treat time dependent. It is suggested that more studies will be done on the effects of this drug on animal models and human.

**Keywords:** Hydralazine, DNA methyltransferase, K562 cell line, Anti-tumor effects

#### This paper should be cited as:

Dadakhani S, Pazhang Y, Imani M. **Anti-proliferative Effects of Hydralazine on K562 Cell Line (CML)**. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(8): 670-80.

\*Corresponding author: Tel: 09141197329, email: y.pazhang@urmia.ac.ir