مقاله پژوهشی

ارزیابی فعالیت ضد توموری والپروئیک اسید روی سلول‌های K562 در محیط in vitro

شهین اعلائی*، مهدی محمدزاده، یعقوب پاژنگ

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه به‌منظور بررسی اثر ضد توموری داروی والپروئیک‌اسید بر روی سلول‌های سرطانی K562 در شرایط in vitro انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های لوسمی رده K562 در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده کشت داده شد؛ سپس غلظت‌های مختلف داروی والپروئیک‌اسید تهیه و خاصیت سیتوتوکسیته آن در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار، به روش MTT سنجیده شد سپس IC50 دارو برآورد گردید و در مرحله بعد برای بررسی آپوپتوز از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی Hoechst استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که اثرات ضد توموری والپروئیک‌اسید به‌صورت وابسته به دوز و زمان افزایش می‌یابد IC_{50} والپروئیک اسید در ۸۰ µm/ ml مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی سلول‌ها نیز نشان داد که این دارو دارای اثر آپوپتوزی بود.

نتیجه‌گیری: از نتایج به‌دست‌آمده می‌توان چنین استنباط کرد که اثر مهاری والپروئیک‌اسید بر روی سلول‌های K562 وابسته به زمان و دوز است که بیشترین اثر مهاری در ۷۲ ساعت بعد از تیمار و بالاترین غلظت مشاهده گردید؛ بنابراین این دارو می‌تواند در پیشگیری و درمان لوسمی میلوئیدی مزمن مؤثر واقع شود.

کلمات کلیدی: والپروئیک اسید، In vitro، خواص سرطانی، رده سلولی K562، آپوپتوزیس

مقدمه

لوسمی یا سرطان خون یکی از انواع شایع و مهلک سرطان‌ها است (۱). لوسمی، سرطان بافت‌های خون‌ساز بدن، شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی بوده و توسط سلول‌های سفید خون و لنف به وجود می‌آید. گلبول‌های سفید خونی معمولاً در صورت نیاز بدن، به طریقی منظم و کنترل‌شده رشد و تقسیم می‌شوند؛ اما در بیماری لوسمی در این روند اختلال ایجادشده و رشد سلول‌های خونی از کنترل خارج می‌شوند (۲). لوسمی میلوئید مزمن یکی از شناخته‌شده‌ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابجایی دوطرفه بین ژن ABL در کروموزوم ۹ و ژن BCR موجود در کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توانی به وجود می‌آید. نتیجه این جابجایی کروموزومی منجر به شکل-گیری ژن الحاقی BCR – ABL می‌شود (۳). این جابجایی همچنین با نام کروموزوم فیلادلفیا نیز شناخته می‌شود که در بیش از ۹۵ درصد از بیماران مثبت است. محصول این ژن الحاقی در CML پروتئین ۲۱۰ کیلودالتونی P210BCR – ABL است که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم می‌باشد. این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌های رده میلوئیدی و اختلال در مرگ برنامه‌ریزی سلولی (آپوپتوزیس) می‌گردد (۴ و ۵). رده سلول‌های سرطانی K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوییدی هستند که برای اولین بار از یک خانم ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جداسازی شده است. این رده جزء اریترولوکمیا است که بر اثر همراهی با ویروس اپشتاین‌بار و مارکرهای سلولی لنفوسیتی تمایزیافته‌اند، به‌دست‌آمده 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 برنامه‌ریزی‌شده ژنتیکی سلول گفته می‌شود که بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک در ایجاد آن نقش مهمی ایفا می‌کنند. اغلب مولکول‌ها و مسیرهای سیگنالی درگیر در این فرایند به‌خوبی شناخته‌شده‌اند (۹). یکی از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی توانایی در گریز از آپوپتوز است که نتیجه‌ی آن بلوکه کردن مسیر سیگنالی مرگ سلولی است

* **نویسنده مسئول: شهین اعلایی**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
Email: shahin_aalaei@yahoo.com

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

(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). به‌طوری‌که هدف مهم پیشرفت داروهای ضد سرطانی و شیمی‌درمانی آسان کردن آپوپتوز در سلول‌های نئوبلاستیک است (۱۰).

والپروئیک‌اسید اولین بار در سال ۱۸۸۲ توسط بورتن ساخته شد که به‌طور طبیعی در سنبل کوهی یافت می‌شود (۱۲). والپروئیک‌اسید یک کربوکسیلیک اسید است که در دمای اتاق مایعی شفاف بوده و با سدیم هیدروکسید که باز است واکنش می‌دهد و نمک سدیم والپروات جامد را تشکیل می‌دهد، در سال ۱۹۶۲ پژوهشگر فرانسوی Pierr Eymard به‌طور غیرمنتظره خواص ضد صرعی آن را زمانی که آن را به‌عنوان حامل تعدادی از دیگر ترکیبات استفاده می‌کرد، کشف کرد (۱۳). والپروئیک-اسید به‌عنوان داروی ضد صرع در فرانسه در سال ۱۹۶۷ پذیرفته شد و به‌طور گسترده تجویز شد (۱۴).

ابتدا در پزشکی در درمان صرع، دیوانگی دوقطبی و پیشگیری میگرن استفاده گردید (۱۵). اخیراً در درمان ایدز و سرطان به علت اثرات آن در مهار هیستون داستیلازها، آزمایش‌شده است (۱۶). همچنین اخیراً برای حمایت علیه یک حمله‌ی ناگهانی القاکننده‌ی فسفاتیدیل کولین (۵-۴-۳) تری فسفات (PIP3) به‌عنوان یک مکانیسم درمانی قدرتمند نشان داده‌شده است (۱۷) همچنین اثرات مهارکننده هیستون داستیلاز را نیز داراست. مهار هیستون داستیلاز توسط پیشرفت بیشتر رونویسی ساختارهای فعال کروماتین مانند ارائه مکانیسم اپی‌ژنتیک برای بسیاری از اثرات محافظ عصبی به والپروات نسبت داده می‌شود. مولکول‌های واسطه‌ی وساطت کننده این اثرات شامل VEGF، BDNF و GDNF هستند و به‌نظر می‌رسد بیشترین تأثیر ضد صرعی، مربوط به طول زنجیره کربنی ۸-۵ اتمی آن باشد. آمیدها و همچنین استرهای اسیدوالپروئیک نیز، داروی ضد صرع فعالی هستند (۱۸ و ۱۱) و به‌عنوان مهارکننده هیستون‌داستیلاز عمل می‌کنند، هیستون داستیلازها (HDACs) در سلول‌های سرطانی بیان بالا دارند که منتهی به تغییر بیان و فعالیت تعدادی پروتئین‌های دخیل در کارسینوژنز می‌شوند و تمایز و آپوپتوز را در سلول‌های بدخیم در محیط in vitro را القاء می‌کنند. شواهد متعددی نشان می‌دهد که فعالیت غیرطبیعی هیستون داستیلازها باعث سرکوبی نسخه‌برداری ژن‌های سرکوب گر تومور شده که این مسئله نقش اساسی در پیشرفت تومور دارد و شواهد زیادی پیشنهاد می‌کند که داستیلاسیون کلی هیستون ممکن است در تهاجم و متاستاز سلول سرطانی دخیل باشد (۱۹)؛ لذا ازآنجایی‌که داروی ضد صرع والپروئیک‌اسید باعث مهار داستیلاسیون هیستون‌ها می‌شود، در این مطالعه از این خاصیت والپروئیک اسید برای مهار هیستون داستیلازها در سلول‌های K562 استفاده شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا یک عدد فلاسک T25 حاوی رده‌ی سرطانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (C122) تهیه و کشت داده شد. هنگامی‌که محیط کشت سلول‌ها مصرف و رنگ آن زرد گردید، به این مفهوم است که رشد سلول‌ها به‌قدری بوده که تمام سطح فلاسک را پوشانده و لازم است که محیط تعویض شود. سلول‌های K562 در داخل فلاسک به‌صورت شناور بوده و برای تعویض محیط کشت آن‌ها نیاز به سانتریفوژ است. برای تعویض محیط کشت، ابتدا فلاسک از انکوباتور خارج و در زیر هود با استفاده از پیپت‌گیر اتوماتیک و پیپت استریل محتویات فلاسک خارج‌شده و به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس لوله‌ها با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ مایع رویی در زیر هود دور ریخته شد. سلول‌های باقی‌مانده در ته فالکون به همراه محیط کشت RPMI و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به فلاسک‌های جدید جهت کشت دادن جدید منتقل و سپس در انکوباتور CO_2 گذاشته شدند (۲۰).

برای تهیه‌ی غلظت‌های مختلف داروی والپروئیک اسید، داروی موردنظر از داروخانه تهیه گردید. در مرحله بعد قرص‌ها با هاون پودر شد. با توجه به وزن مولکولی دارو و غلظت‌های موردنظر از دارو (در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ گرم بر میلی‌لیتر) مقدار موردنظر را وزن کرده و در یک میلی‌لیتر DMSO و متانول حل گردید. سپس ۲ میکرولیتر از محلول تهیه‌شده در یک میلی‌لیتر محیط کشت خالی حل شده و بدین ترتیب غلظت‌های موردنظر تهیه گردید.

برای سنجش MTT جهت بررسی سیتوتوکسیسیته والپروئیک‌اسید پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول‌های k562 به روش تریپان‌بلو، مقدار ۵۰ میکرولیتر (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMA به همراه ۱۵ درصد FBS) به هریک از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف داروی والپروئیک‌اسید به چاهک‌ها اضافه گردید (هر تیمار در سه چاهک تکرار شد). برای هریک از نمونه‌های کنترل (بدون تیمار) و DMSO نیز (۲ میکرولیتر DMSO در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت) شش تکرار انجام شد. در مرحله‌ی بعد پلیت‌ها به‌طور جداگانه به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۴-۳ و ۵ دی متیل تیازول ۲-۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده‌شده و میکروپلیت به مدت چهار ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیاء کرده و آن را به‌صورت ذرات نامحلول بنفش‌رنگ فورمازون درآورد. در پایان کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازون تشکیل‌شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک‌ها و قرار دادن پلیت‌ها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب‌شده (OD) در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (استات فاکس، آمریکا) ثبت گردید. درصد سلول کشی غلظت‌های مختلف دارو با فرمول زیر محاسبه گردید (۲۱).

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

برای سنجش میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های K562 به روش ژل الکتروفورز DNA ابتدا باید سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف دارو تیمار شوند. برای این منظور ابتدا سلول‌های K562 از داخل فلاسک برداشته و با استفاده از تریپان بلو شمارش شدند. سوسپانسیون سلولی همراه محیط کشت و ۱۰ درصد FBS تهیه گردید. درون هر فلاسک T25 از این سوسپانسیون حاوی ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر، ریخته شد. غلظت IC_{50} (Inhibit cellular proliferation 50%) والپروئیک‌اسید به فلاسک‌ها اضافه و یک فلاسک هم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، سلول‌های موجود در هر فلاسک به‌صورت مجزا در میکروتیوپ‌های یک میلی‌لیتری جمع آوری شد تا استخراج DNA از آن‌ها صورت گیرد (۲۲).

برای استخراج DNA از سلول‌های تیمار داده‌شده ابتدا بافر لیز سلولی شامل ۲۵ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (NaCl)، ۱۰ میلی‌مولار Tris بازی و سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱ درصد تهیه و pH آن برابر با ۸ تنظیم شد. سلول‌های تیمار داده‌شده توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در ته میکروتیوپ جمع‌آوری و دو بار توسط بافر PBS شستشو داده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی به هر میکروتیوپ اضافه و به همراه ۱۵ میکرولیتر پروتئیناز K در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی در میکروتیوپ جدید ریخته شد و به‌اندازه‌ی حجم سلول‌ها محلول فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به هر نمونه اضافه و ورتکس گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی در میکروتیوپ جدید برداشته‌شده که حاوی DNA است و مایع پروتئین لزج پایین که توسط فنل حل‌شده است، دور ریخته شد. البته در صورت لزوم این مرحله را می‌توان سه بار تکرار کرد. سپس به‌اندازه 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 یک‌شب در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا اسید نوکلئیک استخراج‌شده ته‌نشین گردد. سپس با دور ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله‌ی بعد شستشو توسط الکل ۷۰ درصد، صورت گرفت. سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گردید و مایع رویی دور ریخته شد. DNAهای استخراج‌شده در انکوباتور ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند و در خاتمه ۳۰ میکرولیتر بافر TE به آن‌ها اضافه گردید (۲۳).

برای الکتروفورز DNA پس از حل شدن DNA استخراج‌شده توسط بافر TE (حاوی ۱۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۰/۲ میلی‌مولار Na_2EDTA و pH= ۷/۵)، ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها با حدود ۲ میکرولیتر بافر لودینگ مخلوط و بر ژل موردنظر تزریق گردید. 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

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

تانک الکتروفورز پوشانده شد و به مدت ۱ ساعت به نمونه‌ها اجازه داده شد که روی ژل و درون بافر TBE حرکت کنند که برحسب وزن موجود خود ایجاد باند نمودند. درنهایت توسط دستگاه، عکس‌برداری از ژل‌ها صورت گرفت (۲۴).

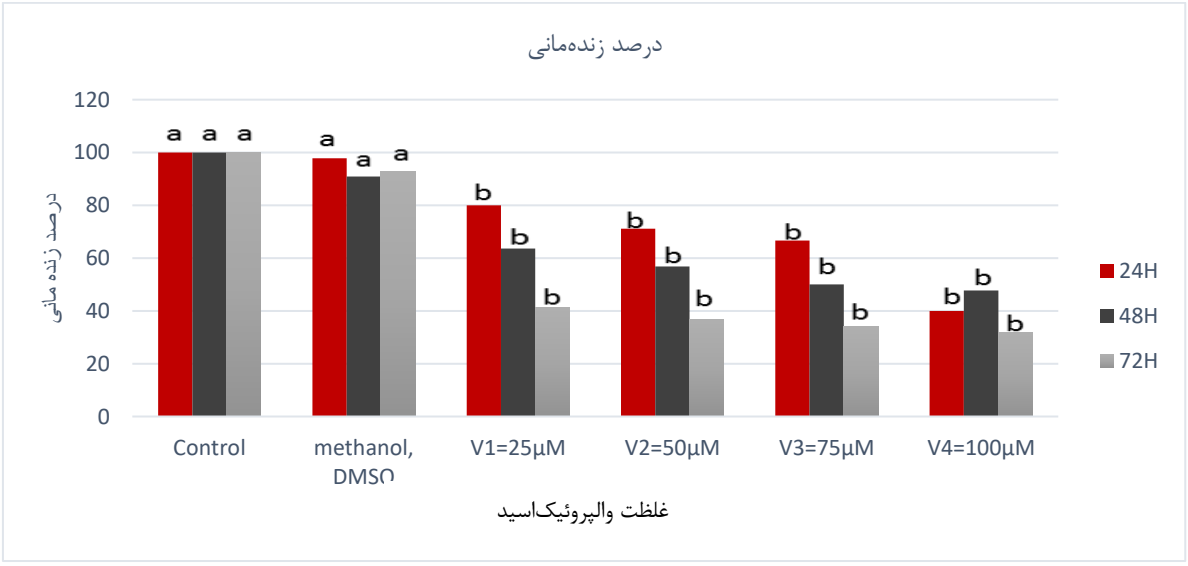
جهت رنگ‌آمیزی Hoechst برای بررسی مرگ سلولی ابتدا به هر یک از ۱۶ چاهک، از پلیت ۲۴ خانه‌ای یک میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰٪ FBS ریخته شد و سپس یک میکرولیتر از غلظت‌های مختلف والپروئیک‌اسید و غلظت IC_{50} دارو به چاهک‌ها افزوده گردید. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محتویات هر چاهک به میکروتیوپ انتقال یافت و در ۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. محتویات رویی دور ریخته شد و روی رسوب ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر متانول جهت فیکس کردن سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس دوباره سانتریفوژ شده روی رسوب سلولی ۵۰ میکرولیتر بافر PBS و ۲ میکرولیتر رنگ Hoechst رقیق‌شده (یک میکرولیتر Hoechst و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS) افزوده و 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 به‌دست‌آمده را روی لام گذاشته و روی آن لامل قرار گرفت. لام‌های تهیه‌شده زیر میکروسکوپ فلوئورسانس با فیلتر بزرگنمایی ۱۰۰، مشاهده و عکس گرفته شد (۲۵).

نتایج

برای بررسی فعالیت سلول‌کشی غلظت‌های مختلف والپروئیک‌اسید، یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که نمونه‌های تیمار شده با والپروئیک‌اسید در مقایسه با گروه شاهد که هیچ دوزی از والپروئیک‌اسید را دریافت نکرده بودند دارای فعالیت سلول‌کشی هستند. همچنین بر اساس این نتایج با افزایش غلظت والپروئیک‌اسید، میزان سلول‌کشی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد، پس می‌توان گفت که فعالیت سلول‌کشی والپروئیک‌اسید وابسته به دوز است. همچنین فعالیت سلول‌کشی والپروئیک‌اسید وابسته به زمان است و با گذر زمان، فعالیت سلول‌کشی افزایش می‌یابد. این حالت در تمامی زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت مشاهده می‌گردد (نمودار ۱). بیشترین اثر در ۷۲ ساعت و غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده گردید که اثر سایتوتوکسیک آن ۶۸/۳ درصد است. همچنین IC_{50} والپروئیک‌اسید برابر با ۸۰ میکرومولار توسط نرم‌افزار Compusyn نشان داده شد.

X-int: 1.90407
Y-int: -0.9664 +/- 0.05295
m: 0.50757 +/- 0.03013
Dm: 80.1799
r: 0.99650

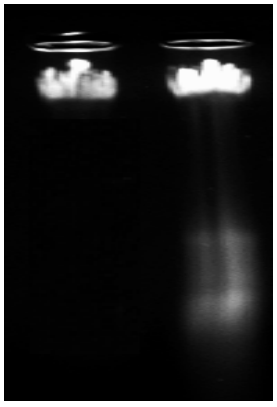
نتایج حاصل از الکتروفورز سلول‌های K562 تیمار شده با داروی والپروئیک‌اسید به مدت ۷۲ ساعت را می‌توان در شکل ۱



نمودار ۱- مقایسه‌ی میزان زنده‌مانی غلظت‌های مختلف والپروئیک‌اسید بر روی سلول‌های K562

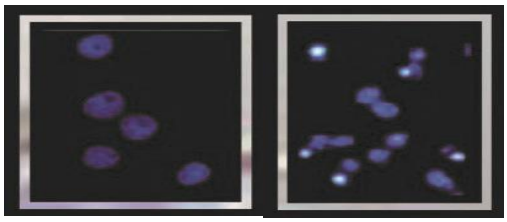
[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

مشاهده نمود. نتایج نشان می‌دهد که داروی والپروئیک‌اسید موجب ایجاد باند و اسمیر در سلول‌های K562 می‌شود بنابراین باعث مرگ سلولی از طریق القای آپوپتوز می‌گردد.



شکل ۱- بررسی وضعیت مرگ سلولی، سلول‌های K562 تحت تیمار با غلظت IC_{50} والپروئیک‌اسید بعد از ۷۲ ساعت، چاهک سمت راست. کنترل چاهک سمت چپ.

تغییرات مورفولوژیکی مشاهده‌شده در سلول‌های تیمار شده نشان‌دهنده‌ی آپوپتوز سلولی است؛ بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که والپروئیک‌اسید موجب القای آپوپتوز می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲- سلول‌های k562 رنگ‌آمیزی شده با Hoechst زیر میکروسکوپ فلورسانس. راست: سلول‌های بدون تیمار چپ: سلول‌های تیمار شده با والپروئیک‌اسید

بحث و نتیجه‌گیری

والپروئیک‌اسید یک مهارکننده‌ی مؤثر HDACها است که به‌طور مستقیم مهارکننده فعالیت آنزیماتیک HDAC در غلظت ۰/۵ mM والپروئیک اسید است. phiel و همکاران بعد از اثبات توانایی والپروئیک‌اسید برای تنظیم فعالیت رونویسی به‌وسیله چندین پروموتور، فعالیت HDAC1 را در حضور والپروئیک‌اسید در سلول‌های Hela مورد سنجش قراردادند که نتیجه آن بیان بالای HDAC1 بود. انتظار می‌رود که والپروئیک‌اسید HDAC1 را در محیط in vitro در روش وابسته به دوز با ۰/۴IC_{50}mM که محدوده‌ی درمانی برای درمان والپروئیک‌اسید در انسان است، مهار کند.

هم آپوپتوز و هم توقف چرخه سلولی توسط تیمار سلول‌های سرطانی تیروئیدی با ۱mM والپروئیک‌اسید القا می‌شود. والپروئیک‌اسید همچنین فعالیتی مخالف تمایز مدل‌های سلولی تومور کارسینومای تیروئید دارد. درمان با والپروئیک‌اسید در دوز بین ۰/۵ و ۲ mM در یک رده پاپیلار و سه رده سلولی فولیکولار تیروئید منتهی به مهار رشد، ۵۹-۲۶٪ در ۴۸ ساعت و تا حدود ۷۷ درصد در ۷۲ ساعت می‌شود. مطالعه والپروئیک‌اسید در گیرنده آندروژن پروستات نشان می‌دهد که درمان با والپروئیک‌اسید به مدت سه روز در غلظت‌های ۱/۵-۲mM منتهی به کاهش بقای سلول‌ها توسط کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوزیس می‌شود. در مطالعات دیگر نیز والپروئیک‌اسید در درمان نوروبلاستوما سرطان پستان، گلیوما، سرطان روده بزرگ، هپاتوکارسینوما، سرطان دهانه رحم، اندومتریال، ملانوما، تخمدان، نورواکتودرمال، تراتوکارسینوما و فیبروسارکوما و چندین سرطان دیگر نیز بکار رفته است (۲۶) همچنین والپروئیک‌اسید در تومور نورواکتودرمال اولیه سوپراتنتروئید و مدولابلاستوما که تومورهای مغزی بدخیم بسیار متداول در کودکان است، بررسی‌شده است، نتایج نشان داده‌اند که والپروئیک اسید در غلظت‌های بی‌خطر بالینی القاکننده شدید مهار رشد، توقف چرخه سلولی، آپوپتوز و پیری می‌گردد و فعالیت تشکیل کلونی و تومورزایی را به‌صورت وابسته به دوز و زمان سرکوب می‌کند. با هیبریداسیون وسترن و RT-PCR، نشان داده‌شده است که فعالیت ضد توموری والپروئیک‌اسید وابسته به القاء هایپراستیلاسیون هیستون (H_3 و H_4)، فعالیت P21 و توقف بیان TP53 و CDK4 و CMYC است (۲۷).

مرور منابع علمی نشان می‌دهد که اثر والپروئیک‌اسید روی سلول‌های K562 تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است و بر اساس نتایج، اثر والپروئیک‌اسید با مطالعات مشابه انجام‌شده در این زمینه همخوانی دارد. نتایج نشان می‌دهد که والپروئیک‌اسید در تمامی غلظت‌ها و زمان‌ها به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) موجب مهار رشد سلولی می‌گردد و اثر داروی مذکور وابسته به زمان و دوز است به‌طوری‌که در بیشترین غلظت و ۷۲ ساعت بیشترین اثر را می‌توان مشاهده کرد.

بر اساس بررسی‌ها و مطالعات انجام‌شده والپروئیک‌اسید می‌تواند در پیشگیری و کاهش سرطان مؤثر واقع شود. در این

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

تحقیق، نتایج نشان داد که والپروئیک‌اسید دارای خاصیت ضد توموری است 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 است.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمامی عزیزانی که در تمام مراحل این مطالعه ما را حمایت و یاری کردند کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Zand A, Imani S, Saadati M, Borna H, Ziyaii R, HonariH.effect of age, sex and blood group on indicate of leukemia. Kowsar medical journal. 2014;15(2): 111-114.
2. Kwan JM, Fialho AM, Kunda M, Thomas J, Hong CS, Gupta TK, et al. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. Leukemia Research. 2009; 33(3):1392-1399.
3. Tenbosch GJA, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJM, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD34+ Tcells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL break point peptide. Blood. 1996;88(41):3522-3527.
4. Apperleg JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Lancet Oncology. 2007;8(11):1018-1029.
5. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, et al. New ELISA technique for analysis of p53 protein/DNA binding properties. Journal of Immunological Methods. 2002; 267(7):227-235.
6. Bonyadi F. Comparison of effect of cytoplasmic extracts and cell wall of sacaromysesservisie as a probiotic on K562 cell line. a review Blood. 2011; 56:1-15.
7. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, et al. Priperties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. International Journal of Cancer. 1976;18(4):421-431.
8. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review Blood. 1980;56(2):344-350.
9. Han S, Kim Y, Kim T. Role of apoptotic and neurotic cell death under physiologic conditions. Biology and Molecular B iology Reports. 2008; 41(21):1-10.
10. Meng XW, Lee SH, Kaufianann SH. Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept. Cell Biology 2006;18(54):668 – 676.
11. Wong SR. Apoptosis in cancer: frompathogenesis to treatment. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 2011; 30(87):2-14.
12. Burton BS. On the propyl derivatives and decomposition products of ethyl acetoacetate. American Chemical Journal. 1882;3(9):385-395.
13. PeruccaE. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: A summery after 35 years of clinical experience. CNS Drugs. 2002;16(10):695-714.
14. Henry TR. The history of valproate in clinical neuroscience. Psychopharmacology bulletin. 2003; 37(Suppl 2):5-16.
15. Hicks CW, Pandya MM, Fernande Z. Valproate for the treatment of medication-induced impulse-control disorder in three patients with parkinsons disease. Parkinsonism & Related Disorders. 2011;17(5):379-381.
16. Loscher W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. CNS Drugs. 2002;16(10):669-694.
17. Kostrouchova M, Kostrouch Z, KostrouchovaM. Valproic acid molecular lead to multiple regulatory pathways. Folia Biological. 2007;53(2):37-49.
18. Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang DM. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and calproic acid: beyond bipolar disorder. Pharmacological Reviews. 2013; 65(1):105-142.
19.Vondracek J, Stika J, Soucek K, Minksova K, Blaha L, Hofmanova J, et al. Inhibitors of arachidonic acid metabolism potential tumor necrosis factor-a-induced apoptosis in HL-60 cells. European Journal of Pharmacology. 2001; 424(5):1-11.
20. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. European Molecular Biology Organization Journal. 2001; 20(12):6877-6888.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

21. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review. 2005;11(3):127-152.
22. MoosaviMA, Yazdanparast R, Sanati MH. The Cytotoxic and Anti-proliferative Effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat Cells Is Reduced by Guanosine. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2005; 38(4):391-398.
23. Maroufi B, Ardestani S, Kariminia A, Naderimanesh H. The Effect of Vitamin E on Splenocytes Apoptosis of Gamma-Irradiated BALB/C Mice. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. 2005; 4(2):77-82.
24. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. JLeukoc Biol. 1993; 54(4):283-288.
25. Vondracek J, Stika J, Soucek K, Minksova K, Blaha L, Hofmanova J, et al. Inhibitors of arachidonic acid metabolism potential tumor necrosis factor-a-induced apoptosis in HL-60 cells. European Journal of Pharmacology. 2001;424(8):1-11.
26. Duenas GA, Candelaria M, Perez PC, PezaCE, CruzHE, HerreraL. Valproic acid as epigenetic cancer drug: perclinical, clinical and transcriptional effect on solid tumors. Cancer treatment reviews. 2008;34(3): 206-222.
27. Li XN, Shu Q, Su JMF, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histonhyperacetylation and regulation expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. American Association for Cancer. 2005: 4(12). 1912-1922.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]

Original Article

Evaluation of Antitumor Activity of Valproic Acid on K562 cells

Aalaei Sh*, Mohammadzadeh M, Pazhang Y

Biology Department, Faculty of Science, University of Urmia, Urmia, Iran

Received: 19 Aug 2015 Accepted: 05 Jul 2016

Abstract

Backgrond & Objective: This study was performed to evaluate the antitumor effects of valproic acid (VPA) drug on K562 cells in vitro.

Material & Methods: For this purpose, K562 cells were cultured and treated with different doses of valproic acid, and its antitumor properties were measured by MTT assay 24, 48, and 72 hours after treatment. Then, DNA electrophoresis and staining with Hoechst were used to analyze apoptotic cells in vitro.

Results: The antitumor effects of valproic acid increased in a dose- and time- dependent manner. Also, the apoptotic effects of the drug were approved by electrophoresis. The maximum inhibitory effect was observed in higher concentration and after 72 hours treatment. IC50 was calculated 80Mμ by Compusyn software. The results showed that valproic acid was an efficient drug for inhibiting K562 cells, and its antitumoric effect would warrant further.

Conclusion: Accordingly, valproic acid is suitable for inhibiting K562 cells, and these antitumoric properties would warrant further studies on the clinical application of valproic acid. Therefore, this drug might be effective for the prevention and treatment of chronic myeloid leukemia.

Keywords: Valproic Acid, In Vitro, Antitumoric Properties, K562 Cell Line, Apoptosis

***Corresponding author: ShahinAalaei,** Biology Department, Faculty of Science, University of Urmia, Urmia, Iran.
Email: shahin_aalaei@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences (2016) 6: 365-372

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.2.8]