مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۴/ ۹۱-۸۳

مقاله پژوهشی

اثرات ضد توموری داروی نیتروگلیسیرین روی سلول های K562

شهین اعلائی[1*]، مهدی محمدزاده[2]، یعقوب پاژنگ[2]

[1]دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛ [2]گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: **لوسمی، سرطان بافت های خون ساز بدن می باشد که از سلول‌های پیش‌ساز گلبول‌های قرمز و سفید خون مشتق می‌شود. گلبول‌های قرمز و سفید خونی معمولاًدر صورت نیاز بدن، به طریقی منظم و کنترل شده رشد می‌کنند و تقسیم می‌شوند؛ اما در بیماری لوسمی در این روند اختلال ایجاد شده و رشد سلول‌های خونی از کنترل خارج می‌شود. نیتروگلیسیرین از طریق تبدیل به نیتریک اکسید (NO) و بالابردن استرس اکسیداتیو موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد توموری داروی نیتروگلیسیرین بر روی سلول های سرطانی K562 در شرایط in vitro انجام شد.**

روش بررسی: **ابتدا سلول‌های لوسمی رده K562 در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی غیر فعال شده کشت داده شد؛ سپس غلظت‌های مختلف داروی نیتروگلیسیرین تهیه و خاصیت سیتوتوکسیته آن در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار به روش MTT سنجیده شد؛ سپس IC_{50} داروها برآورد شد و در مرحله بعد برای بررسی آپوپتوز از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی Hoechst استفاده شد.**

یافته ها: **نتایج نشان داد که اثرات ضد توموری نیتروگلیسیرین به صورت وابسته به دوز و زمان افزایش می‌یابد. IC_{50} نیتروگلیسیرین در ۷۹ µm/ml مشاهده شد؛ همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی سلول‌ها نیز نشان داد که این داروها دارای اثر آپوپتوزی بود.**

نتیجه گیری: **از نتایج به دست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که اثر مهاری نیتروگلیسیرین بر روی سلول‌های K562 وابسته به زمان و دوز می‌باشد که بیشترین اثر مهاری در ۷۲ ساعت بعد از تیمار و بالاترین غلظت مشاهده شد؛ بنابراین این دارو ممکن است بتواند در پیشگیری و درمان لوسمی میلوئیدی مزمن موثر واقع شود.**

واژه های کلیدی: **نیتروگلیسیرین، کشندگی سلولی، رده سلولی K562، آپوپتوزیس.**

مقدمه:

لوسمی یا سرطان خون یکی از انواع شایع و مهلک سرطان‌ها است (۱). لوسمی، سرطان بافت‌های خون‌ساز بدن، شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی بوده و توسط سلول‌های سفید خون و لنف به وجود می‌آید. گلبول‌های سفید خونی معمولاً در صورت نیاز بدن، به طریقی منظم و کنترل شده رشد می کنند تقسیم می شوند؛ اما در بیماری لوسمی در این روند اختلال ایجاد شده و رشد سلول‌های خونی از کنترل خارج می‌شوند (۲). لوسمی میلوئید مزمن یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابجایی دو طرفه بین ژن ab1 در کروموزوم ۹ و ژن bcr موجود در کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توانی به وجود می آید. نتیجه این جابجایی کروموزومی منجر به شکل گیری ژن الحاقی Abl–Bcr می‌شود (۳). این جابجایی همچنین با نام کروموزوم فیلادلفیا نیز شناخته می شود که در بیش از ۹۵٪ از بیماران مثبت است. محصول این ژن الحاقی در CML پروتئین ۲۱۰ کیلودالتونی P210Bcr–Ab1 می‌باشد که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم می‌باشد. این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌های رده میلوئیدی و اختلال در مرگ

*نویسنده مسئول: ارومیه- دانشگاه ارومیه- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۹۱۴۵۹۲۹۶۰۲، E-mail: shahin_aalaei@yahoo.com

www.SID.ir

برنامه ریزی سلولی (آپوپتوزیس) می‌گردند (۵،۴). رده سلول‌های سرطانی K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشاء میلوییدی هستند که برای اولین بار از یک خانم ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جداسازی شده است. این رده‌ها جزو اریترولوکمیا هستند که بر اثر همراهی با ویروس اپشتاین‌بار و مارکرهای سلولی لنفوسیتی تمایز یافته‌اند، به‌دست آمده است (۶). سلول‌های K562 تقریباً ۱/۵ برابر سلول‌های معمولی کروموزوم دارند (۷). سلول‌های رده K562 ویژگی‌های لنفوسیتی و هیچگونه ایمنوگلوبین سطحی ندارند (۸). آپوپتوز به خودکشی برنامه‌ریزی شده ژنتیکی سلول گفته می‌شود که بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش مهمی ایفا می‌کند. اغلب مولکول‌ها و مسیرهای سیگنالی درگیر در این فرایند به خوبی شناخته شده‌اند. مرگ سلولی نقشی مهم و اساسی در کنترل فیزیولوژیک طبیعی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می‌کند (۹). یکی از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی توانایی‌شان در گریز از آپوپتوز می‌باشد که نتیجه‌ی آن بلوکه کردن مسیر سیگنالی مرگ سلولی است (۱۰). اختلال در مسیر آپوپتوز هم می‌تواند موجب متاستاز تومور و هم مقاومت به داروهای ضد سرطانی شود. از طرف دیگر آپوپتوز نقش مهمی در درمان سرطان ایفا می‌کند، چون یک هدف عام بسیاری از استراتژی‌های درمانی است (۱۱). به طوری که هدف مهم پیشرفت داروهای ضد سرطانی و شیمی درمانی آسان کردن آپوپتوز در سلول‌های نئوبلاستیک است (۱۰). نیتروگلیسیرین اولین بار توسط ویلیام مورل برای درمان حمله‌های گلو درد در سال ۱۸۷۸ استفاده شد که ساختمانش نیز در همان سال کشف شد (۱۲). نیتروگلیسیرین به گروه داروهای نیترات تعلق دارد که شامل تعداد زیادی نیرات‌های دیگر شبیه ایزوسورباید دی‌نیترات (ایزوردیل وایزوسورباید مونونیترات است. این عوامل همگی اثرات شان توسط تبدیل شدن به اکسیدنیتریک در بدن توسط آلدهید دهیدروژناز میتوکندریایی اعمال می‌شود (۱۳) و نیتریک‌اکسید یک متسع کننده قوی طبیعی است. در پزشکی که عموماً گلیسیریل تری نیترات، نیتروگلیسیرین نامیده می‌شود. به عنوان یک دارو برای آنژین صدری استفاده می‌شود که توسط جریان خون و اکسیژن ناکافی به قلب ایجاد می‌شود. نیتروگلیسیرین عدم تعادل بین جریان اکسیژن و خون به قلب را اصلاح می‌کند (۱۴). نیتروگلیسیرین به نیتریک‌اکسید (NO) تبدیل می‌شود که با تبدیل به نیترات و سپس از طریق رها کردن NO که گشادکننده قوی عروق است برای کنترل فشار خون و درمان نارسایی قلبی مزمن استفاده می‌شود؛ لذا از طریق ایجاد رادیکال آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو تأثیر خود در سلول‌ها ایجاد می‌کند (۱۵).

روش بررسی:

ابتدا یک عدد فلاسک T25 حاوی رده‌ی سرطانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (C122) تهیه شده و کشت شد. هنگامی که محیط کشت سلول‌ها مصرف و رنگ آن زرد گردید، به این مفهوم است که رشد سلول‌ها به قدری بوده که تمام سطح فلاسک را پوشانده و لازم است که محیط تعویض شود. سلول‌های K562 در داخل فلاسک به صورت شناور هستند و برای تعویض محیط کشت آن‌ها نیاز به سانتریفوژ می‌باشد. برای تعویض محیط کشت، ابتدا فلاسک از انکوباتور خارج و در زیر هود با استفاده از پیپت‌گیر اتوماتیک و پیپت استریل محتویلت فلاسک خارج شده و به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید؛ سپس لوله‌ها با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ مایع رویی در زیر هود دور ریخته شد. سلول‌های باقی مانده در ته فالکون به همراه محیط کشت RPMI 1640 و ۱۰٪ سرم جنین‌گاوی به فلاسک‌های جدید جهت کشت دادن جدید منتقل شدند و سپس در انکوباتور CO_2 گذاشته شدند (۱۶).

برای تهیه‌ی غلظت‌های مختلف داروی نیتروگلیسیرین داروی مورد نظر از داروخانه تهیه

Archive of SID
www.SID.ir

گردید، در مرحله بعد قرص‌ها را با هاون پودر کردیم. با توجه به وزن ملکولی دارو و غلظت‌های مورد نظر از دارو (در غلظت‌های ۲۵،۵۰،۷۵ و ۱۰۰) مقدار مورد نظر را وزن کرده و در ۱ میلی‌لیتر DMSO و متانول حل گردید؛ سپس ۲ میکرولیتر از محلول تهیه شده را در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت خالی حل می‌کنیم. بدین ترتیب غلظت‌های مورد نظر تهیه شد. برای سنجش MTT جهت بررسی سیتوتوکسی نیتروگلیسیرین پس از سانتریفوژ و شمارش سلول‌های K562 به روش تریپان‌بلو، مقدار ۵۰ میکرولیتر (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMA به همراه ۱۵٪ FBS) به هر یک از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد؛ سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف داروی نیتروگلیسیرین به چاهک‌ها اضافه گردید (هر تیمار در سه چاهک تکرار شد). برای هر یک از نمونه‌های کنترل (بدون تیمار) و DMSO نیز (۲ میکرولیتر DMSO در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت) ۶ تکرار انجام شد. در مرحله‌ی بعد پلیت‌ها به طور جداگانه به مدت ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و در حضور ۵٪ CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۳-۴ و ۵ دی‌متیل‌تیازول ۲-۵ دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و میکروپلیت به مدت ۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیاء کرده و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازون در می‌آورد. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازون تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک‌ها و قراردادن پلیت‌ها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده ازدستگاه الایزا ریدر (استات فاکس، آمریکا) (شکل زیر) ثبت گردید. درصد سلول کشی غلظت های مختلف دارو با فرمول زیر محاسبه گردید(۱۷).

$$\text{درصد سلول کشی} = \left[OD\text{کنترل} \div OD\text{نمونه}\right] \times ۱۰۰$$

برای سنجش میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های K562 به روش ژل الکتروفورز DNA ابتدا باید سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف دارو تیمار شوند. برای این منظور ابتدا سلول‌های K562 از داخل فلاسک برداشت و با استفاده از تریپان بلو شمارش شدند. سوسپانسیون سلولی همراه محیط کشت و ۱۰ ٪ (FBS= Fetal Bovine Serum) تهیه شد. درون هر فلاسک T25 از این سوسپانسیون حاوی ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر، ریخته شد. غلظت IC_{50} نیتروگلیسیرین به فلاسک‌ها اضافه و یک فلاسک هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد حاوی ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، سلول‌های موجود در هر فلاسک به صورت مجزا در میکروتیوپ‌های یک میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند تا استخراج DNA از آن‌ها صورت بگیرد (۱۸). برای استخراج DNA برای سلول‌های تیمار داده‌شده ابتدا بافر لیز سلولی شامل ۲۵ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (Nacl)، ۱۰ میلی‌مولار Tris بازی و سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱٪ تهیه شده و pH آن برابر با ۸ تنظیم شد. سلول‌های تیمار داده شده توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در ته میکروتیوپ جمع آوری و دو بار توسط بافر PBS شستشو داده شدند؛ سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی به هر میکروتیوپ اضافه و به همراه ۱۵ میکرولیتر پروتئیناز K در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه انکوبه شدند؛ سپس نمونه‌ها با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی در میکروتیوپ جدید ریخته شد و به اندازه‌ی حجم سلول‌ها محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به هر نمونه اضافه و آن ها را ورتکس

Archive of SID
www.SID.ir

کرده، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند؛ سپس مایع رویی در میکروتیوپ جدید برداشته شده که حاوی DNA می‌باشد و مایع پروتئین لزج پایین که توسط فنل حل شده است، دور ریخته می‌شود. البته در صورت لزوم این مرحله را می‌توان سه بار تکرار کرد؛ سپس به اندازه حجم سلول‌ها اتانول و ۵۰ میکرولیتر نمک ۶ مولار به آن‌ها اضافه شد. وجود DNA با ظاهر شدن یک حلقه ابر مانند در محلول پدیدار گردید. نمونه‌ها به مدت یک شب در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفتند تا اسید نوکلئیک استخراج شده ته‌نشین گردد؛ سپس با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتیگراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله‌ی بعدی شستشو توسط الکل ۷۰٪، صورت گرفت (سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد). مایع رویی دور ریخته شد و DNA های استخراج شده در انکوباتور ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد خشک شدند و در خاتمه ۳۰ میکرولیتر بافر TE به آن‌ها اضافه گردید (۱۹).

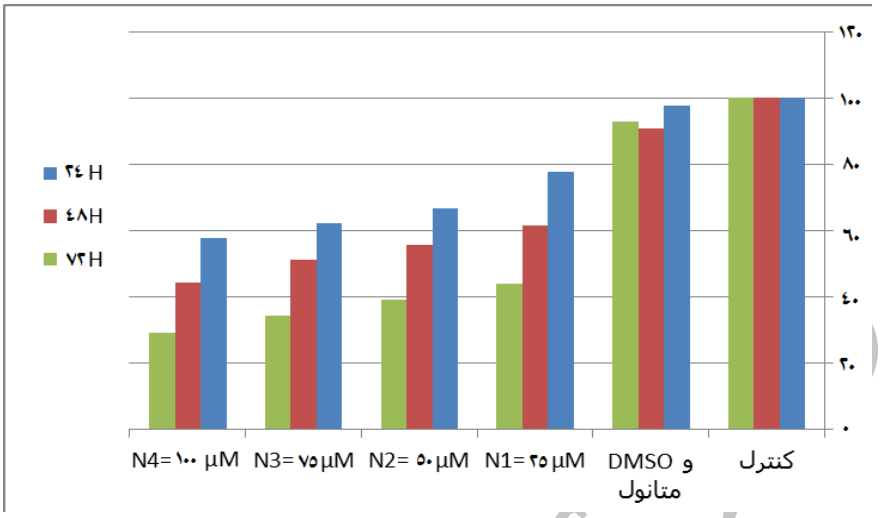
برای الکتروفورز DNA پس از حل شدن DNA استخراج شده توسط بافر TE (حاوی ۱۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۰/۲ میلی‌مولار Na2EDTA و ۷/۵ =pH)، ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها با حدود ۲ میکرولیتر بافر لودینگ مخلوط شدند و بر ژل مورد نظر (ژل ۱٪) تزریق شدند؛ سپس توسط الکترودهای منفی و مثبت به جریان برق با ولتاژی حدود ۸۰ ولت وصل شدند (باید دقت شود که جهت جریان از منفی به مثبت باشد). بعد از اطمینان از برقراری جریان، روی تانک الکتروفورز پوشانده شد و به مدت ۱ ساعت به نمونه‌ها اجازه داده شد که روی ژل و درون بافر TBE حرکت کنند که بر حسب وزن موجود خود ایجاد باند نمودند. در نهایت توسط دستگاه، عکس‌برداری از ژل‌ها صورت گرفت (۲۰). جهت رنگ‌آمیزی Hoechst برای بررسی مرگ سلولی ابتدا به هر یک از ۱۶ چاهک، از پلیت ۲۴ خانه‌ای یک میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰٪ FBS ریخته شد و سپس یک میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نیتروگلیسیرین و غلظت IC_{50} دارو به چاهک‌ها افزوده گردید. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محتویات هر چاهک به میکروتیوپ انتقال یافت و در ۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. محتویات رویی دور ریخته شد و روی رسوب ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر متانول جهت فیکس کردن سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه گذاشته شد؛ سپس دوباره سانتریفوژ شد. روی رسوب سلولی ۵۰ میکرولیتر بافر PBS و ۲ میکرولیتر رنگ Hoechst رقیق شده (یک میکرولیتر Hoechst و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS) افزوده شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بار دیگر سانتریفوژ شده و روی رسوب ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS افزوده گردید و کاملاً به هم زده شد تا محتویات یکنواختی به دست آید. یک قطره از نمونه‌های به دست آمده را روی لام گذاشته و روی آن لامل قرار می‌دهیم. لام‌های تهیه شده را به زیر میکروسکوپ فلوئورسانس برده و با فیلتر با بزرگنمایی ۱۰۰ آن ها را مشاهده کرده و عکس می گیریم (۲۰).

یافته ها:

بررسی فعالیت سلول کشی غلظت‌های مختلف نیتروگلیسیرین، یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که نمونه‌های تیمار شده با نیتروگلیسیرین در مقایسه با گروه شاهدکه هیچ دزی از نیتروگلیسیرین را دریافت نکرده بودند، دارای فعالیت سلول‌کشی هستند؛ همچنین بر اساس این نتایج با افزایش غلظت نیتروگلیسیرین، میزان سلول‌کشی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد، پس می‌توان گفت که فعالیت سلول‌کشی نیتروگلیسیرین وابسته به دوز می‌باشد؛ همچنین فعالیت سلول‌کشی نیتروگلیسیرین وابسته به زمان می‌باشد و با گذر زمان، فعالیت سلول‌کشی افزایش می‌یابد. این حالت در تمامی زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت مشاهده می‌گردد (نمودار شماره ۱). بیشترین اثر در ۷۲ ساعت و غلظت

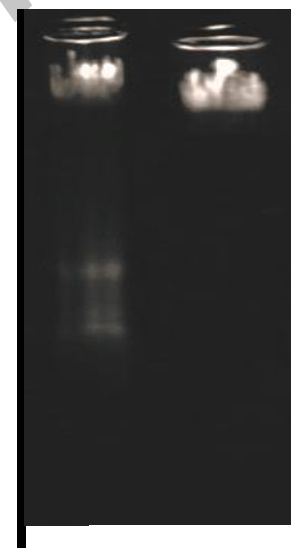
Archive of SID
www.SID.ir

۱۰۰ میکرومولار مشاهده گردید که اثر سایتوتوکسیک آن ۷۴/۷۰٪ می‌باشد. همچنین IC_{50} نیتروگلیسیرین برابر با ۷۹ میکرومولار توسط نرم افزار Compusyn نشان داده شد.



نمودار شماره ۱: مقایسه‌ی میزان زنده مانی غلظت‌های مختلف نیتروگلیسیرین بر روی سلول‌های K562

نتایج حاصل از الکتروفورز سلول‌های K562 تیمار شده با داروی نیتروگلیسیرین به مدت ۷۲ ساعت را می‌توان در تصویر شماره ۱ مشاهده نمود. نتایج نشان می‌دهد که داروی نیتروگلیسیرین موجب ایجاد باند و اسمیر در سلول‌های K562 می‌شود؛ بنابراین باعث مرگ سلولی از طریق القای آپوپتوز می‌شود.

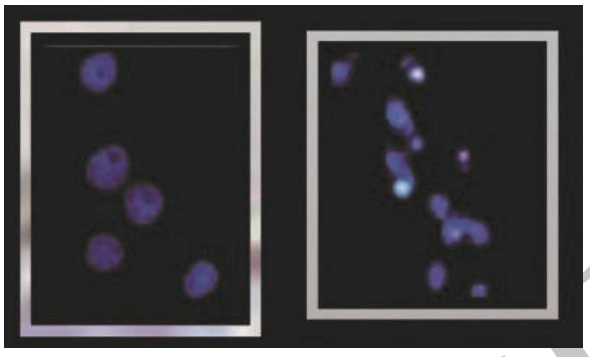


تصویر شماره ۱: بررسی وضعیت مرگ سلولی، سلول‌های K562 تحت تیمار با نیتروگلیسیرین بعد از ۷۲ ساعت، چاهک سمت راست. کنترل چاهک سمت چپ.

Archive of SID

www.SID.ir

تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در سلول‌های تیمار شده توسط رنگ‌آمیزی با رنگ Hoechst نشان دهنده‌ی آپوپتوز سلولی می‌باشد؛ بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که نیتروگلیسیرین موجب القای آپوپتوز می‌شود (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: سلول‌های k562 رنگ‌آمیزی شده با **Hoechst** زیر میکروسکوپ فلورسانس. راست: سلول‌های بدون تیمار، چپ: سلول‌های تیمار شده با نیتروگلیسیرین.

بحث:

اثرات نیتروگلیسیرین به عنوان تسهیل کننده جریان خون و همچنین داروهای نفوذ پذیر کننده عروق در تومورهای توپر بدون در نظر گرفتن محل کاربرد داروی نیتروگلیسیرین را فاش می کند که تأثیر آن مشابه سکته قلبی است، هر جا که اتساع عروق برای اولین بار در بافت قلبی هیپوکسیک مشاهده می‌شود. نیتروگلیسیرین تغییر یافته به NO در تومور هیپوکسیک نسبی ممکن است آسیب بیوشیمیایی مشابه بافت قلبی باشد؛ همچنین گزارش شده است که ایزوسوربیت‌دی‌نیترات (ISDN) بخش O_2 (Po2) در تومورها را به علت افزایش جریان خون افزایش می دهد. به علاوه NO تغییر یافته از نیترات سلول تومور، همانگونه که قبلاً توسط بعضی محققین نشان داده شده بود، به رادیوتراپی حساس می شود (۲۱)؛ همچنین در تحقیق دیگری گزارش کردند که در تومورها، تولید NO از نیترات تحت شرایط اسیدی/ هیپوکسیک مشاهده شده، فشار جزئی O_2 تومور کبد پیوند شده را افزایش می‌دهد. افزایش معنی‌دار القای رهایی داروی ماکرومولکولی توسط نیتروگلیسیرین یک پدیده‌ی وابسته به دز بود که حتی در غلظت کمتر از موش/ نیتروگلیسیرین mg ۰/۰۰۱ مشاهده شد. مهم‌تر از آن، مقدار داروی رها شده برلی القای شیمیایی تومورهای پستان در رت‌ها مشابه سرطان پستان نرمال است؛ همچنین نشان می‌دهد که اثر نفوذپذیری و احتباس افزایش می‌یابد. نیتروگلیسیرین به طور معنی‌داری جریان خون در تومورها را افزایش می‌دهد و نه تنها القا کننده افزایش رهایی دارو است. بلکه همچنین بیان بسیاری از ژن‌ها را که احتمالاً کمک به رشد تومور می‌کند، مانند شرایط هیپوکسیک عادی را کاهش می‌دهد (۲۲). در مطالعه دیگری گزارش کردند که نیتروگلیسیرین حساسیت تومورها برای شیمی درمانی را با افزایش جریان خون تومورهای هیپوکسیک افزایش می‌دهد؛ همچنین آن ها اخیراً به طور قابل توجهی فواید کلینیکی مفید ترکیبات نیترو را تأیید می‌کنند، بنابراین درمان ترکیبی با نیتروگلیسیرین ممکن است، اثر شیمی‌درمانی فزاینده‌ی معنی‌داری به وسیله چندین مکانیسم داشته باشد (۲۳)؛ بنابراین در مطالعه حاضر اثر

Archive of SID
www.SID.ir

داروی نیتروگلیسیرین بر رشد رده سلول‌های K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بررسی شد. نتایج نشان داد که نیتروگلیسیرین در تمامی غلظت‌ها و زمان‌های بررسی شده، توانست به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) رشد سلول‌های سرطانی را مهار نماید و این اثر مهاری وابسته به دوز و زمان بوده که با افزایش زمان و دوز بیشترین اثر مشاهده گردید. مرور منابع علمی نشان می‌دهد که اثر نیتروگلیسیرین روی سلول های K562 تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است و بر اساس نتایج، اثر نیتروگلیسیرین با مطالعات مشابه انجام شده در این زمینه همخوانی دارد. نتایج نشان می‌دهد که نیتروگلیسیرین در تمامی غلظت‌ها و زمان‌ها به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) موجب مهار رشد سلولی می‌گردد و اثر داروی مذکور وابسته به زمان و دوز می‌باشد. به طوری که در بیشترین غلظت و ۷۲ ساعت بیشترین اثر را می‌توان مشاهده کرد.

نتیجه گیری:

بر اساس بررسی‌ها و مطالعات انجام شده نیتروگلیسیرین می‌تواند در پیشگیری و کاهش سرطان موثر واقع شود. در این تحقیق، نتایج نشان داد که نیتروگلیسیرین دارای خاصیت ضدتوموری می‌باشد و همچنین نتایج نشان داد که این دارو موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود، ولی برای بررسی‌های بیشتر و پی بردن به مکانیسم دقیق، نیازمند تحقیقات بیشتر و دقیق‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

در پایان از تمامی عزیزانی که در تمام مراحل این مطالعه که در تاریخ ۱۳۹۳/۸/۱ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران به ثبت رسیده است، ما را حمایت و یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

منابع:

1. Zand AM, Imani S, Saadati M, Borna H, Ziyaii R, Honari H. Effect of age, sex and blood group on indicate of leukemia. kowsar Med J. 2014; 15(2): 111-114.
2. Kwan JM, Fialho AM, Kundu M, Thomas J, Hong CS, Gupta TKD, et al. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. Leuk Res. 2009; 33(10): 1392-9.
3. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD^{4+} T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. Blood. 1996; 88(9): 3522-7.
4. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007; 8(11): 1018-29.
5. Jagelska E, Brazda V, Pospisilova S, Vojtesek B, Palecek E. New ELISA technique for analysis of p53 protein/DNA binding properties. J Immunol Methods. 2002; 267(2): 227-35.
6. Bonyadi F. Comparison of effect of cytoplasmic extracts and cell wall of sacaromyses servisie as a probiotics on K562 cell line [dissertation]. Iran: University of Urmia; 2011.
7. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. Int J Cancer. 1976; 18(4): 421-31.
8. Koeffler H, Golde D. Human myeloid leukemia cell lines: A review. Blood. 1980; 56(3): 344-50.
9. Han S-I, Kim Y-S, Kim T-H. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. BMB report. 2008; 41(1): 1-10.
10. Meng XW, Lee SH, Kaufmann SH. Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? Curr Opin Cell Biol. 2006; 18(6): 668-76.
11. Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2011; 30(1): 87.

Archive of SID
www.SID.ir

12. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, et al. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(34): 12159-64.
13. Di Carlo FJ. Nitroglycerin revisited: chemistry, biochemistry, interactions. Drug Metab Rev. 1975; 4(1): 1-38.
14. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, et al. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(34): 12159-64.
15. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. EMBO J. 2001; 20(23): 6877-88.
16. Forstermann U, Ishii K. Methods in nitric oxide research. New York: John Wiley; 1996, pp. 555–566.
17. 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(4): 391-8.
18. Maroufi B, Kaboudanian Ardestani S, Kariminia A, Naderimanesh H. The effect of vitamin e on splenocytes apoptosis of gamma-irradiated BALB/c mice. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2005; 4(2): 77-82.
19. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. J Leukoc Biol. 1993; 54(4): 283-8.
20. Vondracek J, Stika J, Soucek K, Minksova K, Blaha L, Hofmanova J, et al. Inhibitors of arachidonic acid metabolism potentiate tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis in HL-60 cells. Eur J Pharmacol. 2001; 424(1): 1-11.
21. Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M. Valproic acid molecular lead to multiple regulatory pathways. Folia Biol. 2007; 53(2): 37-49.
22. Chiu CT, Wang H, Chuang. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. Pharmacol Rev. 2013; 65(1): 105-42.
23. Seki T, Fang J, Maeda H. Enhanced by delivery of macromolecular antitumor drugs to tumor by nitroglycerin application. Cancer Sci. 2009; 100(12): 2426-30.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016 Feb, Mar; 17(6): 83-91. *Review article*

Antitumor effects of nitroglycerin drug on K562 cells

Aalaei Sh[1*], Mohammadzadeh M[2], Pazhang Y[2]
[1]Student, Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran; [2]Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.
Received: 17/May/2015 Accepted: 9/Aug/2015

Background and aims: Leukemia is cancer of blood-forming tissues which derives from red and white blood progenitors cells. According to the needs of body, red and white blood cells usually grow, and divide with a controlled and regulated way, But in the leukemia, this process is disrupted, and it makes the growth of blood cells control aside. Nitroglycerin through changes to nitric oxide (NO), and increasing of NO cellular oxidative stress cause induces apoptosis of cancer cells. This study was performed to survey the antitumor effects of nitroglycerin drug on K562 cells in vitro.
Methods: First, The leukemia cells K562 category was cultured in RPMI 1640 with 10% of heat-inactivated fetal calf serum. Then, different concentrations of nitroglycerin drug were prepared, and their antitumor properties at 24, 48 and 72 hours after treatment were measured by MTT method. Then, the drugs IC_{50} were measured. In the next stage, in order to survey the apoptotic effect, electrophoresis and staining with Hoechst colors were used.
Results: The results showed that the antitumor impacts of nitroglycerin dependently increase in a dose, and time. The IC50 of nitroglycerin was observed at 79 (µmol /ml). Also, the results of electrophoresis and staining showed that these drugs have the effect of apoptosis.
Conclusion: Based on the results, it can be inferred that inhibitory effect of nitroglycerin on K562 cells depends on time, and dose which the maximum inhibitory effect observed after 72 hours of treatments of the highest concentration. So, this drug may be effective in the prevention, and treatment of chronic leukemia.

Keywords: **Nitroglycerine, Cytotoxicity, K562 cell, Apoptosis.**

Archive

Cite this article as: Aalaei SH, Mohammadzadeh M, Pazhang Y. Antitumor effects of nitroglycerin drug on K562 cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(6): 83-91.

[*]**Corresponding author:**
Student, Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran. Tel: 00989145929602, E-mail: shahin_aalaei@yahoo.com

www.SID.ir