



Investigation of toxicity effect of 4-MePgC and 4-No2pgC two derivatives dihydropyrano [2,3-g] chromene on the K562 cell line (chronic myeloid leukaemia)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Asgari F.¹ MSc,
Mahinpour R.^{*1} PhD,
Haghighipour N.^{*2} PhD,
Moradi L.³ PhD

How to cite this article

Asgari F, Mahinpour R, Haghighipour N, Moradi L. Investigation of toxicity effect of 4-MePgC and 4-No₂pgC two derivatives dihydropyrano [2,3-g] chromene on the K562 cell line (chronic myeloid leukaemia). Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 193-200.

¹Biotechnology Department, Chemistry Faculty, University of Kashan, Kashan, Iran

²National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³Organic Chemistry Department, Chemistry Faculty, University of Kashan, Kashan, Iran

*Correspondence

Mahinpour R.: Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Faculty, University of Kashan, Qotb-e Randa Boulva-rd, Kashan, Iran. Postal Code: 8731-753153

Phone: +98 (21) 22586539

Fax: -

mahinpur@kashanu.ac.ir

Haghighipour N.: National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, No. 69, Pasteur Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1316943551

Tel: +98 (21) 66492595

Fax: -

haghighipour@pasteur.ac.ir

Article History

Received: October 18, 2017

Accepted: March 6, 2018

ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant blood disease with a particular chromosomal aberration and it is known as a common form of leukemia. Chromene family exhibit strong anti-cancer effects. Therefore, in this study, the effect of two derivatives of dihydro-pyrano [2, 3-g] chromene family is investigated on cell toxicity and apoptosis induction in K562 cancer cells and compared them with Peripheral Blood Mononuclear (PBMC) normal cells. The K562 cell line was cultured in the presence of the mentioned chromene derivatives at a concentration of 40-200 μ M for 24-72 hours. The effect of these compounds on growth and viability of K562 cell line and PBMC cells were studied via MTT assay and apoptosis induction was investigated by flow cytometry. The results showed that these chromene derivatives inhibit K562 cell line growth. Moreover, increasing the chromene concentration and the time of exposure to it increase the cell toxicity. Among these compounds, 4-No₂pgC was known as a compound with high toxicity (IC₅₀=129 $\pm$ 2.75) and 4-MePgC recognized as a compound with low toxicity (IC₅₀=214 $\pm$ 3.42) after 72 hours exposure to the K562 cell line. Furthermore, the results of flow cytometry demonstrated the effect of apoptosis induction of these compounds on the K562 cell line. According to the obtained results from this research, chromene derivatives can induce apoptosis in the K562 cell line and these compounds have a less toxic effect on normal cells than cancer cells. In conclusion, these derivatives can be considered as a proper candidate for the treatment of leukemia.

Keywords Chronic Myeloid Leukemia; Dihydro-pyrano [2, 3-g] Chromene; Toxicity; Apoptosis

CITATION LINKS

[1] The molecular biology of chronic myeloid leukemia [2] Biological importance of structurally diversified chromenes [3] Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution [4] BCR/ABL genes and leukemic phenotype: From molecular mechanisms to clinical correlations [5] Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay [6] Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors [7] An improved procedure for the three-component synthesis of benzo[g]chromene derivatives using basic ionic liquid [8] 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 [9] Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents [10] Sodium saccharin as an effective catalyst for rapid one-pot pseudo-five component synthesis of dihydropyrano[[2,3-g]]chromenes under microwave irradiation [11] Mitochondrial gateways to cancer [12] Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells [13] Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity [14] Induction of apoptosis through tubulin inhibition in human cancer cells by new chromene-based chalcones [15] Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by the derivative (3-NpC) from dihydro-pyranochromenes family [16] Synthesis and Characterization of Novel 2-Amino-Chromene-Nitriles that Target Bcl-2 in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines [17] Dose-dependent suppression of DNA synthesis in vitro as a predictor of clinical response in adult acute myeloblastic leukemia [18] No reduction of alpha-tocopherol quinone by glutathione in rat liver microsomes

بررسی اثر سمیت 4-No₂pgC و 4-MePgC دو مشتق از خانواده دی‌هیدروپیرانو [2,3-g] کرومن بر رده سلولی K562 (لوسمی میلوئید مزمن)

فاطمه عسگری MSc

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

رویا مهین‌پور* PhD

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

نوشین حقیقی‌پور* PhD

بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

لیلا مرادی PhD

گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

چکیده

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یک بیماری بدخیمی خونی همراه با نوعی اختلال کروموزومی است و به‌عنوان یکی از انواع شایع لوسمی‌ها شناخته شده است. خانواده کرومن‌ها خواص ضدسرطانی قوی از خود نشان می‌دهند. بنابراین در این پژوهش اثر دو مشتق از خانواده دی‌هیدروپیرانو [2, 3-g] کرومن بر سمیت سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی K562 و مقایسه آن با سلول‌های نرمال تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) بررسی شد. رده سلولی K562 در حضور مشتق‌های کرومن ذکرشده در غلظت‌های ۲۰۰-۴ میکرومولار و زمان ۲۴-۷۲ ساعت کشت شد. اثر این ترکیب‌ها بر رشد و زنده‌مانی سلول‌های K562 و PBMC از طریق سنجش MTT و القای آپوپتوز با فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این مشتق‌های کرومنی رشد رده سلولی K562 را مهار می‌کنند. همچنین با افزایش غلظت و زمان تیمار، سمیت سلولی افزایش یافت. از میان این دو ترکیب 4-No₂pgC (IC₅₀=۱۲۹±۲/۷۵) سمیت بالا و 4-MePgC (IC₅₀=۲۱۴±۳/۴۲) سمیت پایین را پس از ۷۲ ساعت تیمار بر رده سلولی K562 نشان داد. همچنین نتایج فلوسایتومتری اثر القای آپوپتوز از طریق این ترکیب‌ها را بر رده سلولی K562 نشان داد. براساس نتایج حاصل از این پژوهش، مشتق‌های کرومن می‌توانند آپوپتوز را در رده سلولی K562 القا کنند و این ترکیب‌ها نسبت به سلول‌های سرطانی، اثر سمیت کمتری بر سلول نرمال دارند و در نتیجه این ترکیب‌ها می‌توانند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای درمان بدخیمی‌های خونی مورد بررسی قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: مشتق‌های دی‌هیدروپیرانو [2,3-g] کرومن، لوسمی میلوئیدی مزمن، سمیت سلولی، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۵

*نویسنده مسئول: mahinpur@kashanu.ac.ir

*نویسنده مسئول: haghhighipour@pasteur.ac.ir

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن نوعی سرطان خون است که به‌دلیل تکثیر بیش از حد سلول‌های رده میلوئیت در مغز استخوان ایجاد می‌شود. کشف کروموزوم فیلادلفیا در سال ۱۹۶۰ به‌عنوان اولین ناهنجاری کروموزومی مربوط به انواع خاصی از سرطان خون، دستاوردی موفق در زیست‌شناسی سرطان است. بررسی کمی و کیفی کروموزوم فیلادلفیا در تشخیص و بررسی روند درمان این لوسمی‌ها اهمیت دارد. با استفاده از روش‌های ژنتیکی تشخیص اولیه بیماری ممکن می‌شود^[1]. لوسمی میلوئیدی مزمن از جمله بیماری‌های بدخیم درگیرکننده سلول‌های مغز استخوان است. این بیماری با افزایش رده گرانولوسیت‌ها به‌خصوص نوتروفیل‌ها و

بزرگی طحال و افزایش گلبول‌های سفید در شمارش سلولی‌های خونی، مشخص می‌شود. مشخصه این بیماری وجود یک جابه‌جایی بین قطعات انتهایی بازوی بلند کروموزوم ۹ و ۲۲ است که موجب ایجاد کروموزوم فیلادلفیا می‌شود. طی این جابه‌جایی انکوژن ABL از کروموزوم ۹ به انتهای بلند کروموزوم ۲۲ منتقل می‌شود و به‌طور مشابه ژن C-SIS از کروموزوم ۲۲ به کروموزوم ۹ منتقل می‌شود. قطعه ۳ انکوژن ABL به قطعه ۵ ژن BCR متصل می‌شود و هیبرید bcr-abl را ایجاد می‌کند که بیان آن یک نسخه RNA است که در جریان ترجمه به یک پروتئین ۲۱۰ کیلودالتون به نام تیروزین‌کیناز (TK) ساخته می‌شود. این پروتئین روی غشای سلولی قرار می‌گیرد و مانع القای آپوپتوز در سلول‌های رده میلوئید می‌شود. در نتیجه سلول‌های این رده بدون داشتن هیچ مرگی، به‌طور دائم تکثیر می‌شوند و سطح آنها در خون بالا می‌رود و CML را به وجود می‌آورند^[1]. در چند سال اخیر همگام با رشد جهانی جمعیت، سرطان یکی از، شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر در جهان امروز است^[2, 3]. بر این اساس کشف روش‌های جدید به‌منظور تسهیل در تهیه ترکیب‌های دارویی یک نقطه محوری در فعالیت‌های پژوهشی در زمینه شیمی زیستی و دارویی است. یکی از روش‌های تهیه ترکیب‌های آلی استفاده از واکنش‌های چندجزیی تک‌ظرف است^[4]. به‌خصوص در زمینه تهیه ترکیب‌هایی که به‌عنوان پایه بسیاری از داروهای ضدسرطان، ضدتومور و ضد میکروب مورد استفاده قرار می‌گیرند^[5, 6]. پیران‌ها و مشتق‌های آنها دسته بزرگی از ناجورحلقه‌های اکسیژن‌دار هستند که به‌دلیل خواص زیستی، دارویی و واکنش‌پذیری مورد توجه هستند. حلقه‌های پیران به‌دلیل فعال‌بودن، حدواسط‌های خوبی هستند. این ترکیب‌ها خواص دارویی مانند فعالیت‌های ضدانعقاد، ضدسرطان، ضدتومور و نیز خواص آنتی‌بیوتیک دارند^[7]. در سال‌های اخیر فعالیت‌های سمیت سلول مشتق‌های تتراهیدروپیرانو کرومن و دی‌هیدروپیرانو پیران بر رده‌های سلولی سرطانی متنوعی نشان داده شده است. این ترکیب‌های ناجورحلقه، به‌طور قابل توجهی بر سلول‌های مختلف، پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند. همچنین کشف و توصیف خانواده ۴-آریل-۴H-کرومن به‌عنوان یک القاکننده قوی آپوپتوز در رده سلولی Jurkat (لوسمی سلول T) و T47D (کارسینوما سینه) گزارش شده است^[8]. در مطالعات اثر ضدسرطانی مشتق‌های [C-3,2] بنزوپیران بر رده سلولی K562 به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی برای لوسمی میلوئید بررسی شده است که موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های K562 در غلظت و زمان مشخص شده است. مکانیزم پیشنهادی برای این مجموعه از ترکیب‌ها این است که با اتصال به جایگاه اتصال کلشی‌سین توبولین موجب تغییر شکل ساختار آلفا و بتا دایمر توبولین و مانع شکل‌گیری میکروتوبول از توبولین شده و به مرگ سلولی و آپوپتوز منجر می‌شود^[9]. دو ترکیبی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت شامل ۲، ۷-دی‌آمینو-۴، ۹-بیس (۴-نیتروفنیل)-۵، ۱۰-دی‌اکسو-۴، ۹-دی‌هیدروپیرانو [2,3-g] کرومن-۳، ۸-دی‌کربونیتریل (4-No₂pgC) (شکل ۱)^[10] و ۲، ۷-دی‌آمینو-۵، ۱۰-دی‌اکسو-۴، ۹- (دی‌پاراتولیل) -۴، ۹-دی‌هیدروپیرانو [2, 3-g] کرومن-۳، ۸-دی‌کربونیتریل (4-MePgC) (شکل ۲) از

انجام این آزمون ابتدا تعداد ۱۵ هزار سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی ریخته و ۲۴ ساعت انکوبه شد. برای تهیه محلول مشتق‌های کرومن، ابتدا محلول‌های استوک ۲۰ میلی‌مولار مشتق‌های کرومن در دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) تهیه و سپس از استوک حاصل، غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکرومولار در محیط کشت آماده و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند. با فرارسیدن زمان‌های مختلف پس از تیمار، ۱۰ میکرولیتر از رنگ MTT درون هر چاهک اضافه شد. سپس به مدت ۴ ساعت فرصت داده شد تا واکنش تبدیل MTT به فورمازان صورت گیرد. پس از طی ۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول برای حل کردن فورمازان حاصل استفاده شد و جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۱۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

تشخیص مرگ سلولی بین آپوپتوز و نکروز به روش فلوسایتومتری

به منظور تشخیص مرگ سلولی بین آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول) و نکروز (مرگ خودبه‌خود سلول) از روش رنگ‌آمیزی آنکسین V و PI استفاده شد. ۴۰۰ هزار سلول درون چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی ریخته و ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس غلظت‌های مورد نظر به همراه کنترل مثبت آپوپتوز (دگزانتازون) و کنترل مثبت نکروز (H₂O₂) در چاهک‌ها ریخته و ۴۸ ساعت انکوبه و پس از شست‌وشو با PBS رنگ‌های آنکسین V و PI طبق پروتکل به آنها اضافه شد.

این مطالعه با ۵ غلظت و ۳ ردیف تکرار و سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفت. همچنین هر آزمایش به‌طور مستقل ۳ بار تکرار شد.

تحلیل آماری

نتایج تست MTT، اثر هر دارو در زمان‌های مختلف برای هر یک از سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند. به‌علاوه، به‌دلیل تداخل اثر فاکتورهای زمان و غلظت بر نتایج MTT آزمون آنالیز واریانس دوطرفه به همراه آزمون تعقیبی توکی و محاسبه پارامتر η² جزئی برای تعیین مقدار اثر هر فاکتور و ترکیب آنها نیز صورت گرفت. همچنین مقایسه بین نتایج IC₅₀ (غلظتی از ماده است که باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌های سرطانی شود) دو سلول در زمان‌های مشخص با آزمون t استیودنت انجام شد.

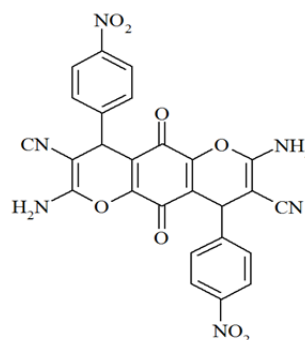
یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی سمیت مشتق‌های کرومن: نتایج حاصل در مورد 4-MepgC و 4-NO₂pgC نشان داد که با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون سمیت این ترکیب‌ها برای هر دو سلول افزایش یافت (نمودارهای ۱ تا ۴) و بیشتر در غلظت‌های ۱۶۰ و ۲۰۰ میکرومولار بین زمان‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد اما اثر سمیت 4-NO₂pgC بر سلول سرطانی و نرمال بیشتر از 4-MepgC بود.

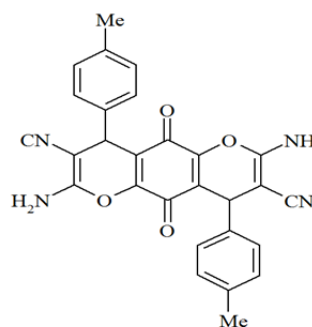
همچنین، میزان اثر سمیت سلولی که بر سلول‌های نرمال از خود نشان داد به مراتب کمتر از تاثیر آن بر سلول‌های سرطانی بود و با مقدار p کمتر از ۰/۰۰۱ در ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت نسبت به هم اختلاف معنی‌داری داشتند (نمودارهای ۵ و ۶).

خانواده مشتق‌های دی‌هیدروپیرانو [2,3-g] کرومن که استخلاف نیترو و متیل در حلقه فنیل خود دارند.

با توجه به مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی، خانواده کرومن‌ها خواص ضدسرطانی قوی از خود نشان دادند. بنابراین در این پژوهش اثر دو مشتق از خانواده دی‌هیدروپیرانو [2,3-g] کرومن بر سمیت سلولی و القای آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی K₅₆₂ و مقایسه آن با سلول‌های نرمال تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) بررسی می‌شود.



شکل (۱) 4-NO₂pg [10]



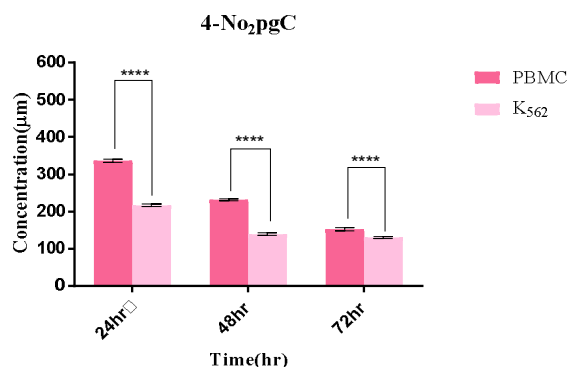
شکل (۲) 4-MepgC [10]

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS؛ گیبکو؛ انگلستان)، بافر نمکی فسفات (PBS؛ سیگما؛ ایالات متحده آمریکا)، رنگ تریپان‌بلو و پروپیدیوم‌یدید (PI)، رنگ MTT (۳، ۴ و ۵ دی‌متیل‌تيازول-۲ و ۵ دی‌فنیل‌تتزازولیوم برمید؛ سیگما؛ ایالات متحده آمریکا)، کیت آپوپتوز (Biolegend؛ ایالت متحده آمریکا)، فلاسک‌های کشت سلول و ظروف ۹۶ و ۲۴ چاهکی (science life SPL؛ کره جنوبی) به کار رفتند. رده سلولی K₅₆₂ با کد C₁₂₂ (انستیتو پاستور؛ ایران) تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI-1640، به همراه پنی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰٪ FBS استفاده شد. محیط کشت سلول‌ها در محیط استریل و زیر هود مخصوص کشت سلول هر دو روز یک‌بار تعویض شد. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در فلاسک‌های استریل و در انکوباتور مخصوص کشت سلولی با شرایط دی‌اکسیدکربن ۵٪، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷°C قرار داشتند.

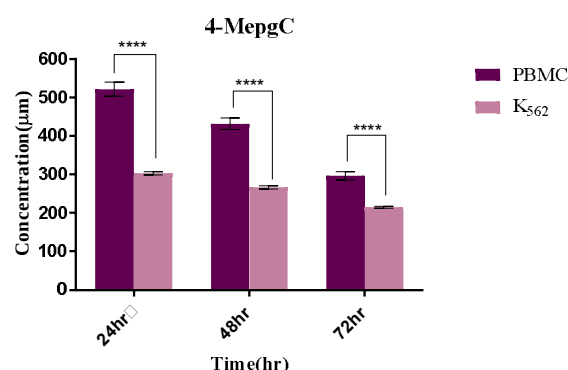
آزمون سنجش سمیت سلولی

برای بررسی تکثیر و زنده‌مانی آزمون MTT به کار رفت. به‌منظور



نمودار (۵) مقایسه میزان IC₅₀ 4-NO₂pgC بر سلول های K₅₆₂ و PBMC: *

p<0/0001 ****, p<0/001 ***, p<0/01 **, p<0/05 *



نمودار (۶) مقایسه میزان IC₅₀ 4-MepgC بر سلول های K₅₆₂ و PBMC: *

p<0/0001 ****, p<0/001 ***, p<0/01 **, p<0/05 *

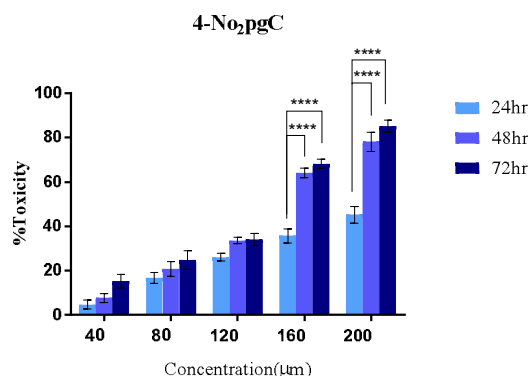
نتایج آماری: نتیجه آزمون آنالیز واریانس دوطرفه وجود ارتباط بین تاثیر همزمان دو فاکتور زمان و غلظت را تایید کرد. مقدار پارامتر η^2 جزئی برای فاکتورهای زمان و غلظت به تنهایی و ترکیب آنها برای سلول ها و مشتق های کرومن در جدول ۱ ذکر شده است. تمام مقادیر محاسبه شده دارای مقدار p کوچک تر از ۰/۰۰۰۱ بودند.

طبق جدول ۱، در هر دو سلول و برای هر دو ترکیب، اگر اثر زمان را برای هر یک از مقادیر غلظت ثابت در نظر بگیریم تاثیر غلظت بر سمیت بیشتر از زمانی خواهد بود که فقط اثر زمان را بر سمیت با فرض ثابت بودن اثر غلظت در نظر گرفته باشیم. اختلاف اثر مستقل غلظت بر سمیت نسبت به زمان در 4-MepgC بیشتر است. مقدار پارامتر η^2 جزئی برای تاثیر متقابل دو فاکتور بر سمیت نیز قابل توجه است هر چند که تاثیر همزمان آنها از تاثیر هر یک به تنهایی برای 4-MepgC کمتر است. به علاوه، تاثیر 4-NO₂pgC بر سلول K₅₆₂ با در نظر گرفتن تمام فاکتورها بهتر از 4-MepgC بوده است. نمودار ۷ نحوه تغییرات سمیت را بر حسب فاکتور غلظت در زمان های مختلف براساس نتایج آزمون آنالیز واریانس دوطرفه نشان می دهد. کاملاً واضح است که با افزایش زمان منحنی سمیت در سطح بالاتری قرار می گیرد به این معنی که با افزایش همزمان زمان و غلظت اثر سمیت نیز افزایش خواهد یافت (نمودار ۷).

نتایج حاصل از تشخیص مرگ سلولی

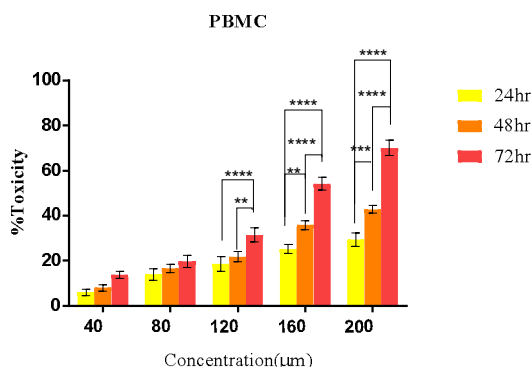
به منظور دستیابی به مقادیر کمی القای آپوپتوز و نکروز در

دوره ۱۰، شماره ۲، بهار ۱۳۹۸



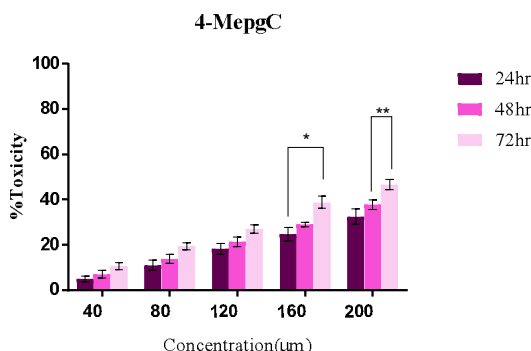
نمودار (۱) اثر 4-NO₂pgC در گستره غلظت ۴۰-۲۰۰ میکرومولار بر سلول های K₅₆₂: *

p<0/0001 ****, p<0/001 ***, p<0/01 **, p<0/05 *



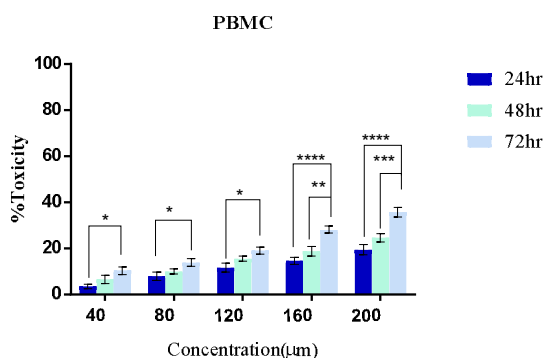
نمودار (۲) اثر 4-NO₂pgC در گستره غلظت ۴۰-۲۰۰ میکرومولار بر سلول های PBMC: *

p<0/0001 ****, p<0/001 ***, p<0/01 **, p<0/05 *



نمودار (۳) اثر 4-MepgC در گستره غلظت ۴۰-۲۰۰ میکرومولار بر سلول های K₅₆₂: *

p<0/0001 ****, p<0/001 ***, p<0/01 **, p<0/05 *



نمودار (۴) اثر 4-MepgC در گستره غلظت ۴۰-۲۰۰ میکرومولار بر سلول های PBMC: *

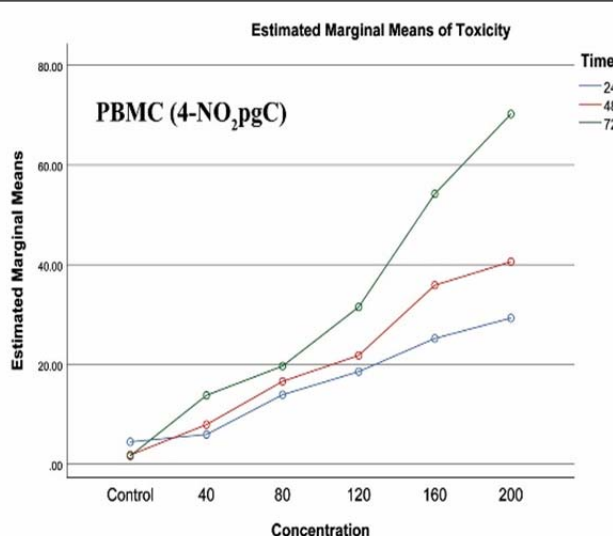
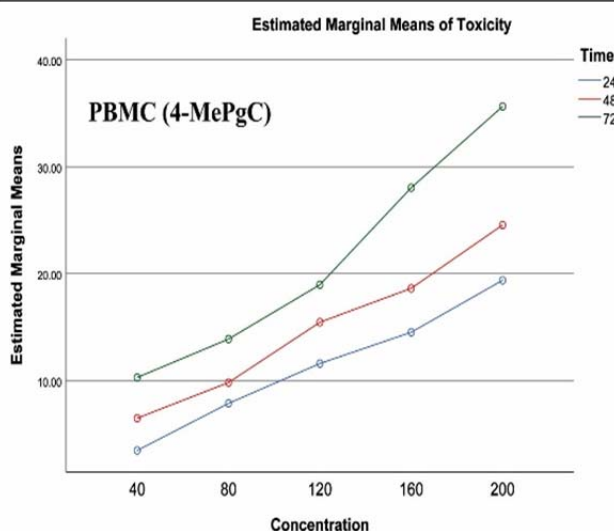
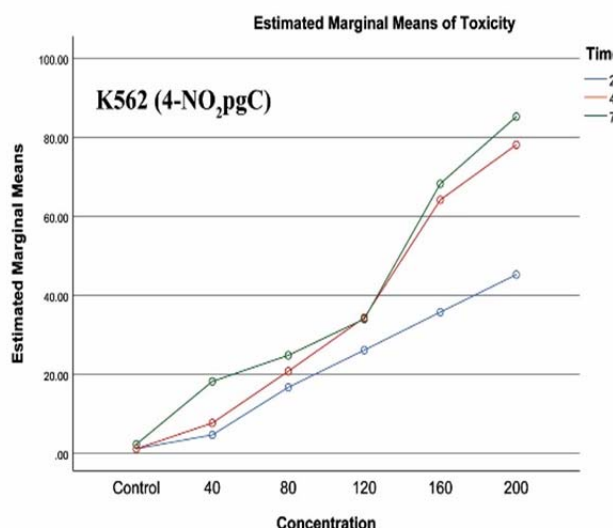
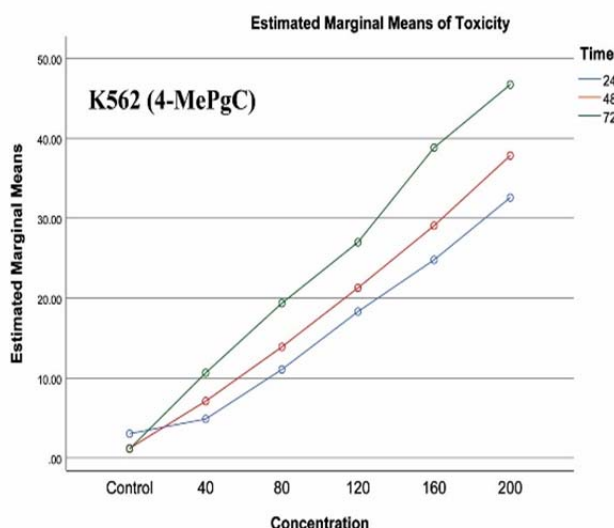
p<0/0001 ****, p<0/001 ***, p<0/01 **, p<0/05 *

علاوه بر این، ریخت‌شناسی سلول‌ها در حضور ۱۲۹ میکرومولار 3-MePgC به وسیله میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد که سلول‌های کنترل ظاهری کروی و گرد دارند در حالی که غشا سیتوپلاسمی سلول‌های تحت تیمار به تدریج پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به صورت اجسام آپوپتوتیک در می‌آیند. همچنین تراکم کروماتین و قطعه‌قطعه شدن آن نیز مشاهده می‌شود (شکل ۳).

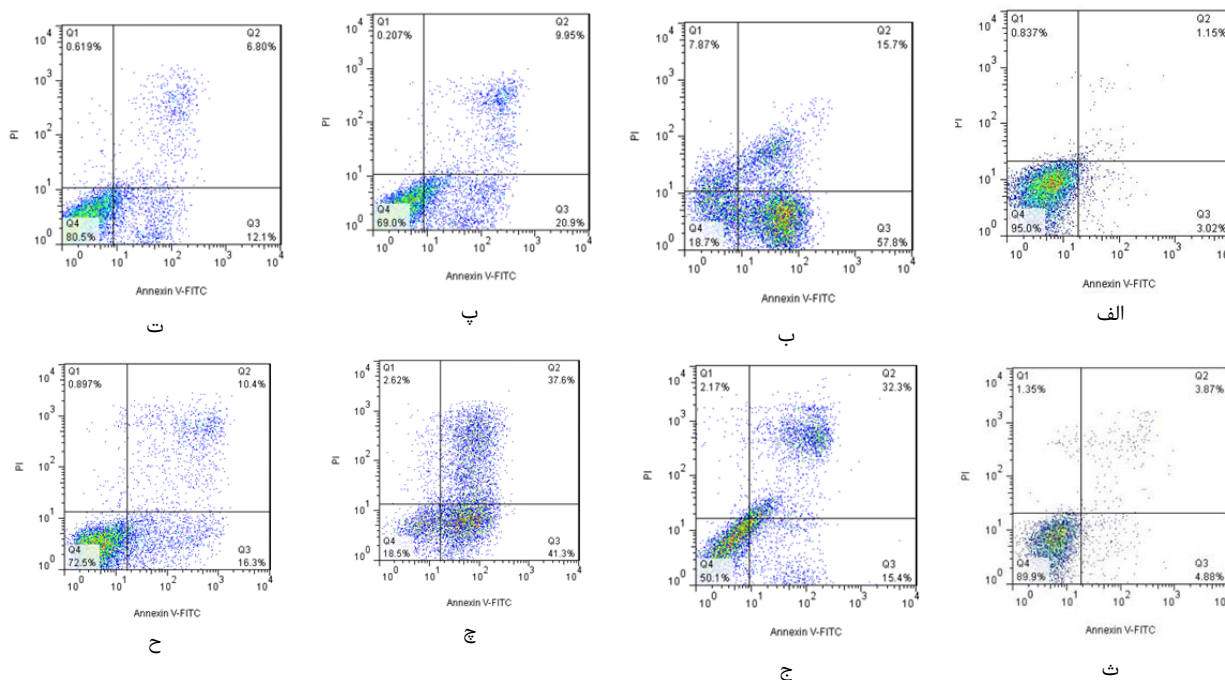
جدول ۱) مقادیر پارامتر η² جزئی مبین تاثیر متقابل زمان و غلظت بر سمیت

سلول / ترکیب	پارامتر η ² جزئی	
	غلظت × زمان	زمان
PBMC	۰/۸۰۴	۰/۸۲۰
	۰/۳۴۳	۰/۶۶۶
K ₅₆₂	۰/۸۱۰	۰/۸۴۳
	۰/۲۷۱	۰/۴۶۱

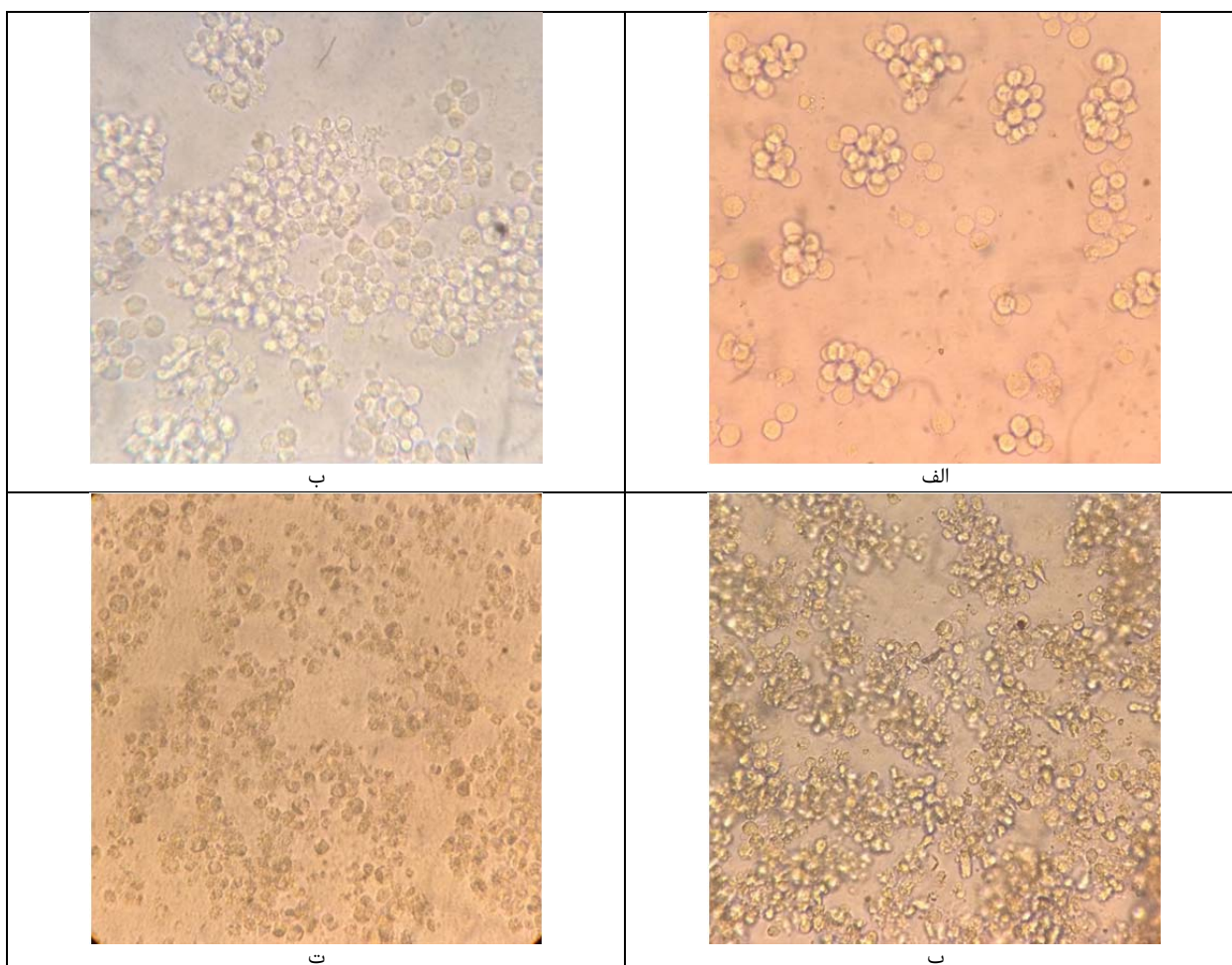
نمونه‌های کنترل منفی (سلول‌های تیمارنشده) و سلول‌های تیمار شده با مشتق‌های کرومن، آزمون فلوسایتومتری با نشانگرهای PI و Annexin-FITC انجام شد (نمودار ۸). در نمودار دوبعدی Annexin-FITC در برابر PI محاسبات مورد نظر با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی روی چهار ناحیه اصلی Q₁ تا Q₄ صورت پذیرفت و درصد سلول‌های سالم، آپوپتوزی و نکروزی در مشخص شد (جدول ۲). سلول‌های وارد شده به دستگاه فلوسایتومتر براساس اختلاف در میزان نشر رنگ‌های فلوئورسین ایزوتیوسیانات FITC و پروپیدیومیدید که جذب سلول شده‌اند، مورد تفکیک قرار گرفتند. در ابتدا در یک جمعیت سلولی فاقد رنگ تعیین حدود اصلی سلول‌ها (ناحیه R₁) و حذف ذرات نامناسب با استفاده از منحنی دوبعدی FSC در برابر SSC صورت گرفت. در اینجا با توجه به نوع نتیجه‌گیری موجود در اغلب منابع، مجموع درصد کل Q₂ و Q₃ به عنوان درصد کل وقوع آپوپتوز (سلول‌های آپوپتوز شده پیر و جوان) در نظر گرفته شد. در این حالت، سلول‌های قرار گرفته در ناحیه Q₁ و Q₄ به ترتیب، معرف سلول‌های



نمودار ۷) تغییرات سمیت برحسب غلظت در زمان‌های مختلف برای سلول‌ها و مشتق‌های کرومن



نمودار ۸) نتایج فلوسایتومتری سلول‌های K562: الف) کنترل منفی ۲۴ ساعت، ب) کنترل مثبت ۲۴ ساعت، پ) در حضور ۴- No2pgC ۲۴ ساعت، ت) در حضور ۴- MegpC ۲۴ ساعت، ث) کنترل منفی ۴۸ ساعت، ج) کنترل مثبت ۴۸ ساعت، چ) در حضور ۴- No2pgC ۴۸ ساعت، ح) در حضور ۴- MegpC ۴۸ ساعت



شکل ۳) تصاویر میکروسکوپ نوری سلول‌های K562: الف) کنترل منفی، ب) ۲۴ ساعت پس از تیمار ۴- No2pgC، پ) ۴۸ ساعت پس از تیمار ۴- No2pgC، ت) ۷۲ ساعت پس از تیمار ۴- No2pgC (۴۰۰X)

فلوسایتومتري نشان دادند. هوبسادرگا و همکاران اثر ۲-آمینوکرومن‌نیتريل بر سلول‌های لوسمی میلونید حاد و افزایش آپوپتوز ثانویه در ۷۲ ساعت پس از تیمار را نسبت به ۴۸ ساعت نشان دادند که این مطالعه هم با پژوهش ما مطابقت دارد [16]. از محدودیت‌های مطالعه حاضر به دلیل ماهیت ترکیبات، انحلال‌پذیری آنها فقط در دی‌متیل‌سولفوکساید امکان‌پذیر بود که این حلال در غلظت‌های بالا سمیت داشت. پیشنهاد می‌شود ترکیب‌های بیشتری از مشتق‌های کرومن سنتز و اثر سمیت آنها بر رده‌های سلولی سرطانی بیشتری مطالعه شود. همچنین ژن‌های درگیر در القای آپوپتوز نیز بررسی شود.

نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که بین این دو ترکیب 4-NO₂pgC، 4-MepgC و NO₂pgC با بیشترین خاصیت سمیت و شاخص درمان خوب و القای آپوپتوز و به‌عنوان یکی از ترکیب‌های مناسب ضدسرطان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این ترکیب با وجود گروه جانبی نیترو در حلقه فنیل که الکترون‌گاتیوی بیشتری نسبت به متیل دارد و حجم و ممانعت فضایی کمتری را ایجاد می‌کند. به‌طوری که این ترکیب در غلظت ۱۲۹ میکرومولار، ۷۲ ساعت پس از تیمار باعث مرگ ۵۰٪ از سلول‌های سرطانی شد. این ترکیب بر رده سلولی K562 به‌عنوان مدلی برای اثرات آپوپتوزی شديدي را از خود نشان داد. همچنین ذکر این مطلب ضروری است که این ترکیب به نسبت سلول‌های سرطانی، سمیت کمتری بر سلول نرمال PBMC داشت. این امر می‌تواند حاصل از به‌هم‌خوردن توازن مکانیزم‌های سلولی و بروز اختلال در مکانیزم‌های دفاعی و حذفی (متابولیسم و دفع) سلول‌ها به‌دنبال سرطانی‌شدن و تکثیر بی‌رویه سلولی نسبت به سلول‌های سالم باشد [17]. از سوی دیگر، می‌توان IC₅₀ بالای رده‌های سلولی نرمال در مقایسه با رده‌های سلولی سرطانی ناشی از توانایی این سلول‌ها در خارج‌نمودن داروها و عصاره مورد نظر از سلول دانست. همچنین روش‌ها یا سرعت مقابله سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی در مواجهه با ترکیب‌های مختلف بدین‌صورت است که سلول‌های نرمال مسیرهای مقابله با خصوصیات سمی ترکیب‌ها را که به مهار رشد منجر می‌شود با سرعت بیشتری راه‌اندازی می‌نمایند [18] و این باعث شد شاخص درمان به نسبت خوبی داشته باشد. با توجه به نتایج حاصل از القای آپوپتوز در سلول‌های K562 از طریق این ترکیب، امید است در آینده راه برای درمان CML هموار شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشکده شیمی دانشگاه کاشان برای سنتز ترکیبات و انستیتو پاستور ایران که پشتیبان مالی و اجرایی این پروژه بوده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه عسگری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ رویا مهین‌پور (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده

جدول ۲) مقایسه سلول‌های K562 دچار آپوپتوز و نکروز در ۲۴ و ۴۸ ساعت				
زمان	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت	
	آپوپتوز	نکروز	آپوپتوز	نکروز
کنترل منفی	%۴/۱۷	%۰/۸۳۷	%۸/۷۵	%۱/۳۵
کنترل مثبت	%۴۷/۷۰	%۲/۱۷	%۷۳/۵۰	%۷/۸۷
4-NO ₂ pgC	%۳۰/۸۵	%۰/۲۰۷	%۷۸/۹۰	%۲/۶۲
4-MepgC	%۱۸/۹۰	%۰/۶۱۹	%۲۶/۷۰	%۰/۸۹۷

بحث

شیمی‌درمانی بیماران سرطانی در سال‌های اخیر با اهمیت فزاینده‌ای همراه بوده است. تاکنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی به چشم می‌خورد. به‌ویژه افزایش دانسته‌های ما در مورد دانش زیستی تومور، مکانیزم عمل داروهای آنتی‌نئوپلاسمیک را برای ما روشن‌تر کرده است. این موضوع همچنین پایه‌ای برای طراحی منطقی‌تر داروهای ضدسرطان بوده است. با توجه به عامل مقاومت دارویی در رده‌های سرطانی سلول‌های خونی، تلاش‌های گسترده‌ای در جهت دارویی‌شدن مشتق‌های کرومن جریان دارد [11]. بسیاری از داروهای ضدسرطانی با ایجاد توقف در چرخه سلولی در G₁ یا S یا G₂/M موجب القای مرگ سلول (آپوپتوز) می‌شوند. نقاط کنترل چرخه سلولی یکی از نقاطی است که سلول برای ترمیم DNA خود اتخاذ می‌کند و مرگ سلولی موجب حذف سلول‌هایی می‌شود که دچار صدمات جبران‌ناپذیری شده‌اند. براساس مطالعاتی که انجام شده کرومن‌ها موجب توقف چرخه سلولی در فاز G₂/M می‌شوند. تجمع در فاز G₂/M به‌طور عمده بر اثر عوامل تخریب‌کننده DNA مانند تشعشعات Y، ترکیب‌های پایدارکننده میکروتوبول و مهارکننده توپوایزومرازها است [12].

براساس داده‌های حاصل از این پژوهش به‌خوبی روشن است که این ترکیب‌ها موجب القای آپوپتوز در رده سلولی خونی K562 می‌شوند. از لحاظ مکانیزم و با توجه به اطلاعات موجود یکی از شناخته‌شده‌ترین برهم‌کنش این ترکیب‌ها با میکروتوبول، برهم‌کنش آن از طریق اتصال به توپولین در محل اتصال کلشی‌سین یا در نزدیکی آن است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که این ترکیب‌ها موجب فسفوریلاسیون Bcl₂ شده و این فسفوریلاسیون باعث آغاز فعالیت کاسپازها می‌شود [13]. طبق مطالعه آریاپور و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر ۱، ۳- دی‌فنیل-۲ پروپن-۱-ون (۱-3، ۲- پروپن-۱-ون) بر سرطان لوسمی میلونید مزمن K562 و سلول نرمال SK-N-MC مشخص شد که افزایش زمان تیمار از ۱۲ تا ۷۲ ساعت باعث افزایش آپوپتوز در سلول سرطانی شد و همچنین این ترکیب‌ها بر رده سلولی نرمال سمیت کمتری داشتند که با مطالعات ما تطابق دارد [14]. در مطالعه دیگری، رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر مشتق‌های 3-NPC را بر رده سلولی K562 بررسی کردند و با رنگ‌آمیزی آنکسین V/PI به روش فلوسایتومتري نشان دادند که این ترکیب نسبت به کنترل خود ۶۹/۳۱٪ دچار آپوپتوز می‌شود [15]. میچدا و همکاران القای آپوپتوز و افزایش آن، با افزایش زمان تیمار از طریق ترکیب‌های پیرانو [3,2-c] پیریدون و پیرانو [3,2-c] کوئینولون را بر سلول‌های Jurkat با رنگ‌آمیزی آنکسین V/PI به روش

evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxyphenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(11):1375-84.

10- Moradi L, Aghamohammad Sadegh M. Sodium saccharin as an effective catalyst for rapid one-pot pseudo-five component synthesis of dihydropyrano[[2,3-g]]chromenes under microwave irradiation. *Acta Chimica Slovenica.* 2017;64:506-12.

11- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, et al. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med.* 2010;31(1):1-20.

12- Lu MC, Yang SH, Hwang SL, Lu YJ, Lin YH, Wang SR, et al. Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. *Life Sci.* 2006;78(20):2378-83.

13- Kasibhatla S, Gourdeau H, Meerovitch K, Drewe J, Reddy S, Qiu L, et al. Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(11):1365-74.

14- Aryapour H, Riazi GH, Ahmadian Sh, Foroumadi AR, Mahdavi M, Emami S. Induction of apoptosis through tubulin inhibition in human cancer cells by new chromene-based chalcones. *Pharm Biol.* 2012;50(12):1551-60.

15- Rahimi R, Mahdavi M, Pejman S, Zare P, Balalaei S. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by the derivative (3-NpC) from dihydro-pyranochromenes family. *Acta Biochimica Polonica.* 2015;62(1):83-8.

16- Keerthy HK, Garg M, Mohan CD, Madan V, Kanojia D, Shobith R, et al. Synthesis and Characterization of Novel 2-Amino-Chromene-Nitriles that Target Bcl-2 in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *PLoS One.* 2014;9(9):e107118.

17- Dosik GM, Barlogie B, Johnston D, Mellard D, Freireich EJ. Dose-dependent suppression of DNA synthesis in vitro as a predictor of clinical response in adult acute myeloblastic leukemia. *Eur J Cancer.* 1981;17(5):549-55.

18- Van Haaften RI, Evelo CT, Haenen GR, Bast A. No reduction of alpha-tocopherol quinone by glutathione in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(6):715-9.

بحث (۳۰٪): نوشین حقیقی‌پور (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪): لیلا مرادی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر توسط انستیتو پاستور ایران و دانشگاه کاشان تحت حمایت مالی بوده است.

منابع

1- Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96(10):3343-52.

2- Costa M, Dias TA, Brito A, Proença F. Biological importance of structurally diversified chromenes. *Eur J Med Chem.* 2016;123:487-507.

3- Roşca A, Arion C, Coliă A, Nedelcu L, Scîrnciu C, Andreescu O, et al. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. *Bull Transilv Univ Braşov.* 2009;2(51):97-104.

4- Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: From molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene.* 2002;21(56):8652-67.

5- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 3. structure-activity relationships of fused rings at the 7,8-positions. *J Med Chem.* 2007;50(12):2858-64.

6- Wong S, Mc Laughlin J, Cheng D, Witte ON. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. *Blood.* 2003;101(10):4088-97.

7- Yu Y, Guo H, Li X. An improved procedure for the three-component synthesis of benzo[g]chromene derivatives using basic ionic liquid. *J Heterocycl Chem.* 2011;48(6):1264-8.

8- Mahdavi M, Davoodi J, Zali MR, Foroumadi AR. 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. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(3):175-82.

9- Gourdeau H, Leblond L, Hamelin B, Desputeau C, Dong K, Kianicka I, et al. Antivascular and antitumor