



Evaluation of cytotoxicity mechanism of two cyclo-oxygenase-2 inhibitors in leukemia cell line

Shaghayegh Norouzi¹, Mahnaz Norouzi¹, Saeed Ayerian¹, Mohammad Nabiuni¹, Mohsen Amini², Mona Salimi^{3*}

1. Molecular and Cellular Biology Department, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Medicinal Chemistry Department, Faculty of pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Physiology and Pharmacology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 21 Nov 2013

Accepted: 14 Feb 2014

Abstract

Introduction: Leukemia is considered one of the main causes of death, and current chemotherapeutic agents are unable to provide optimal responses due to chemo-resistance. Therefore, there is a constant need for new drugs. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibitors can be helpful by reducing the necessary dose of routine chemotherapeutic drugs. Herein, we evaluated the cytotoxicity activity as well as the morphological changes induced by compounds A (3-(4-chlorophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-4-Phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole) and B (3,5-bis(4-chlorophenyl)-4-Phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole) as COX-2 inhibitors. In addition, the upstream mechanism was investigated by measuring expression of nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and ferritin heavy chain (FHC).

Methods: K562 leukemia cell line was cultured, treated with the above-mentioned two compounds, and their IC₅₀ values obtained. Compounds A and B-treated cells were analyzed for morphologic changes by fluorescence microscope after 16 h incubation at their IC₅₀ concentrations. The protein fraction of whole cell lysate was prepared to evaluate NF- κ B by NF- κ B assay kit. FHC expression was also determined using western blotting.

Results: Treatment of cells with the compounds A and B resulted in considerable apoptotic morphological changes according to DAPI staining. NF- κ B assay demonstrated its significant decrease due to compound B. Our experiment also revealed a significant reduction in FHC expression after treatment with compound B.

Conclusion: Compound B can induce cytotoxicity and morphological changes in leukemic cell line probably through NF- κ B/FHC pathway.

Key words: COX-2, Leukemia, FHC, NF- κ B

* Corresponding author e-mail: Salimimona@pasteur.ac.ir
Salimi_mona@yahoo.com

Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی مکانیسم سمیت سلولی دو مشتق مهار کننده آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در سلول های سرطان خون

شقایق نوروزی^۱، مهناز نوروزی^۱، سعید آبریان^۱، محمد نبیونی^۱، محسن امینی^۲، مونا سلیمی^{۳*}
۱. گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳. بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

پذیرش: ۲۵ بهمن ۹۲

دریافت: ۳۰ آبان ۹۲

چکیده

مقدمه: سرطان خون از جمله عوامل عمده مرگ و میر بشمار می رود که به دلیل بروز مقاومت دارویی، داروهای شیمی درمانی روز توانایی پاسخ به آن را ندارند. بنابراین همیشه دارویی جدید جهت درمان نیاز است. ترکیبات مهار کننده آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ می توانند کمک کننده باشند و همراه با داروهای متداول شیمی درمانی باعث کاهش دوز مصرفی آنها گردند. در این مطالعه اثرات سمیت سلولی و تغییرات مورفولوژیک ترکیبات A (3-(4-chlorophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-4-Phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole) و B (3,5-bis(4-chlorophenyl)-4-Phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole) به عنوان مشتقات مهار کننده آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در رده سلولی سرطان خون بررسی و مکانیسم بالادست آنها با مطالعه بیان فاکتور NF-κB و FHC (Ferritin Heavy Chain) بررسی شد.

روش ها: پس از کشت سلول های سرطان خون (K562) و محاسبه IC₅₀ آنها، سلول ها با دو ترکیب فوق در غلظت معادل IC₅₀، به مدت ۱۶ ساعت مجاور و تغییرات مورفولوژیک آنها با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. همچنین پس از لیز سلول ها و استخراج پروتئین آنها، بیان فاکتور NF-κB از طریق کیت سنجش NF-κB و بیان پروتئین FHC از طریق وسترن بلات سنجش گردید.

یافته ها: در بررسی میکروسکوپی سلول ها با رنگ آمیزی DAPI، تغییرات مورفولوژیک مرتبط با آپوپتوز پس از تیمار با ترکیبات فوق در سلول ها مشاهده شد. سنجش فاکتور NF-κB بیانگر کاهش این فاکتور توسط ترکیب B بود. بیان پروتئین FHC نیز در سلول های تیمار شده با ترکیب B کاهش یافت. **نتیجه گیری:** ترکیب B باعث ایجاد سمیت سلولی و تغییرات مورفولوژیکی سلولی، با مکانیسم احتمالی NF-κB/FHC در سلول های سرطان خون می گردد.

واژه های کلیدی: سیکلواکسیژناز-۲، سرطان خون، NF-κB، FHC

مقدمه

مورد توجه بسیاری واقع شده اند، سرطان خون (لوسمی) می باشد [۳۱]. اطلاعات آماری در مورد میزان ابتلا و مرگ و میرهای ناشی از انواع مختلف لوسمی در هر سال متفاوت می باشد. به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۰ در آمریکا به تنهایی حدود ۴۴۰۰۰ مرگ و میر ناشی از انواع مختلف لوسمی گزارش شده است [۱]. لوسمی یک نوع سرطان خون یا مغز استخوان است که به وسیله

امروزه سرطان، بزرگ ترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است. از جمله سرطان هایی که از این نظر

salimimona@pasteur.ac.ir
salimi_mona@yahoo.com
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

حاکمی از وجود ارتباط بین فریتین و سرطان می باشد، به این صورت که برخی سلول‌های سرطانی تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان بیان FHC از خود نشان می‌دهند. از طرف دیگر مطالعات نشان داده است که بیان FHC به وسیله تیمار با داروهای پیشگیری کننده شیمیایی کاهش می‌یابد که می‌تواند آپوپتوز را تحت شرایط پایه پیش برد. سایر گزارشات نیز ادعا دارد که بیان FHC در مرحله پیش رونده سرطان و فنوتیپ بدخیم مهاجم، افزایش پیدا می‌کند که افزایش آن منجر به پایداری بیشتر تومور در برابر عوامل ضد سرطان می‌گردد [۱۷، ۲۷].

سلکوکسیب (Celecoxib) یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی است (NSAIDs) و به عنوان مهار کننده انتخابی سیکلوکسیژناز-۲ (COX-2) عمل می‌کند که برای درمان بیماری‌هایی همچون ورم مفاصل و درمان دردهای حاد و مزمن به کار می‌رود [۲۵]. امروزه اثر سلکوکسیب در افزایش تاثیر شیمی درمانی داروهای موجود در مسیر کلینیکی سرطان نیز مورد بررسی واقع شده است، چرا که دیده شده COX-2 در انواع مختلف تومورها افزایش بیان پیدا می‌کند [۳۲]. این مقادیر بالای COX-2، می‌تواند آپوپتوز را مهار نموده [۱۶] و تقسیم سلولی را افزایش دهد [۹]. در عین حال که باعث افزایش قدرت تهاجم و متاستاز تومور شود [۳] و رگ‌زایی را نیز تحریک نماید [۱۵]. این تأثیرات سبب شده که مهار COX-2 به عنوان یک هدف دارویی بالقوه در پیشگیری و درمان سرطان مورد مطالعه واقع شود [۲۵]. طبق گزارشات ارائه شده، سلکوکسیب از طریق تحریک آپوپتوز باعث ایجاد سمیت سلولی می‌گردد که در نهایت منجر به تغییرات مورفولوژیکی می‌شود [۵، ۶، ۱۱، ۱۸]. همچنین سلکوکسیب باعث تغییر بیان پروتئین‌های درگیر در این فرآیند همانند FHC و NF-κB هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین می‌گردد [۲۳]. لذا کاهش بیان FHC و NF-κB به محض تیمار با سلکوکسیب، یک مکانیسم احتمالی از فعالیت ضد سرطانی آن می‌باشد [۱۴، ۲۰]. از آنجائیکه ترکیبات مورد استفاده در این تحقیق

تکثیر غیر عادی لوکوسیت‌ها (سلول‌های سفید خون) مشخص می‌شود و معمولاً همراه با از دست دادن وزن، خستگی شدید، آنمی، لخته خون و بزرگ شدن گره‌های لنفاوی، کبد و طحال می‌باشد [۳۳، ۳۵].

شیمی درمانی، پرتودرمانی و ژن درمانی از راه‌های مطرح درمان سرطان است که از آن میان شیمی درمانی، درمان سرطان با داروی ضد توموری، رایج‌ترین راه درمان سرطان می‌باشد [۸، ۱۲، ۱۹، ۳۰]. سال‌های متمادی اثرات سمی داروهای شیمی درمانی منحصراً به توانایی آنها در تحریک آسیب ژنوتوکسیک نسبت داده می‌شد، در حالیکه در طی دهه گذشته، شواهد نشان داده که بسیاری از داروهای شیمی درمانی سرطان، مرگ سلول را از طریق فرآیندی که تحت عنوان مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوز شناخته می‌شود، تحریک می‌نمایند. آپوپتوز شامل چروکیدگی شدن سلولی، سست شدن ارتباط سلول با سلول مجاور، تشکیل واکوئل‌های سیتوپلاسمی، تراکم کروماتین و تشکیل اجسام آپوپتوتیک می‌باشد [۳۳]. آپوپتوز توسط پروتئین‌های بالادست مختلفی همانند NF-κB و FHC تنظیم می‌گردد [۴، ۲۴]. NF-κB (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) یک ژن پاسخگوی سریع و ضروری است که درگیر در پاسخ‌های تنظیمی سلول و آپوپتوز می‌باشد. NF-κB در اغلب موارد یک نقش ضد آپوپتوزی در پاسخ به آسیب سلولی بازی می‌کند [۴]. درک نقش این فاکتور کلیدی در کنترل آپوپتوز می‌تواند منجر به پیشرفت در درمان بسیاری از بیماری‌های انسان مانند سرطان گردد. مدارک زیادی مبنی بر دخالت NF-κB در توسعه و پیشرفت سرطان خون وجود دارد که می‌تواند از طریق آپوپتوز نقش خود را ایفا نماید. در واقع NF-κB هدف درمانی مورد توجهی جهت درمان سرطان می‌باشد [۱۷].

FHC (Ferritin Heavy Chain) از عوامل پایین دست فاکتور NF-κB و یکی از زیر واحد‌های پروتئین فریتین می‌باشد [۳۴، ۲۴]. FHC در بسیاری از فرآیندهای پاتولوژیکی شامل التهاب، خود ایمنی و سرطان نقش مهمی بازی می‌کند [۲۸]. مطالعات پیشین

طریق واکنش ۱،۳-دی پلار حلقوی با بنزونیتریل اکسید و ایمین ها قبلاً گزارش شده است. در این مطالعه روش ساده سنتز تری آریل اکسادیازول ها از تراکم مشتقات کلریدی بنزوهیدروکسی ایمینوئیل در موقعیت ۴ و ایمین ها در دی اتیل اثر طراحی شده است. مشتقات کلریدی بنزوهیدروکسی ایمینوئیل در موقعیت ۴ ترکیبات پایداری هستند که خود از واکنش اکسیم های آریل آلدهید و n-کلرو سوکسینیمید در حلال دی متیل فرمامید تهیه می گردند. تمام ترکیب های نهایی خالص شدند و ساختار آنها توسط $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, Mass تایید گردید. این ترکیبات در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران سنتز شد (۲۱).

سمیت سلولی: سلول های سرطان خون (K562) از بانک سلولی پاستور تهیه و در محیط DMEM محتوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین G، ۱۰۰ mg/mL استرپتومایسین در دمای 37°C ، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ کربن دی اکسید کشت داده شد. سمیت سلولی با استفاده از روش احیای ۳- (۴، ۵-دی متیل-تiazول-۲-یل)-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) اندازه گیری شد. به این صورت که پس از تیمار سلول ها با دارو (غلظت $1-100 \mu\text{M}$) به مدت ۲۴

جدول ۱. مقادیر IC_{50} ترکیبات A و B بر ردهی سلولی K562 پس از ۲۴ ساعت مجاورت با ترکیبات A و B*

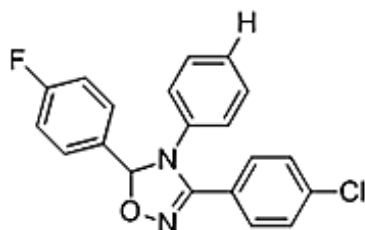
Compounds	IC_{50} (μM)
A	21.66 (15.5-30.3)
B	22.23 (18.5-26.7)
Celecoxib	2.3 (1.6-3.4)

* همه آزمایشات به صورت سه تایی انجام گرفت و مقادیر با حاشیه اطمینان ۹۵٪ ارائه شد.

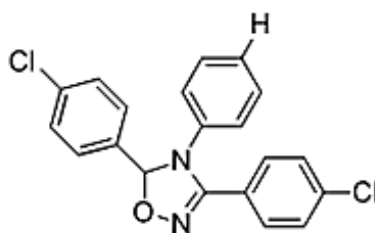
همانند سلوکسیب از مهار کننده های آنزیم COX-2 می باشد (شکل ۱) و با توجه به IC_{50} به دست آمده از آنها (جدول ۱) [۲۱]، ما بر آن شدیم که اولاً با استفاده از مشاهدات میکروسکوپی از تغییرات مورفولوژیکی سلول و تشکیل اجسام آپوپتوتیک اطمینان حاصل نماییم و ثانیاً میزان بیان فاکتورهای NF- κB و FHC را به عنوان عوامل بالادست این تغییرات، پس از تیمار با دو دارو بررسی نماییم.

مواد و روش ها

سنتز ترکیبات: سنتز ترکیبات ۱،۲،۴-اکسادیازول ها از



3-(4-chlorophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole



3,5-bis(4-chlorophenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole

شکل ۱- ساختار ترکیبات A و B

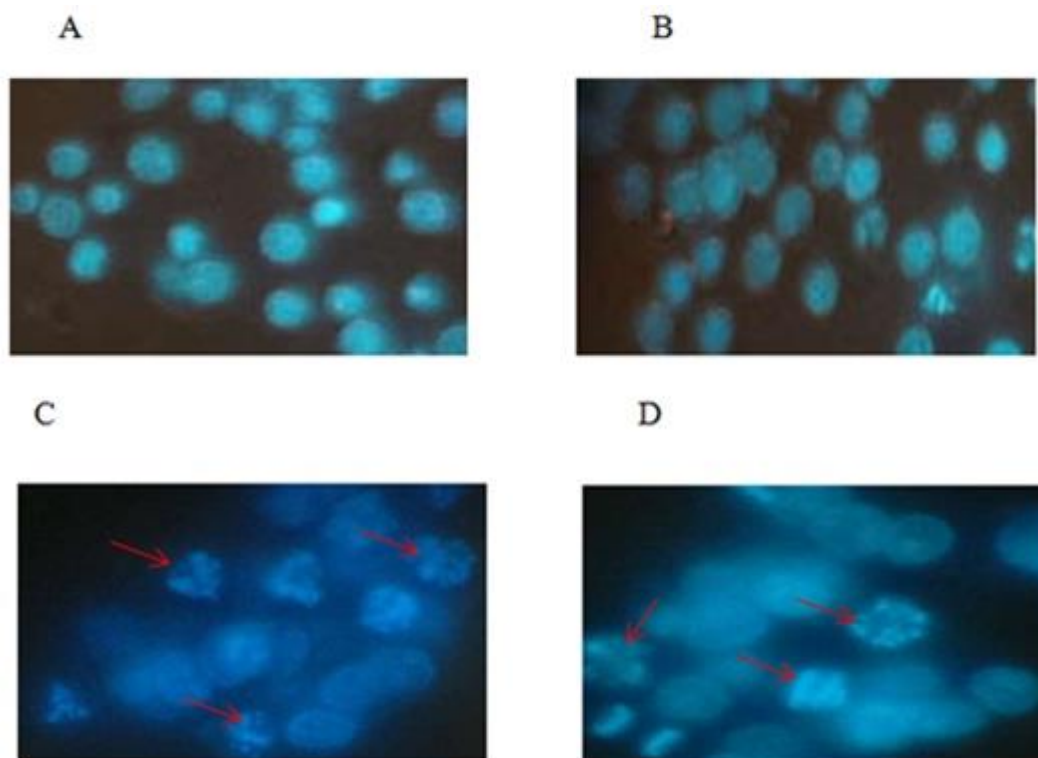
چاهکی کاشته شدند. زمانی که ۸۰٪ چاهک از سلول پر شد، غلظت معادل IC_{50} از ترکیبات (جدول ۱) A{ 3-(4-chlorophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-4-phenyl-4,5-B {3,5-bis (4-chlorophenyl)-4-{dihydro-1,2,4-oxadiazole phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole}، به هر چاهک اضافه و در مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. سپس محلول رویی محتوی محیط کشت و دارو دور ریخته شد و سلول ها دو مرتبه با PBS سرد شسته و جهت لیز سلولی و استخراج پروتئین تام سلولی آماده گردیدند. قابل ذکر است که همه آزمایشات ۳ مرتبه تکرار شدند. جهت آماده سازی پروتئین تام سلولی، سلول ها در $300 \mu L$ از بافر لیز کننده (تریس mM ۶۲/۵، SDS ۱۰٪، گلیسرول ۱۰٪، بروموفنول بلو ۰/۲۵٪ (W/V) و مهار کننده های پروتئیناز) لیز شدند و سپس مقدار پروتئین با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید. مقادیر برابر از پروتئین، روی ژل اکریل امید ۱۲٪ بارگیری و الکتروفورز شده و سپس به غشای PVDF (پلی وینیلیدین دی فلوراید) منتقل شد. غشا به طور جداگانه با آنتی بادی اولیه مونوکلونال FHC (abcam, USA) (۱:۱۰۰) به مدت یک شبانه روز در $4^{\circ}C$ و سپس به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی ثانویه پروکسیداز ترب کوهی یا HRP (cell signaling technology, USA) (۱:۵۰۰۰) انکوبه گردید. غشاها با سیستم کداک ظاهر گردید و دانسیته باندها به کمک نرم افزار Image J اندازه گیری گردید.

کیت سنجش NF- κ B: جهت استخراج فاکتور NF- κ B، کشت سلولی مطابق مراحل ذکر شده در آنالیز وسترن بلات صورت پذیرفت. سپس با استفاده از کیت میزان آن سنجیده شد. کیت NF- κ B (Activemotif, Cat. No: 40096) محتوی ۹۶ چاهک است که روی آن الیگونوکلوئوتید دارای جایگاه اتصال NF- κ B ثابت شده است (5-GGGACTTCC-3). در حقیقت فرم فعال NF- κ B موجود در استخراج کل سلول و یا هسته به طور اختصاصی به این الیگونوکلوئوتید متصل می شود. آنتی بادی اولیه که برای تعیین NF- κ B استفاده می شود، یک اپیتوپ را روی NF- κ B P65 یا NF- κ B P50 شناسایی می کند که این اپیتوپ، فقط زمانی که NF- κ B فعال است، در دسترس می باشد و به این DNA هدف متصل می شود. آنتی بادی

ساعت، سلول ها با محلول (5 mg/ml) MTT به مدت ۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه گردیدند. کریستال های فورمازان تشکیل شده در DMSO حل و گستره ی رنگ آن در ۵۴۵ nm با استفاده از خواننده میکرو پلیت اندازه گیری شد (BioteK, Germany). در این آزمون DMSO به عنوان کنترل حلال در نظر گرفته و هر آزمایش ۳ مرتبه تکرار شد. همچنین از داروی سلکو کسب به عنوان داروی استاندارد استفاده گردید.

رنگ آمیزی DAPI: رنگ آمیزی DAPI روشی مناسب و سریع جهت تشخیص اجسام آپوتوتیک و به تبع آن تغییرات مورفولوژیک به شمار می رود [۳۱]. در واقع، در سلول های آپوتوتیک قابلیت ورود رنگ به درون هسته افزایش می یابد و تغییرات مورفولوژیک هسته قابل تشخیص می گردد. علاوه بر اینکه کروموزوم های متراکم شده به خوبی رنگ آمیزی می شوند. در حالیکه در مدت زمان مشابه، هسته کروی سلول های نرمال به صورت یکنواخت رنگ آمیزی شده و حاشیه آن به خوبی قابل تشخیص می باشد [۳۷]. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون سلولی منفرد از سلول های K562 تهیه و پس از شمارش، سلول ها به تعداد 2×10^5 cell/well، به پلیت ۹ خانه ای منتقل شده و با رساندن به حجم نهایی ۲mL محیط کشت همراه با ۱۰٪ FBS در هر چاهک، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 انکوبه گردیدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی سلول ها با محیط کشت تازه که تیمارها در آن صورت گرفته بود تعویض گردید. بعد از مدت زمان ۱۶ ساعت مجاورت با غلظت معادل IC_{50} ترکیبات، سلول ها در لوله های فالکون مجزا جمع آوری شدند و پس از سانتریفیوژ محیط روی آن ها دور ریخته شد. سپس ۵/۰ میلی لیتر رنگ DAPI به غلظت $1 \mu g/mL$ به آن ها اضافه شده و سانتریفیوژ شدند. پس از خارج نمودن محلول رویی، مجدداً ۰/۵ میلی لیتر رنگ DAPI به نمونه ها اضافه و به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از آن، نمونه ها سانتریفیوژ شده و محلول رنگ DAPI خارج گردید و بافر PBS جهت ساخت سوسپانسیون سلولی از رسوب حاصل اضافه و سلول ها با استفاده از میکروسکپ فلورسانس مشاهده گردیدند.

آنالیز وسترن بلات: جهت اندازه گیری پروتئین FHC، سلول ها در چگالی 10^6 سلول بر چاهک، در پلیت های ۶



شکل ۲- بررسی آپوپتوز سلول‌های K562 پس از مدت زمان ۱۶ ساعت. (A) تغییرات مورفولوژیک سلول‌های کنترل (B) سلول‌های مجاور شده با DMSO (C) سلول‌های مجاور شده ترکیب (D) سلول‌های مجاور شده با ترکیب (B) (۲۲/۲۳ μM).

سلول‌های رنگ آمیزی شده با DAPI پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون ارزیابی شد. همانگونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، IC_{50} ترکیب B تقریباً مشابه با ترکیب A می‌باشد. هرچند تفاوت میان میزان IC_{50} مشتقات مهار کننده COX-2 و سلوکوکسیب دیده می‌شود، اما به دلیل شاخص بودن مقدار IC_{50} بدست آمده، این ترکیبات مهار کننده COX-2 می‌توانند به عنوان ترکیبات پیشرو (lead compounds) در حیطه داروسازی مطرح شوند. نتایج حاصل از مطالعات مورفولوژیکی نشان می‌دهند که نسبت به سلول‌های تیمار نشده، اکثریت سلول‌های تیمار شده با این ترکیبات، فشردگی کروماتینی قابل توجهی دارا هستند (شکل ۲). این تغییرات مورفولوژیکی، نشان دهنده آسیب سلولی پس از ۱۶ ساعت تیمار با مشتقات مهار کننده COX-2 می‌باشد. قابل ذکر است که این تغییرات در مورد سلول‌های تیمار شده با ترکیب B بیشتر از سلول‌های مجاور شده با ترکیب A می‌باشد.

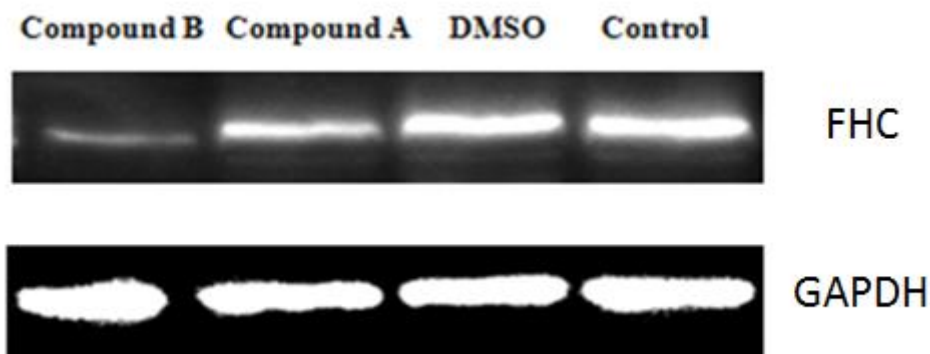
در بخش دیگر این مطالعه، با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین FHC در سلول‌های K562 مجاور شده با

ثانویه توأم با HRP (horseradish peroxidase)، رنگی تولید می‌کند که به راحتی به وسیله اسپکتروفوتومتری در طول موج ۴۵۰nm در مقابل طول موج فرانس ۶۵۵nm خوانده می‌شود. روش کار مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام پذیرفت.

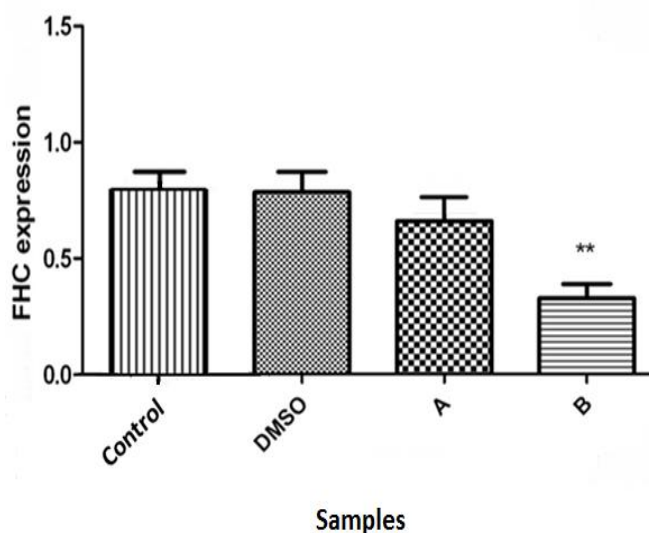
آنالیز آماری: مقایسه نتایج بیان پروتئین‌ها توسط نرم‌افزار Graphpad Prism version 5 و آنالیز ANOVA یک طرفه و post test tukey انجام پذیرفت. در بررسی‌های آماری $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار با گروه کنترل منظور گردید.

یافته ها

در مطالعه حاضر، توانایی ایجاد سمیت سلولی توسط ترکیبات A { 3-(4-chlorophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole } و B { 3,5-bis (4-phenyl)-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole } در سلول‌های K562 و ارتباط آن با تغییرات مورفولوژیکی



شکل ۳- بیان پروتئین FHC در سلول‌های K562 تیمار شده با ترکیب A (۲۱/۶۶ μ M) و B (۲۲/۲۳ μ M) در مقایسه با سلول‌های مجاور شده با DMSO و سلول‌های کنترل در مدت زمان ۱۶ ساعت

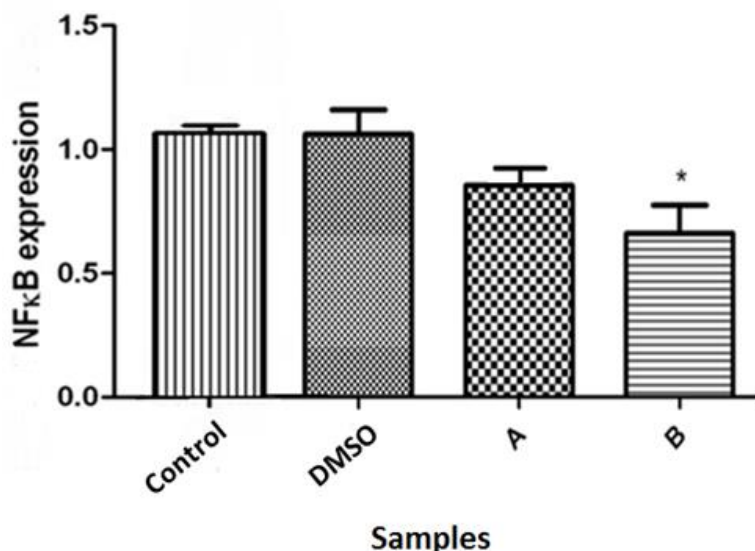


شکل ۴- مقایسه میزان بیان پروتئین FHC پس از مجاورت سلول‌های K562 با ترکیبات A (۲۱/۶۶ μ M) و B (۲۲/۲۳ μ M) بعد از مدت زمان ۱۶ ساعت. هر ستون میانگین سه آزمایش مستقل بوده و محاسبه تفاوت میان گروه‌ها با آنالیز ANOVA، post test tukey انجام شد. $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار در نظر گرفته شده است.

بیان این پروتئین در سلول‌های مجاور شده با ترکیب A کاهش معنی داری نداشته است. لازم به ذکر است که بیان پروتئین FHC در DMSO به عنوان کنترل حلال، نسبت به کنترل یکسان است که نشان دهنده عدم تاثیر DMSO به عنوان حلال می باشد.

همچنین نتایج حاصل از کیت سنجش NF- κ B نشان داد که مقدار بیان فاکتور NF- κ B در نمونه تیمار شده با ترکیب B پس از مدت زمان ۱۶ ساعت، نسبت به کنترل به صورت معنی داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرده است، این در حالی است که ترکیب A نتوانسته تغییر معناداری در میزان بیان پروتئین ایجاد نماید. قابل ذکر است که حلال DMSO به عنوان کنترل حلال نیز تأثیری در بیان این فاکتور نداشته

غلظت معادل IC₅₀ دو مشتقات مهار کننده COX-2 پس از مدت زمان ۱۶ ساعت بررسی و با نمونه‌های کنترل مقایسه شد. میزان بیان پروتئین GAPDH به عنوان کنترل داخلی بر روی همان بلات نیز اندازه گیری گردید. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می شود ترکیب B توانسته است پس از مدت زمان ۱۶ ساعت، باعث کاهش بیان FHC گردد. میزان دقیق بیان این پروتئین توسط اندازه گیری دانسیته باندها با نرم افزار Image J محاسبه و مقدار آن در گروه‌های مختلف با آنالیز ANOVA مقایسه گردید (شکل ۴). نتایج نشان می دهد که پس از مدت زمان ۱۶ ساعت بیان پروتئین FHC در سلول‌های مجاور شده با ترکیب B به صورت بسیار معنی داری نسبت به کنترل ($P < 0.01$) کاهش پیدا کرده است، در حالیکه



شکل ۵- مقایسه میزان بیان پروتئین NF-κB پس از مجاورت سلول‌های K562 با ترکیبات A (۲۱/۶۶ μM) و B (۲۲/۲۳ μM) بعد از مدت زمان ۱۶ ساعت. هر ستون میانگین سه آزمایش مستقل بوده و محاسبه تفاوت میان گروه‌ها با آنالیز ANOVA، post test tukey انجام شد. $P < 0.05$ * در مقایسه با کنترل معنی دار در نظر گرفته شده است.

است (شکل ۵).

تحقیقات متعددی جهت توجیه مکانیسم مولکولی عملکرد این دارو در مهار رشد و القای آپوپتوز صورت گرفته است [۲۲، ۳۸]. از لحاظ ساختاری، مهارکننده‌های اختصاصی COX-2 به دو دسته عمده تقسیم می‌شوند: دسته اول دی آریل هتروسیکل‌ها تحت عنوان Coxibs هستند که شامل یک حلقه مرکزی ۵ ضلعی و یا ۶ ضلعی می‌باشند و حلقه‌های آریلی در موقعیت ۱ و ۲ آن قرار می‌گیرند. ترکیبات ۱ و ۳-دی آریل هتروسیکل‌ها نیز می‌توانند موجب مهار COX-2 گردند. در نتیجه تغییراتی در جهت بهبود انتخاب پذیری آنها نسبت به COX-2 در ساختار این ترکیبات صورت پذیرفته است. یکی از این تغییرات، افزودن یک گروه آریلی به حلقه هتروسیکل مرکزی به صورت مستقیم و یا از طریق رابط می‌باشد. نهایتاً ثابت شد که تری آریل هتروسیکل‌ها، مشتقات مؤثرتری نسبت به دی آریل‌ها در مهار COX-2 می‌باشند و آنها را دسته دوم مهارکننده‌ها نامیدند [۳۶]. هدف از کاربرد این داروها، القای آپوپتوز و در نتیجه یافتن دارویی مؤثر جهت درمان سرطان و همچنین غلبه بر مقاومت دارویی و عوارض ناخواسته سلوکسیب می‌باشد. علاوه بر این، جهت کاهش دوز مصرفی داروهای شیمی درمانی متداول که اغلب سمی هستند، می‌توان از این داروها به همراه آنها استفاده کرد. ترکیبات مشتق مهار کننده COX-2 که در تحقیق اخیر به کار

بحث

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که پروتئین COX-2 نقش عمده‌ای در گسترش و پیشرفت تومور به عهده دارد. این مطالعات همچنین نشان داده‌اند که مهار کننده‌های انتخابی COX-2 (کوکسیب‌ها)، رشد تومور را از طریق مکانیسم‌های متعددی، به ویژه از طریق اثرات ضد رگزایی و پیش آپوپتوزی متوقف می‌کنند. یافته‌های بالینی دال بر بیان بالای COX-2 در تومورهای انسانی پیشرفته، زمینه را برای استراتژی درمانی جدید ضد سرطانی بر پایه ترکیبات مهار کننده COX-2 فراهم کرده است [۱۰]. از طرف دیگر مطالعات پیشین مشخص کرده‌اند که داروهای مهار کننده COX-2 نقش خود را در القای آپوپتوز از طریق تأثیر بر تنظیم بیان پروتئین‌های بالادست و پایین دست آنزیم COX-2 اعمال می‌کنند. یافته‌ها نشان داده‌اند که تأثیر سلوکسیب در القای آپوپتوز ممکن است مستقل از آنزیم COX-2 و از طریق مکانیسم‌های دیگر نیز باشد [۲۲، ۲۹]. اثرات ضد سرطانی سلوکسیب و مشتقات آن بر روی رده‌های سلولی سرطان خون انسان به خوبی مشخص شده است [۲۶] و

داروی سلکوکسیب، دو فاکتور القا کننده سمیت سلولی در رده سلولی K562 نیز مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور رونویسی NF- κ B و پروتئین FHC از پروتئین‌های دخالت کننده در سمیت سلولی می‌باشند [۶، ۲۳]. FHC به وسیله TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) به سرعت در یک روش وابسته به NF- κ B تحریک می‌شود و برای سرکوبی مرگ تحریک شده با TNF- α و بلوکه شدن آپوپتوز ضروری می‌باشد [۲]. با توجه به نقش NF- κ B و FHC به عنوان عوامل پیش برنده سرطان، و با توجه به کاهش چشمگیر بیان این فاکتورها توسط ترکیب B در رده سلولی K562، می‌توان پیشنهاد نمود که این مسیر، در القای سمیت سلولی در رده سلولی سرطان خون توسط ترکیب B نقش مهمی بازی می‌کند که البته نیازمند مطالعات دقیق‌تر و یافتن مولکول‌های هدف بیشتر در این رابطه می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب انستیتو پاستور ایران می‌باشد که به این وسیله نویسندگان از مسئولین آن تقدیر و تشکر می‌نمایند.

رفته‌اند، دو نمونه از این دسته از داروها می‌باشند. با توجه به پتانسیل قابل توجه سلکوکسیب در درمان سرطان و به ویژه سرطان خون، در این مطالعه پتانسیل این دو ترکیب مهار کننده COX-2 سنتز شده بر پایه ساختار شیمیایی سلکوکسیب، در ایجاد سمیت سلولی در رده سلولی سرطان خون بررسی شد. به دنبال آن تغییرات مورفولوژیکی سلولی ناشی از تیمار با ترکیبات 3-(4-chlorophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-4-Phenyl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazole, A {3,5-bis(4-chlorophenyl)-4-Phenyl-4,5- و 21.66 μ M} K562 در سلول‌های dihydro-1,2,4-oxadiazole, 22.23 μ M} با استفاده از رنگ آمیزی DAPI مطالعه شد. تغییرات مورفولوژیک، شامل تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته در سلول‌های K562 مجاور شده با غلظت معادل IC₅₀ مشتقات مهار کننده COX-2 پس از مدت زمان ۱۶ ساعت مشخص نمود که این ترکیبات به ویژه ترکیب B می‌توانند باعث سمیت سلولی از طریق تشکیل اجسام آپوپتوتیک در این رده سلولی شوند که این نتایج تأیید کننده مقادیر IC₅₀ بدست آمده از آن‌ها بود.

به منظور بررسی بیشتر مکانیسم سمیت سلولی ایجاد شده توسط این دو ترکیب مهار کننده COX-2 و با توجه به مطالعات پیشین مبنی بر ارزیابی مکانیسم اثر ضد سرطانی

Int J Cancer 91 (2001) 894-899.

References

- [1] Anjali P, Faraha S, Amit KS, Synthetic and green vegetable isothiocyanates target red blood leukemia cancers. *Fitoterapia* 83 (2012) 255-265.
- [2] Can G, Concetta B, Francesca Z, Salvatore P, Joy J, Kelleen A, Shanthi J, Enrico D, Rong C, Carole B, Frank M, Suzy V, Guido F, Ferritin Heavy Chain Upregulation by NF- κ B Inhibits TNF α -Induced Apoptosis by Suppressing Reactive Oxygen Species. *Cell* 119 (2004) 529-542.
- [3] Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK, Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2 selective inhibitor.

- [4] Chenguang F, Jusan Y, John F, Temporal pattern of NF κ B activation influences apoptotic cell fate in a stimuli-dependent fashion. *J Cell Sci* 115 (2002) 4843-4853.
- [5] Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, Lokeshwar BL, Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 115 (2005) 484-492.
- [6] Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS, D'Ambrosio SM, Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* 113 (2005) 803-810.
- [7] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, NF- κ B in development

- and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446 (2005) 475-482.
- [8] Duarte S, Carle G, Faneca H, Pedroso MC, Pierrefite V, Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now. *Cancer Lett* 324 (2012) 160-170.
- [9] Fosslie E, Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30 (2000) 3-21.
- [10] Giampietro G, Raffaele L, Roberta S, Alessandro M, Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents. *Lancet Oncol* 4 (2003) 605-615.
- [11] Hsiao PW, Chang CC, Liu HF, Tsai CM, Chiu TH, Chao JI, Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by celecoxib oppositely regulates survivin and gamma-H2AX in human colorectal cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 222 (2007) 97-104.
- [12] Jacek J, The role of radiotherapy in lung cancer: Where is the evidence. *Radiother Oncol* 83 (2007) 203-213.
- [13] Kapuscinski J, DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70 (1995) 220-233.
- [14] Klaus D, Florian R, Ramona S, Manfred S, Gerd G, Sabine G, Dimethylcelecoxib inhibits mPGES-1 promoter activity by influencing EGR1 and NF-kB. *Biochem Pharmacol* 80 (2010) 1365-1372.
- [15] Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL, Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Curr Med Chem* 7 (2000) 1163-1170.
- [16] Lin MT, Lee RC, Yang PC, Ho FM, Kuo ML, Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. *J Biol Chem* 276 (2001) 48997-49002.
- [17] Liu X, Madhankumar AB, Slagle-Webb B, Sheehan JM, Surguladze N, Connor JR, Heavy chain ferritin siRNA delivered by cationic liposomes increases sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 71 (2011) 2240-2249.
- [18] Liu X, Yue P, Zhou Z, Khuri FR, Sun SY, Death receptor regulation And celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 96 (2004) 1769-1780.
- [19] Markus JV, Heikkila JE, Hinkkanen AE, Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett* 254 (2007) 178-216.
- [20] Megumi F, Taeko S, Kenji T, Motohiro N, Hiroshi I, Yoshiko S, Tadashi K, Celecoxib potently inhibits TNFa-induced nuclear translocation and activation of NF-Kb. *Biochem Pharmacol* 76 (2008) 662-671.
- [21] Miralinaghi P, Salimi M, Amirhamzeh A, Norouzi M, Mostafapour H, Shafiee A, Amini M, Synthesis, molecular docking study, and anticancer activity of triaryl-1,2,4-oxadiazole. *Med Chem Res* 22 (2013) 4253-4262.
- [22] Nakamura S, Kobayashi M, COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo. *Cancer Therapy* 2 (2004) 153-166.
- [23] Naoko S, Fumi T, Kazuhiro F, Fumie S, Yoji T, Yoshikazu M, Sachio M, Mitsuo I, Toshiyuki S, Celecoxib inhibits the expression of survivin via the suppression of promoter activity in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 73 (2007) 1318-1329.
- [24] Pham C, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, Jayawardena S, Smaele E, Cong R, Beaumont C, Torti F, Torti S, Franzoso G, Ferritin Heavy Chain Upregulation by NF-kB Inhibits TNF Induced Apoptosis by Suppressing Reactive Oxygen Species. *Cell* 119 (2004) 529-542.
- [25] Raafat AE, Ekram MS, Marwa E, Abeer ME, Interaction of celecoxib with different anti-cancer drugs is antagonistic in breast but not in other cancer cells. *Toxicol App Pharma* 255 (2011) 271-286.
- [26] Reddy BS, Hirose Y, Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 60 (2000) 293-297.
- [27] Rezaie F, Salimi M, Ghahremania MH, Vaziri B, Potential molecular targets in chemopreventative action of celecoxib: a proteomics analysis of J774.A1 macrophage-like cell line. *Mol Bio Syst* 7 (2011) 1306-1311.
- [28] Roperto S, Borzacchiello G, Brun R, Costanzo F, Faniello M, Raso C, Rosati A, Russo V, Leonardix L, Saracinok D, Turco M, Urraro C, Roperto F, Ferritin Heavy Chain (FHC) is Up-regulated in Papillomavirus-Associated Urothelial Tumours of the Urinary Bladder in Cattle. *J Comp Pathol* 142 (2010) 9-18.
- [29] Schonthal AH, Chen TC, Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anti-cancer drugs. *Expert OpinInvestig Drugs* 17 (2008) 197-208.
- [30] Shi S, Yao W, Xu J, Long J, Liu C, Xianjun X,

- Combinational therapy: New hope for pancreatic cancer. *Cancer Lett* 317 (2012) 127-135.
- [31] Smets A, Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs* 5 (1994) 3-9.
- [32] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT, COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89 (2000) 2637-2645.
- [33] Subhashini J, Mahipal SVK, Reddanna P, Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Lett* 224 (2005) 31-43.
- [34] Torti FM, Torti SV, Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99 (2002) 3505-3516.
- [35] Wakeford R, Little MP, Kendall GM, Risk of childhood leukemia after low-level exposure to ionizing radiation. *Expert Rev Hematol* 3 (2010) 251-254.
- [36] Zebardast T, Zarghi A, Design and synthesis of 3-alkyl-2-aryl-1,3-thiazinan-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19 (2009) 3162-3165.
- [37] Zink D, Sadoni N, Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. Usually for the live cells staining Hoechst Staining is used. DAPI gives a higher signal in the fixed cells compare to Hoechst Stain but in the live cells Hoechst Stain is used. *Method* 29 (2003) 42-50.
- [38] Zhang GS, Liu DS, Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and down regulation of Cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib. *Am J Hematol* 81(2006) 242-255.