

اثرات ضد توموری داروی نیتروگلیسیرین روی سلول های K562

شهین اعلائی^{۱*}، مهدی محمدزاده^۲، یعقوب پاژنگ^۲

^۱دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛ گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۷

چکیده:

زمینه و هدف: لوسمی، سرطان بافت های خون ساز بدن می باشد که از سلول های پیش ساز گلبول های قرمز و سفید خون مشتق می شود. گلبول های قرمز و سفید خونی معمولاً در صورت نیاز بدن، به طریقی منظم و کنترل شده رشد می کنند و تقسیم می شوند؛ اما در بیماری لوسمی در این روند اختلال ایجاد شده و رشد سلول های خونی از کنترل خارج می شود. نیتروگلیسیرین از طریق تبدیل به نیتریک اکسید (NO) و بالابردن استرس اکسیداتیو موجب القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود. 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 سلول های لوسمی رده K562 در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی غیر فعال شده کشت داده شد؛ سپس غلظت های مختلف داروی نیتروگلیسیرین تهیه و خاصیت سیتوتوکسیته آن در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار به روش MTT سنجیده شد؛ سپس IC₅₀ داروها برآورد شد و در مرحله بعد برای بررسی آپوپتوز از الکتروفورز و رنگ آمیزی Hoechst استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که اثرات ضد توموری نیتروگلیسیرین به صورت وابسته به دوز و زمان افزایش می یابد. IC₅₀ نیتروگلیسیرین در ۷۹ μm/ml مشاهده شد؛ همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز و رنگ آمیزی سلول ها نیز نشان داد که این داروها دارای اثر آپوپتوزی بود.

نتیجه گیری: از نتایج به دست آمده می توان چنین استنباط کرد که اثر مهارتی نیتروگلیسیرین بر روی سلول های K562 وابسته به زمان و دوز می باشد که بیشترین اثر مهارتی 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:

دو طرفه بین ژن ab1 در کروموزوم ۹ و ژن bcr موجود در کروموزوم ۲۲ در سلول های بنیادی چند توانی به وجود می آید. نتیجه این جابجایی کروموزومی منجر به شکل گیری ژن الحاقی Abl-Bcr می شود (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 می باشد که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم می باشد. این پروتئین باعث تکثیر بی رویه سلول های رده میلوئیدی و اختلال در مرگ

لوسمی یا سرطان خون یکی از انواع شایع و مهلک سرطان ها است (۱). لوسمی، سرطان بافت های خون ساز بدن، شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی بوده و توسط سلول های سفید خون و لنف به وجود می آید. گلبول های 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 سلول های خونی از کنترل خارج می شوند (۲). لوسمی میلوئید مزمن یکی از شناخته شده ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابجایی

برنامه ریزی سلولی (آپوپتوزیس) می‌گردند (۵،۴). رده سلول‌های سرطانی K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشاء میلوئیدی هستند که برای اولین بار از یک خانم ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جداسازی شده است. این رده‌ها جزو اریترولوکیما هستند که بر اثر همراهی با ویروس اپشتاین‌بار و مارکرهای سلولی لنفوسیتی تمایز یافته‌اند، به دست 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 نئوپلاستیک 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 نیترات‌های دیگر شبیه ایزوسورباید دی‌نیترات (ایزوردیل و ایزوسورباید مونونیترات است. این عوامل همگی اثرات شان توسط تبدیل شدن به اکسیدنیتریک در بدن توسط آلدئید 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 پیت گیر اتوماتیک و پیت استریل محتویات 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 فالكون به همراه محیط کشت RPMI 1640 و ۱۰٪ سرم جنین گاوی به فلاسک‌های جدید جهت کشت دادن جدید منتقل شدند و سپس در انکوباتور CO₂ گذاشته شدند (۱۶). برای تهیه‌ی غلظت‌های مختلف داروی نیتروگلیسیرین داروی مورد نظر از داروخانه تهیه

گردید. درصد سلول کشی غلظت های مختلف دارو با فرمول زیر محاسبه گردید(۱۷).

$$\times 100 = \left[\frac{OD_{\text{کنترل}} - OD_{\text{نمونه}}}{OD_{\text{کنترل}}} \right] \times 100$$

برای سنجش میزان آپوپتوز و نکروز سلول های K562 به روش ژل الکتروفورز DNA ابتدا باید سلول های K562 با غلظت های مختلف دارو تیمار شوند. برای این منظور ابتدا سلول های 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 2×10^6 سلول در میلی لیتر، ریخته شد. غلظت IC_{50} نیتروگلیسرین به فلاسک ها اضافه و یک فلاسک هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتیگراد حاوی ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، سلول های موجود در هر فلاسک به صورت مجزا در میکروتیوپ های یک میلی لیتری جمع آوری شدند تا استخراج DNA از آن ها صورت بگیرد (۱۸). برای استخراج DNA برای سلول های تیمار داده شده ابتدا بافر لیز سلولی شامل ۲۵ میلی مولار EDTA، ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم (NaCl)، ۱۰ میلی مولار Tris بازی و سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱٪ تهیه شده و pH آن برابر با ۸ تنظیم شد. سلول های تیمار داده شده توسط سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در ته میکروتیوپ جمع آوری و دو بار توسط بافر PBS شستشو داده شدند؛ سپس ۵۰۰ میکرو لیتر بافر لیز سلولی به هر میکروتیوپ اضافه و به همراه ۱۵ میکرو لیتر پروتئیناز K در ۳۷ درجه ی سانتیگراد به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه انکوبه شدند؛ سپس نمونه ها با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی در میکروتیوپ جدید ریخته شد و به اندازه ی حجم سلول ها محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به هر نمونه اضافه و آن ها را ورتکس

گردید، در مرحله بعد قرص ها را با هاون پودر کردیم. با توجه به وزن ملکولی دارو و غلظت های مورد نظر از دارو (در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰) مقدار مورد نظر را وزن کرده و در ۱ میلی لیتر DMSO و متانول حل گردید؛ سپس ۲ میکرو لیتر از محلول تهیه شده را در ۱ میلی لیتر محیط کشت خالی حل می کنیم. بدین ترتیب غلظت های مورد نظر تهیه شد. برای سنجش MTT جهت بررسی سیتوتوکسی نیتروگلیسرین پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول های K562 به روش تریپان بلو، مقدار ۵۰ میکرو لیتر (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMa به همراه ۱۵٪ FBS) به هر یک از چاهک های ۹۶ خانه ای ته صاف اضافه شد؛ سپس ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت حاوی رقت های مختلف داروی نیتروگلیسرین به چاهک ها اضافه گردید (هر تیمار در سه چاهک تکرار شد). برای هر یک از نمونه های کنترل (بدون تیمار) و DMSO نیز (۲ میکرو لیتر DMSO در ۱ میلی لیتر محیط کشت) ۶ تکرار انجام شد. در مرحله ی بعد پلیت ها به طور جداگانه به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتیگراد و در حضور ۵٪ CO_2 گرم خانه گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۲۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۳-۴ و ۵ دی متیل تیزول ۲-۵ دی فنیل تترازولیم بروماید، ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بافر PBS) به تمامی چاهک ها افزوده شده و میکرو پلیت به مدت ۴ ساعت گرم خانه گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیاء کرده و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازون در می آورد. در پایان کریستال های بنفش رنگ فورمازون تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول ها با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO خالص به چاهک ها و قراردادن پلیت ها 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 از دستگاه الایزا ریدر (استات فاکس، آمریکا) (شکل زیر) ثبت

و سپس یک میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نیتروگلیسیرین و غلظت IC₅₀ 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 فلئورسانس برده و با فیلتر با بزرگنمایی ۱۰۰ آن‌ها را مشاهده کرده و عکس می‌گیریم (۲۰).

یافته‌ها:

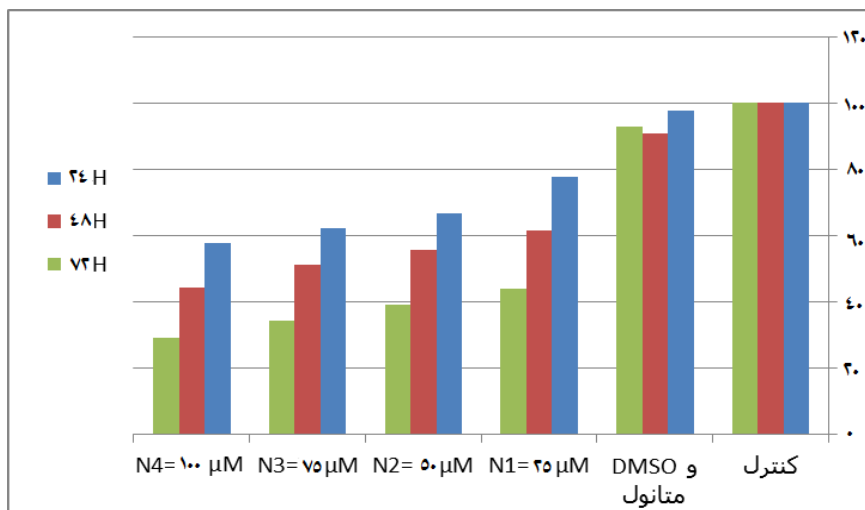
بررسی فعالیت سلول کشی غلظت‌های مختلف نیتروگلیسیرین، یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که نمونه‌های تیمار شده با نیتروگلیسیرین در مقایسه با گروه شاهد که هیچ دزی از نیتروگلیسیرین را دریافت نکرده بودند، دارای فعالیت سلول کشی هستند؛ همچنین بر اساس این نتایج با افزایش غلظت نیتروگلیسیرین، میزان سلول کشی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد، پس می‌توان گفت که فعالیت سلول کشی نیتروگلیسیرین وابسته به دوز می‌باشد؛ همچنین فعالیت سلول کشی نیتروگلیسیرین وابسته به زمان می‌باشد و با گذر زمان، فعالیت سلول کشی 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

کرده، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند؛ سپس مایع رویی در میکروتیوپ جدید برداشته شده که حاوی DNA می‌باشد و مایع پروتئین لزوج پایین که توسط فلن 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 ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتیگراد سانتریفوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله‌ی بعدی شستشو توسط الکل ۷۰٪، صورت گرفت (سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm 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 pH= ۷/۵)، 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، عکس برداری از ژل‌ها صورت گرفت (۲۰). جهت رنگ آمیزی Hoechst برای بررسی مرگ سلولی ابتدا به هر یک از ۱۶ چاهک، از پلیت ۲۴ خانه‌ای یک میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰٪ FBS ریخته شد

برابر با ۷۹ میکرومولار توسط نرم افزار Compusyn نشان داده شد.

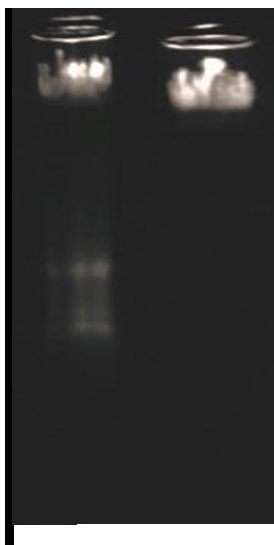
۱۰۰ میکرومولار مشاهده گردید که اثر سایتوتوکسیک آن ۷۴/۷۰٪ می باشد. همچنین IC_{50} نیتروگلیسرین



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

می‌دهد که داروی نیتروگلیسرین موجب ایجاد باند و اسمیر در سلول‌های K562 می‌شود؛ بنابراین باعث مرگ سلولی از طریق القای آپوپتوز می‌شود.

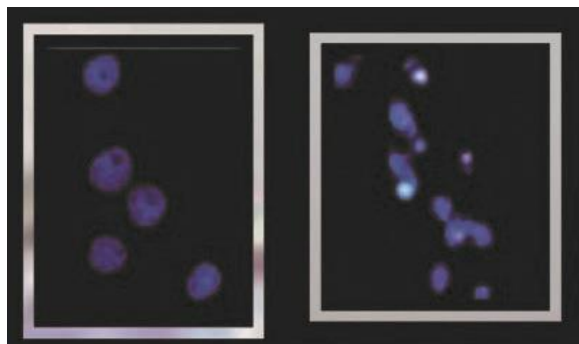
نتایج حاصل از الکتروفورز سلول‌های K562 تیمار شده با داروی نیتروگلیسرین به مدت ۷۲ ساعت را می‌توان در تصویر شماره ۱ مشاهده نمود. نتایج نشان



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

بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که نیتروگلیسیرین موجب القای آپوپتوز می‌شود (تصویر شماره ۲).

تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در سلول‌های تیمار شده توسط رنگ آمیزی با رنگ Hoechst نشان دهنده‌ی آپوپتوز سلولی می‌باشد؛



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

بحث:

پدیده‌ی وابسته به دز بود که حتی در غلظت کمتر از ۰/۰۰۱ mg /نیتروگلیسیرین 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 آن‌ها 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

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 می‌کند که تأثیر آن مشابه سخته 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 می‌دهد. به علاوه NO تغییر یافته از نیترات سلول تومور، همانگونه که قبلاً توسط بعضی محققین نشان داده شده بود، به رادیوتراپی حساس می‌شود (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

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.

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 ($P < 0.05$) رشد سلول‌های سرطانی را مهار نماید و این اثر مهار و 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 سلول‌های 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 ($P < 0.05$) 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.

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, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD⁴⁺ 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 *saccharomyces 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.

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.

Antitumor effects of nitroglycerin drug on K562 cells

Aalaei Sh^{1*}, Mohammadzadeh M², Pazhang Y²

¹Student, Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran; ²Biology 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 IC₅₀ 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.

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