

# اثر ضد تکثیر و آپوتوز پردنیزولون بر رده سلولی K562 (لوسمی میلوئید مزمن)

سیده مریم واعظی (MSc)<sup>۱</sup> - دکتر مهدی محمدزاده (PhD)<sup>۲</sup> - دکتر یعقوب پاژنگ (PhD)<sup>۳</sup>

\*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پست الکترونیک: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۰۴/۱۲ تاریخ ارسال: ۹۵/۰۷/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۳۰

## چکیده

مقدمه: امروزه شیوع روزافزون انواع بدخیمی‌ها، اهمیت درمان این بیماری را افزایش داده است. لوسمی، سرطان بافت‌های خون‌ساز بدن است که از سلول‌های پیش‌ساز گلبول‌های قرمز و سفید خون برگرفته می‌شود. پردنیزولون از خانواده گلوکوکورتیکوئیدها با اثر ضدتوموری و آپوتوزی مدنظر خیلی از پژوهشگران قرار گرفته است. هدف: بررسی اثر پردنیزولون بر سلول‌های بدخیم خونی رده K562.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی نخست سلول‌های رده K562 کشت داده شدند. سپس، با استفاده از غلظت‌های گوناگون پردنیزولون ویژگی ضدتوموری دارو بر سلول‌های K562 پس از ۷۲ ساعت، با روش MTT سنجیده شد. در پایان برای مطالعه‌ی آپوتوز از الکتروفورز DNA و رنگ‌آمیزی (33342) Hoechst استفاده شد. واکاوی داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA انجام شد ( $P < 0.05$ ).

نتایج: در این مطالعه ویژگی ضد سرطانی پردنیزولون بر رده سلولی K562 پذیرفته شد. همچنین، نتایج نشان داد پردنیزولون در سنجش با گروه کنترل، تکاپوی سلول‌کشی دارد که در غلظت ۱۰۰ میکرومول در ۷۲ ساعت بیشترین میزان آن بود. بررسی‌های آماری حاکی از آن است که این دارو به‌طور مؤثر و معنی‌داری توان مهار لوسمی رده K562 را داراست ( $P < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: آثار ضد توموری پردنیزولون در پیشگیری و درمان لوسمی میلوئیدی مزمن مؤثر است. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری بر تأثیر این دارو در الگوهای حیوانی، حتی انسان، انجام شود.

کلید واژه‌ها: آپوتوزیس / پردنیزولون / خط سلول K562 / ضد تکثیر / لوسمی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و پنجم، شماره ۱۰۰، صفحات: ۳۸-۴۶

## مقدمه

اساس پیدایش سلولی به دو نوع لوسمی لنفوئیدی و میلوئیدی. بنابراین، به‌طور کلی لوسمی در چهار دسته طبقه‌بندی می‌شود: (۱) لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، (۲) لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، (۳) لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) و (۴) لوسمی لنفوبلاستیک مزمن (CLL) (۵). بررسی‌ها ارتباط مستقیم معناداری بین این لوسمی و برخی عوامل را نشان می‌دهد. از این عوامل می‌توان به ارتباط وزن هنگام تولد و ایجاد سرطان، سن مادر در هنگام زایمان، مصرف سیگار در پدر و مادر، برداشتن لوزه و استفاده از حشره‌کش‌ها، مصرف داروهای همچون مترونیدازول در دوران بارداری، پرتوهای ایکس، مصرف سیگار توسط والدین و... اشاره کرد (۳). لوسمی میلوئید مزمن از بیماری‌های مزمن میلوپرولیفراتیو است که به دلیل موتاسیون اختصاصی در سلول‌های بنیادی چند توانی مغز استخوان ایجاد

سرطان یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در جهان است. دومین علت مرگ و میر دنیا و سومین علت در ایران، سرطان است. گفته می‌شود سالانه ۵۰۰۰۰ نفر در ایران به این بیماری دچار می‌شوند (۱). از تمام سرطان‌های شناخته‌شده، لوسمی یکی از مهلک‌ترین آن‌هاست. از نظر میزان مرگ‌ومیر، این بیماری رتبه پنجم جهانی و رتبه دوم داخل کشوری را به خود اختصاص داده است (۲-۱). لوسمی ۴٪ همه بدخیمی‌ها را دربرداشته و علت ۴٪ مرگ و میرهای ناشی از بدخیمی نیز مربوط به این بیماری است. لوسمی از تغییر غیرطبیعی سلول‌های خونی مغز استخوان ناشی می‌شود که همراه با رشد فزاینده در تعداد سلول‌های خونی غیرطبیعی و کاهش تولید سلول‌های طبیعی خون است (۳-۴). این بیماری را می‌توان بر دو پایه رده‌بندی کرد: الف- بر پایه سیر بیماری به دو نوع مزمن و حاد و ب- بر

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

**مواد و روش‌ها**

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول (شرایط آزمایشگاهی) گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه و با گام‌های زیر در مدت نزدیک به یک سال انجام شد.

**تهیه سلول‌های سرطانی رده K562 و کشت آن‌ها:** رده‌ی سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (CI22) تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) دربردارنده ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پن‌استریپ (پنی‌سیلین + استرپتومایسین) در انکوباتور با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد (۱۴). سلول‌ها در مدت کشت پیوسته با میکروسکوپ فاز معکوس بررسی می‌شدند.

**تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از پردنیزولون:** برای تهیه‌ی رقت‌های مختلف پردنیزولون، این دارو از داروخانه تهیه شد، بعد در گام پسین قرص‌ها در هاون پودر شده، سپس، بر پایه وزن ملکولی دارو و غلظت‌های مورد نظر، وزن شده و در یک میلی‌لیتر DMSO (به‌عنوان حلال پردنیزولون) حل شد. سپس، ۲ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حل شد. بدین ترتیب رقت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر از پردنیزولون به‌دست آمد.

**سنجش خاصیت ضدتوموری پردنیزولون به‌روش MTT assay:** ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها (با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس، ۲ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف داروی پردنیزولون به چاهک‌ها اضافه شد. سه چاهک تنها دارای ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول بودند (به‌عنوان کنترل و بدون تیمار) و به سه چاهک دیگر افزون بر محیط کشت حاوی سلول، ۲ میکرولیتر DMSO نیز افزوده شد. در مرحله بعد، پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه شد. این مراحل در سه روز تکرار شد. پس از پایان مدت انکوباسیون، ۲۰

می‌شود. سبب اصلی بروز CML را می‌توان جابجایی دوطرفه دو ژن BCR (در سلول‌های خونی چندتوان- کروموزوم ۲۲) و ژن Ab1 (کروموزوم ۹) دانست. پیامد این جابجایی پروتوانکوژنی با عنوان BCR-Ab1 خواهد بود که پروتئینی تیروزین کیناز را با نام p210Bcr-Ab1 ایجاد می‌کند. فعالیت پیاپی این تیروزین کیناز سبب زیاد شدن بی‌رویه سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی و نیز ایجاد اختلالات در روند آپوپتوز این سلول‌ها می‌شود. یکی از رده‌های CML، K562 است که رده مطالعه شده در این بررسی بود (۸-۶). برخلاف بیشتر سرطان‌ها، درمان لوسمی دشواری‌هایی دارد زیرا آنها، در این بیماری تومور جامد، توپر و در دسترسی وجود ندارد که پزشک بتواند با جراحی آن را خارج کند، در نتیجه درمان لوسمی پیچیده‌تر از دیگر سرطان‌ها است (۱). بنابراین، پزشکان با انواع داروهای شیمیایی (شیمی‌درمانی) در درمان این بیماری می‌کوشند. گروهی از این داروها، داروهای گلوکوکورتیکوئیدی (GC) مانند پردنیزولون، دکزامتازون و متیل‌پردنیزولون، هستند. پردنیزولون شکل فعال پردنیزون است و در کبد طی سوخت و ساز ایجاد می‌شود (۹). کورتیکواستروئیدها به سرکوب یا پیشگیری از پاسخ دستگاه ایمنی بدن کمک می‌کنند و همچنین، بازدارنده تولید موادی می‌شوند که آلرژی و التهاب را تشدید می‌کنند. آن‌ها همچنین، در درمان تومورهای جامد به دلیل اثرشان بر درمان بدخیمی و یا برای کاهش ادم، درد، برهم‌خوردن تعادل الکترولیتی، تهوع و استفراغ یا برای کاهش واکنش سمی ناشی از رژیم‌های درمانی دیگر استفاده می‌شوند. GC توان تغییر سیگنال در مسیرهای کلیدی بقا را دارند که می‌تواند منجر به توقف رشد برگشت‌پذیر یا مرگ سلولی در انواع سلول‌های خاص شود. این تأثیر GCها از راه پیوستن به گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی صورت می‌گیرد (۱۲-۱۰ و ۹). GCها به صورت بالینی در درمان بدخیمی لنفاوی کاربرد دارند و همچنین پیشرفت چرخه سلولی در تعدادی سیستم (مانند ALL) را سرکوب می‌کنند (۱۳). هدف این بررسی، مطالعه تأثیر پردنیزولون بر رده سلولی K562 بود.

### رنگ آمیزی سلول‌های K562 با رنگ (Hoechst (33342):

یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۵۰۰ هزار سلول به ۲ خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای ریخته، سپس یک میکرولیتر از غلظت IC50 دارو نیز به یکی از چاهک‌ها ریخته و چاهک دیگر بدون تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محتویات هر چاهک به میکروتیوپ انتقال داده و در ۲۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محتویات رویی را دور ریخته، سپس، روی رسوب ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر متانول برای ثابت کردن سلول‌ها ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه گذاشته شد. سپس، دوباره سانتریفیوژ شد. روی رسوب سلولی ۵۰ میکرولیتر بافر PBS و ۲ میکرولیتر رنگ Hoechst رقیق‌شده (۱ میکرولیتر Hoechst و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS) افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بار دیگر بعد از سانتریفیوژ کردن روی رسوب ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS افزوده و سراسر به هم زده شد تا یکنواخت شود. یک قطره از نمونه‌ها را بر لام گذاشته و روی آن لامل قرار داده شد. لام‌های تهیه شده را به کمک میکروسکوپ فلورسانس و با فیلتر با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده و تصویربرداری شد (۱۷).

**واکاوی آماری:** نمودارها در Excel کشیده شد و نتایج به دست آمده نیز با نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA برای مقایسه‌ی تأثیر غلظت‌های مختلف دارو در مقایسه با گروه کنترل در سطح  $P < 0/05$  تجزیه و تحلیل شد.

### نتایج

**آثار سیتوتوکسیک پردنیزولون بر رده سلولی K562:** در این پژوهش از روش رنگ‌سنجی MTT برای بررسی اثر سمی پردنیزولون بر تقسیم سلولی K562 استفاده شد. به‌طور کلی آزمون MTT برای اندازه‌گیری سمی بودن و زیاد کردن سلولی استفاده می‌شود. بدین منظور سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت در غلظت‌های مختلف پردنیزولون تیمار شد. یافته‌ها، نشان‌دهنده تأثیر این دارو بر کاهش رشد سلولی در مقایسه با

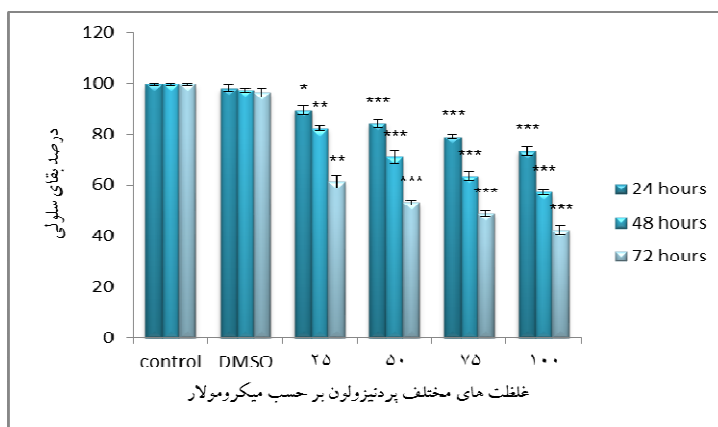
میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم MTT حل شده در ۱ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered saline) (Sigma, Germany) به همه چاهک‌ها افزوده، میکروپللیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک‌ها افزوده و پللیت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در شیکر انکوباتور (Biotek, South Korea)، قرار داده شد. در پایان شدت نور جذب‌شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (Stat Fax, USA) ثبت شد (۱۵). درصد سلول‌کشی دارو با فرمول زیر سنجیده شد:

$$\text{جذب چاهک شاهد} + (\text{Viability}) = \text{درصد بقای سلولی} \\ \times 100 \quad (\text{جذب چاهک نمونه}) \\ \text{Viability} - 100 = \text{درصد سلول‌کشی}$$

**الکتروفورز DNA:**  $10 \times 2$  سلول در ۲ فلاسک ریخته شده و یک فلاسک با غلظت IC50 پردنیزولون (Inhibitory Concentration-50) (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد سلول‌ها را می‌کشد و با نرم‌افزار Compusyn محاسبه شد) تیمار شده و فلاسک دیگر بدون تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز (حاوی ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی مولار EDTA، ۵۰ میلی مولار Tris و ۰/۵ درصد SDS،  $\text{pH} = 8$ ) و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K (Sigma, Germany) به سلول‌ها افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. DNA به روش فنل / کلروفورم / ایزوآمیل‌الکل (۱:۲۴:۲۵) استخراج شد. برای رسوب DNA، اتانول خالص و نمک ۶ مولار افزوده و پس از یک شبانه روز نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، درونمایه با بافر TE (Tris-EDTA) (دربدارنده ۱۰ میلی‌مولار Tris و ۱۰ میلی‌مولار EDTA در  $\text{pH} = 8$ ) (Sigma, Germany) حل شد. DNA آماده شده با دستگاه الکتروفورز (Bio Rad, America) با ولتاژ ۸۰ میلی‌ولت به مدت یک ساعت در ژل ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید جداسازی و تصویربرداری شد (۱۶).

ترتیب ۲۶ و ۴۳ درصد بود (نمودار ۱). داده‌ها به یک برنامه برنامه کامپیوتری اختصاصی به نام Compusyn که در بررسی کمی اثرات سینرژیک و انتاگونیسمی ترکیبات داروی و تعیین مقادیر IC50 آنها کاربرد دارند، وارد شدند. مقدار IC50 دارو توسط برنامه فوق ۶۷ میکرومولار محاسبه شد. یعنی در این غلظت، دارو توانست ۵۰ درصد سلول‌ها را بکشد (غلظت‌ها در همه گام‌های آزمایش تنها با گروه کنترل مقایسه شدند).

گروه کنترل بودند و همچنین دیده شد که این تأثیر کاهندگی رشد رابطه خطی با غلظت و زمان دارد به گونه‌ای که با افزایش غلظت دارو و همچنین مدت تیمار با دارو آثار کاهندگی رشد بیشتری دیده می‌شود. در همه غلظت‌های امتحان شده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بطور معنی‌دار شاهد کاهش در رشد سلولی بودیم ( $P < 0.05$ ). ولی بیشترین اثر در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و ۷۲ ساعت دیده شد که برابر ۵۸ درصد کاهش رشد سلولی بود. درصد سلول‌کشی در ۲۴ و ۴۸ ساعت به



نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف پردنیزولون بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) می‌باشد. [\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*)  $P < 0.05$ ]

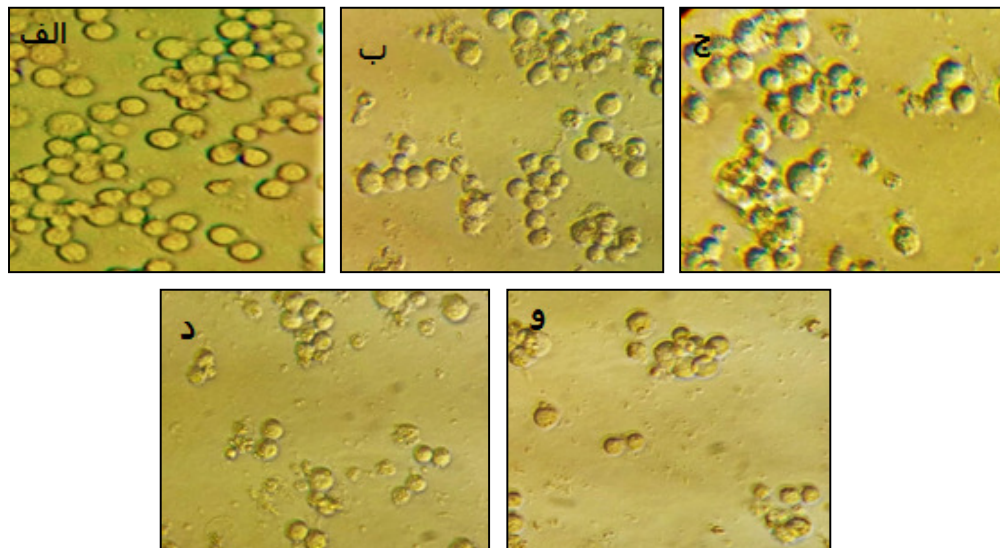
بررسی رخداد آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده با پردنیزولون در رنگ‌آمیزی Hoechst: سلول‌های K562 با غلظت‌های IC50 پردنیزولون برای بررسی آپوپتوز به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود، با میکروسکوپ فلورسنت و رنگ‌آمیزی هوخست نشان داده شد بین سلول‌های تیمار شده با پردنیزولون پس از گذشت ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌هایی با هسته‌ی تکه‌تکه شده وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است (شکل ۲).

رخداد آپوپتوز در سلول‌های K562 توسط الکتروفورز: بر پایه یافته‌ها پردنیزولون سبب تغییر الگوی ژنومی سلول‌های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (کنترل)

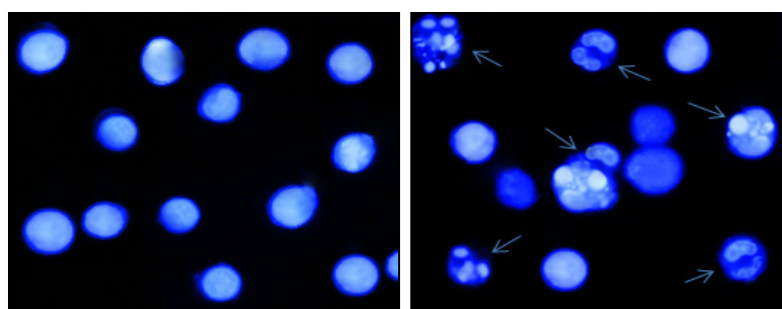
آثار مورفولوژیک پردنیزولون بر رده سلولی K562: شکل ظاهری سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی پردنیزولون بعد از ۷۲ ساعت را در شکل ۱ می‌توان مشاهده کرد که توسط میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی  $\times 40$  تصویربرداری شده است. به علت تیمار سلول‌های سرطانی با دارو، تغییرات مورفولوژیکی در آن‌ها مشاهده شده است. با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که اثر داروی پردنیزولون وابسته به دز می‌باشد به طوری که با افزایش دز دارو میزان آپوپتوز سلولی افزایش می‌یابد و شکل ظاهری سلول‌ها بهم ریخته و میزان رشد سلول نیز کاهش می‌یابد (شکل ۱).

این پدیده در سلول‌های کنترل دیده نمی‌شود.

می‌شود (شکل ۳). DNA سلول‌های K562 تیمار شده، بر ژل الکتروفورز حرکت کرده، موجب ایجاد باندها می‌شود. در حالی که



شکل ۱. شکل ظاهری سلول‌های رده K562 پس از ۷۲ ساعت: الف) کنترل (بدون تیمار) ب) غلظت ۲۵  $\mu\text{M}$  دارو ج) غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  دارو د) غلظت ۷۵  $\mu\text{M}$  دارو و) غلظت ۱۰۰  $\mu\text{M}$  دارو. مشاهده شد با افزایش غلظت دارو، میزان مرگ سلولی افزایش و میزان رشد سلول‌ها کاهش یافت.



شکل ۲. سلول‌های K562 رنگ‌آمیزی شده با Hoechst در میکروسکوپ فلورسانس: چپ) سلول‌های بدون تیمار، راست) سلول‌های تیمار شده با پردنیزولون



شکل ۳. بررسی وضعیت مرگ سلولی سلول‌های K562 تحت تیمار با غلظت IC50 پردنیزولون بعد از ۷۲ ساعت بر روی ژل الکتروفورز: چاهک سمت چپ) بدون تیمار، چاهک سمت راست) تیمار شده با پردنیزولون



## بحث و نتیجه گیری

مطالعه‌ی ما نیز نشان داد که پردنیزولون موجب القای آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود. همچنین، تغییر مورفولوژی سلول‌های K562 در رنگ‌آمیزی Hoechst نیز نشان دهنده آپوپتوز بود. ریزگان بدست آمده از مکانیسم این داروها را می‌توان چنین بیان کرد: (۱) پیوستن داروی GC به گیرنده و به دنبال آن هومودایمر شدن گیرنده‌ها و سپس ایجاد کمپلکس Glucocorticoid-GR. این کمپلکس وارد هسته شده و باعث فعالسازی بیان ژن می‌شود. هم‌چنین، این گیرنده‌ها می‌توانند به صورت مونومر باقی بمانند و باعث مهار فعالیت عوامل رونویسی مانند AP-1 و NF- $\kappa$ B شود. در هر دو حالت مهار تولید سیتوکاین‌ها، توقف چرخه سلولی و در پایان القای آپوپتوز رخ خواهد داد (۲۵). (۲) این داروها می‌توانند کلسیم اندامک شبکه اندوپلاسمی را درون سیتوزول آزاد کنند. در نتیجه افزایش میزان کلسیم در میتوکندی می‌تواند باعث رها شدن سیتوکروم C شده و بدین سان سبب القای آپوپتوز شود (۲۶). تحقیقی در سال ۲۰۱۴ بر اثربخشی متیل پردنیزولون در بیماران با سرطان پیشرفته که مخدر مصرف می‌کنند صورت گرفت پی برده شد که مصرف روزانه ۳۲ میلی‌گرم از این دارو در کاهش درد تأثیر زیادی ندارد اما خستگی، کاهش اشتها و رضایت در بیمار را بهبود می‌بخشد (۲۷). بنا به گزارش یک تیم تحقیقاتی در سرطان پروستات مقاوم به اختگی (castration-resistant prostate cancer) هر دو داروی دگزامتازون و پردنیزولون موثر بودند اما در این سرطان دگزامتازون فعال بوده و برتری دارد (۲۸). همچنین، ترکیب داروی دوستاکسل و پردنیزولون در سرطان پروستات مقاوم به هورمون (Hormone-refractory prostate cancer) می‌تواند به عنوان درمانی استاندارد و مؤثر بکار رود (۲۹). Xu و همکاران در سال ۲۰۰۲ تحقیقی بر روی اثر گلوکوکورتیکوئیدها در سرطان تخمدان انسانی لاین سلولی 3AO انجام دادند که در این تحقیق نشان داده شد که GCها بطور چشمگیر پرولیفراسیون را سرکوب کرده و اینکار با روشی وابسته به غلظت و زمان انجام شد که در دوره تیمار، شکل بیرونی سلول‌های 3AO از سلولی‌های اپی‌تلیالی تی‌پیک به حالت شبه فیبروبلاست تغییر یافت و بدین منظور بیان آلکالین

در کشور ما سرطان خون دومین علت مرگ‌ومیر (ناشی از سرطان) است (۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد که نزدیک ۲۰٪ این مرگ و میرها با التهاب و عفونت مزمن در مسیر تومور زایی همراه است (۱۸) و یکی از ویژگی‌های خانواده دارویی GC پیشگیری از تشدید التهاب است (۹). ژن کد کننده گیرنده گلوکوکورتیکوئید (GR) بر کروموزوم ۵ قرار گرفته است (5q31) (32). ژن کد کننده GR انسانی (hGR)، سه دوم دارد. دومین انتهای آمینی، دومین اتصال به DNA و دومین اتصال به لیگاند است. پیرایش پی در پی در جایگاه آگزون ۹ می‌تواند دو ایزوفرم گوناگون (آلفا و بتا) را ایجاد کند. ایزوفرم آلفای GR مسئول القای آپوپتوز است. گفته می‌شود ارتباط نزدیکی بین انواع ایزوفرم‌های آلفا و آپوپتوز القایی توسط GC وجود دارد. به بیان بهتر، تأثیر GC بر سلول، وابسته به ایزوفرمی از گیرنده بوده که در سلول بیان شده است (۱۹). GCها می‌توانند مرگ سلولی را با القای اعضای پروآپوپتیک Bcl-2 همچون Bid, Bim و Bad یا مهار اعضای آنتی‌آپوپتیک هم‌چون Bcl-2, Mcl-1 و Bcl-Xl فعال کنند (۱۱). مطالعات Rathmell در سال ۲۰۰۲، نشان از آن دارد که نبودن پروتئین‌های Bak و Bax سبب مقاومت در برابر آپوپتوز القایی توسط GCها می‌شود. بنابراین بودن این دو پروتئین در آپوپتوز القایی داروهای GC بایسته است و این نیز به معنی ارتباط معنی‌دار این دو پروتئین با شیوه کار داروهای GC است (۲۰). اثر *In vivo* پردنیزون در بیان پروتئین‌های خانواده Bcl-2 در کودکان دچار لوسمی لنفوبلاستیک حاد بررسی شد. در این پژوهش دریافتند که GCها آپوپتوز را در *in vivo* القا می‌کند، بیان پروتئین Bax افزایش یافته و سطح Bcl-2 و Bcl-xl در بیشتر بیماران کاهش می‌یابد (۲۱). همچنین، تأثیر مستقیمی بر بافت استخوانی داشته و افزون بر القای آپوپتوز در استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها، میزان تشکیل استخوان را نیز کاهش می‌دهد (۲۲). GCها مرگ سلولی را (به تنهایی یا در ترکیب با دیگر القاگرهای مرگ) در برخی سلول‌ها و بافت‌های غیرلنفوئیدی مانند: ائوزینوفیل (۲۳) و فیبروبلاست (۲۴) القا می‌کند. یافته‌های ژل الکتروفورز در

دارو نسبت به سایر داروهای شیمی‌درمانی و با توجه به تأثیر مثبت و اهمیت این خانواده دارویی (GC)، پردنیزولون از این خانواده برای مطالعه و بررسی کاندید شد. یافته‌های مطالعه ما نشان‌دهنده نقش مؤثر داروی گلوکوکورتیکوئیدی پردنیزولون در القای آپوپتوز بویژه در غلظت‌های بالاتر رده سلولی K562 (لوسمی میلوئید مزمن) بوده‌است. همه مسیرهای درگیر در پیام‌رسانی سلولی این دارو هنوز به روشنی نشان داده نشده‌اند و نیاز به بررسی بیشتر دارد. از سوی دیگر ارزیابی تأثیر آینده این دارو با دیگر داروهای گلوکوکورتیکوئیدی و غیرگلوکوکورتیکوئیدی هم تحقیقات بیشتری می‌طلبد.

بر خود لازم می‌دانیم استادان و مسئولان گرامی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه و معاونت پژوهشی دانشگاه که با کمک و پشتیبانی خویش ما را در این پژوهش یاری کردند، ارج نهاده و سپاسگزاری نماییم. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

فسفاتاز (AKP) و CA125 بررسی و دیده شد که بیان AKP افزایش ولی بیان CA125 کاهش یافته است. بنابراین، نتیجه گرفته شد که GC افزون بر سرکوب رشد در این لاین سلولی، باعث القای تمایز نیز می‌شود (۳۰). در این تحقیق اثر پردنیزولون بر رشد رده سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بررسی شد. این دارو توانست رشد سلول‌های سرطانی را به‌طور معنی‌دار به‌صورت وابسته به دوز و زمان مهار کند ( $P < 0.05$ ) که این یافته با نتایج تحقیقات دیگر مشابهت دارد. همچنین، با افزایش غلظت، توان سلول‌کشی دارو افزایش یافت و بیشترین اثر پس از ۷۲ ساعت دیده شد. از دیرباز تحقیقات نشان‌دهنده تأثیر مثبت و امیدوارکننده پردنیزولون بر مهار رشد تومورهای جامد در مطالعات *In vivo* بوده‌اند (۳۱). از سوی دیگر با تدوین برنامه ویژه‌ای برای تجویز پردنیزولون، می‌توان عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد و بنا به کمتر بودن عوارض این

## منابع

1. Saffar A, Rahgozar M, Shahi F, Biglarian A. Survival analysis of acute myeloid leukemia. *Razi J Med Sci* 2015; 22(134): 41-48. [Text in Persian]
2. Salehi M, Gohari MR, Vahabi N, Zayeri F, Yahyazadeh SH, Kafashian MR. Comparison of artificial neural network and cox regression models in survival prediction of breast cancer patients. *J ILAM Univ Med Sci* 2013; 21(2): 120-128. [Text in Persian]
3. Nikpour S, Rahimian Sh, Shokrabi S, Haghani H. Related Factors of Acute Leukemia in Children and the Role of Breast Feeding. *Iranian J Endocrinology and Metabolism* 2011; 14(1): 63-67. [Text in Persian]
4. Habek D, Habek JC, Galic J, Goll-Baric S. Acute abdomen as first symptom of acute leukemia. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2004; 270(2): 122-3.
5. Hejazi S, Gholami A, Salarilak S, Khalkhali HR, Jahromi LM. Incidence rate of acute leukemia in West Azarbaijan during 2003-2008. *Urmia Medical J* 2010; 21(2): 243-8. [Text in Persian]
6. O'Dwyer M. Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. *The Oncologist* 2002; 7(Supplement 1): 30-8.
7. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(10): 3343-56.
8. 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.
9. Garg V, Jusko WJ. Bioavailability and reversible metabolism of prednisone and prednisolone in man. *Biopharmaceutics & drug disposition* 1994; 15(2): 163-72.
10. Rutz HP. Effects of corticosteroid use on treatment of solid tumours. *The Lancet* 2002; 360(9349): 1969-70.
11. Rutz HP, Herr I. Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biology & Therapy* 2004; 3(8): 715-8.
12. Schlossmacher G, Stevens A, White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinology* 2011; 211(1): 17-25.
13. Ausserlechner MJ, Obexer P, Böck G, Geley S, Kofler R. Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death & Differentiation* 2004; 11(2): 165-74.
14. Xu MH, Zhang GY. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11(11): 1693-6.



15. Nakamura S, Kobayashi M, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, et al. COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo. *Cancer Therapy* 2004; 2: 153-66.
16. Bellosillo B, Pique M, Barragan M, Castano E, Villamor N, Colomer D, et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998; 92(4): 1406-14.
17. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8(2):460-4.
18. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2011; 96(1): 27-36.
19. Gruver-Yates AL, Cidlowski JA. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells* 2013; 2(2): 202-23.
19. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB. Deficiency in Bax and Bcl-2 perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nature Immunology* 2002; 3(10): 932-9.
21. Casale F, Addeo R, D'Angelo V, Indolfi P, Poggi V, Morgera C, et al. Determination of the in vivo effects of prednisone on Bcl-2 family protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International J Oncology* 2003; 22(1): 123-8.
22. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 2004; 145(4): 1835-41.
23. Druilhe A, Letuve S, Pretolani M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action. *Apoptosis* 2003; 8(5): 481-95.
24. Hammer S, Sauer B, Spika I, Schraut C, Kleuser B, Schafer-Korting M. Glucocorticoids mediate differential anti-apoptotic effects in human fibroblasts and keratinocytes via sphingosine-1-phosphate formation. *J Cellular Biochemistry* 2004; 91(4): 840-51.
25. Inaba H, Pui Ch. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone. *Lancet Oncology* 2010; 11(11): 1096-1106.
26. Stam RW, Den Boer ML, Schneider P, de Boer J, Hagelstein J, Valsecchi MG, et al. Association of high-level MCL-1 expression with in vitro and in vivo prednisone resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010; 115(5): 1018-25.
27. Paulsen O, Klepstad P, Rosland J, Aass N, Albert E, Fayers P, et al. Efficacy of methylprednisolone on pain, fatigue, and appetite loss in patients with advanced cancer using opioids: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *J Clinical Oncology* 2014; 32(29): 3221-3228.
28. Venkitaraman R, Lorente D, Murthy V, Thomas K, Parker L, Ahiabor R, et al. A randomised phase 2 trial of dexamethasone versus prednisolone in castration-resistant prostate cancer. *European Urology* 2015; 67(4): 673-9.
29. Naito S, Tsukamoto T, Koga H, Harabayashi T, Sumiyoshi Y, Hoshi S, et al. Docetaxel plus prednisolone for the treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer: a multicenter Phase II trial in Japan. *Japanese J Clinical Oncology* 2008; 38(5): 365-72.
30. Xu MJ, Fang GE, Liu YJ, Song LN. Effects of glucocorticoid on proliferation, differentiation, and glucocorticoid receptor expression in human ovarian carcinoma cell line 3AO. *Acta Pharmacologica Sinica* 2002; 23(9): 819-23.
31. Schiffelers RM, Metselaar JM, Fens MH, Janssen AP, Molema G, Storm G. Liposome-encapsulated prednisolone phosphate inhibits growth of established tumors in mice. *Neoplasia* 2005; 7(2): 118-27.

# Anti-Proliferative and Apoptotic Effect of Prednisolone on K562 Cell Line (Chronic Myeloid Leukemia)

Vaezi S M (MSc)<sup>1</sup>- \* Mohammadzadeh M (PhD)<sup>2</sup>- Pazhang Y (PhD)<sup>2</sup>

\*Corresponding Address: Departemant of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

Email: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

Received: 2/Jul/2016 Revised: 26/Sep/2016 Accepted: 20/Nov/2016

## Abstract

**Introduction:** Nowadays, rising of cancer prevalence has increased the importance of its treatment. Leukemia is the cancer of blood-forming tissues which derives from red and white blood progenitors cells. Prednisolone (Family members of glucocorticoid drugs) with anti-tumor and apoptotic effects has been considered by many researchers.

**Objective:** The aim of this study was the investigation of the effect of prednisolone on K562 cell line.

**Materials and Methods:** First, The K562 cells were cultured. After, by using different concentrations of prednisolone, anti-tumor properties of this drug on K562 cells was measured by MTT assay after 72 hours. Finally, Hoechst (33342) staining and DNA electrophoresis were used for study of apoptosis. Data analysis was performed using SPSS software and ANOVA test ( $P < 0.05$ ).

**Results:** In this study, anti-tumor effect of prednisolone on K562 leukemia cell line was confirmed. The results also showed that prednisolone, compared with the control group, had cytotoxic activity that is highest in 100 $\mu$ M at 72 hours. Statistical analysis indicated that this drug inhibited the growth of K562 cells ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Based on the results, prednisolone is an effective agent for chronic myeloid leukemia therapy and prevention. We suggest that further studies on the effects of this drug on animal models and human be done.

**Conflict of interest:** None declared.

**Key words:** Apoptosis\ Prednisolone\ K562 Cell Line \ Anti-proliferation\ leukemia.

**Please cite this article as** Vaezi S. M., Mohammadzadeh M., Pazhang Y., Anti-proliferative and apoptotic Effects of prednisolone on K562 cell line (chronic myeloid leukemia). J of Guilan Univ of Med Sci 2016; 25(100):38-46. [Text in Persian]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

2. Departemant of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran