

بررسی اثر HESA-A بر تکثیر و آپوپتوز رده سلولی لوسمی میلوژن مزمن (K562)

مدیحه قاسمی^۱، دکتر فاطمه نادعلی^۲، دکتر سید ناصر استاد^۳
دکتر فرهاد ذاکر^۲، شهربانو رستمی^۴، دکتر حسین درگاهی^۵

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی میلوژن مزمن، بدخیمی خونی مرتبط با ژن الحاقی BCR-ABL1 و فعالیت مداوم ABL-1 است. ایما تینیب خط اول درمان این لوسمی است، اما جمعیتی از بیماران به آن مقاومت نشان می‌دهند. بر این اساس هدف از این پژوهش، مطالعه تاثیر داروی HESA-A بر تکثیر و آپوپتوز رده سلولی لوسمی میلوژن مزمن (K562) می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی از سلولهای K562 استفاده شد و زمان دو برابر شدن سلولها محاسبه گردید. داروی HESA-A در غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم در میلی لیتر بر سلولها اثر داده شد. پس از ۷۲ ساعت جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی و تعیین IC50، MTT Assay و Trypan Blue Exclusion Assay انجام شد. سپس سلولها ۴۸ ساعت با دوز IC50 دارو مجاور شدند و آپوپتوز به روش فلوسایتومتری انجام شد. بررسی داده‌ها با آزمون Unpaired t test به عمل آمد.

یافته‌ها: زمان دو برابر شدن رده سلولی K562 ۲۴ ساعت محاسبه شد. نتایج MTT و Trypan Blue Exclusion Assay، کاهش وابسته به دوز سلول‌های زنده K562 را نشان داد. IC50 دارو ۳/۵ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. ۱۹/۲۲ درصد از سلولهای تیمار شده در هیستوگرام فلوسایتومتری در مکان سلولهای نکروزی قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: HESA-A دارای اثر سایتوتوکسیسیتی بر سلولهای K562 در الگوی وابسته به دوز است، و به نظر می‌رسد به کمک القا مرگ نکروزی توانسته است تاثیر گذار باشد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی میلوژن مزمن، HESA-A، سایتوتوکسیسیتی، آپوپتوز

* نویسنده مسئول :

دکتر فاطمه نادعلی

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم

پزشکی تهران

Email :

Nadalifa@sina.tums.ac.ir

- دریافت مقاله : فروردین ۱۳۹۱ - پذیرش مقاله : مهر ۱۳۹۱

مقدمه

لوسمی میلوژن مزمن (Chronic Myelogenous Leukemia)، شایع‌ترین بیماری میلوپرولیفراتیو، بیماری کلونال ناشی از تغییر ژنتیکی در سلول بنیادی خونساز چند توانه است (۱).

ادغام ژن (Break Point Cluster Region) BCR

روی کروموزوم ۲۲ و ژن ABL1

(Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homology)

روی کروموزوم ۹، تیروزین کیناز الحاقی بسیار فعالی

^۱ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۲ دانشیار هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ استاد گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۴ دانشجوی دکترای هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۵ دانشیار گروه مدیریت خدمات بهداشتی و درمانی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات

مدیریت اطلاعات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

ایمن HESA-A در بهبود افزایش میزان بینایی در بیماران تخریب لکه دار چشم وابسته به سن (Age Related Macular Degeneration) و همچنین افزایش عملکرد کارنوفسکی بیماران پس از چند هفته و بقاء بیماران بدون هیچ گونه اثرات بد هماتولوژیکی و کبدی در بیماران با سرطان کولون متاستاز دهنده و سرطانهای وخیم با متاستاز کبدی در نتیجه تجویز HESA-A حاصل شده است. با توجه به این شواهد اثرات ضد سرطانی این دارو تأیید شده اما مکانیسم اثر آن مشخص نشده است (۱۴-۱۰).

در مطالعه حاضر اثر HESA-A بر تکثیر و آپوپتوز رده سلولهای بلاستیک لوسمی میلوژن مزمن با منشأ مغز استخوان (K562) مورد بررسی قرار گرفت زیرا تاکنون اثر این دارو بر سرطانهای خون مورد بررسی قرار نگرفته است.

روش بررسی

برای تهیه استوک دارو، بخشی از داروی HESA-A به صورت پودر کاملاً نرم به سرم فیزیولوژی افزوده شد و PH مخلوط با HCL روی ۱/۵ تنظیم شد. پس از یک ساعت تکان دادن شدید، PH مخلوط با NaOH به ۷/۴ رسانیده و نهایتاً مخلوط از صافی عبور داده شد. محلول صاف شده با فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل شد. استوک دارو با غلظت ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد.

سلولهای K562 تهیه شده از انستیتو پاستور ایران از تانک ازت مایع خارج شد و در محیط کشت RPMI1640 (PAA و اتریش) حاوی ۱۰٪ FBS (PAA و اتریش) و ۱٪ پنی سیلین-استریتومایسین (PAA و اتریش) کشت داده شد. به منظور تعیین زمان دو برابر شدن سلولها تعداد ۵۰۰۰۰ سلول در ۱ میلی لیتر محیط کشت در چاهکهای پلیت ۲۴ تایی طی ۶ روز در ۳۷ درجه با

را کد می کند که منجر به خاصیت تکثیری بیشتر این سلولها می شود و از شاخصه های مهم این لوسمی محسوب می شود. از نظر بالینی CML در سه فاز مجزا نمود پیدا می کند: فازهای مزمن، تسریع یافته و بلاستیک (۴-۱).

هدف از درمان CML، نگهداشتن بیماران در فاز مزمن و جلوگیری از پیشرفت بیماری به فازهای بعد و کم کردن سمیت ناشی از داروهای رایج است. امروزه ایماتینیب مزینبات به عنوان خط اول درمان محسوب می شود. اما درمان قطعی تر پیوند مغز استخوان است (۵).

حصاً-آ دارویی با منشأ گیاهی دریایی (ترکیبی از شاه میگو و گیاهان زیره و کرفس) است. آنالیز HESA-A نشان داده است این ماده از ۵۰٪ ترکیبات معدنی، ۴۵٪ ترکیبات آلی از نوع آمیدواتراکینون و ۵٪ آب تشکیل شده است. مواد معدنی مخلوطی از کربنات کلسیم، سولفاتهای منیزیم، پتاسیم و سدیم و فسفاتهای منیزیم، پتاسیم و سدیم است همچنین فلزاتی نظیر Al, Co, K, Cr, Fe, Zn و نیز Sr و Br با غلظت بالایی در این ترکیب موجود است. درصد کمی از عناصر دیگر مثل Ti-Mn-As-Ni-Ag-Cu-W-Tm-Lu-Er-Va-Cs-Ba در این ترکیب وجود دارد که به صورت نمک یا کمپلکس است (۸-۶).

در یک مطالعه HESA-A بر سلولهای سرطانی MDA-MB-468، HEP II و HELA اثر داده شده است و نتایج، اثرات انتخابی وابسته به غلظت و قابل مقایسه با کنترل مثبت بر علیه رشد این سلولها از خود نشان داده است بدون آنکه اثر قابل توجهی بر سلولهای طبیعی داشته باشد (۹). تاکنون قابلیت بهبود بینایی و تحمل درد در بیماران سرطان پستان با متاستاز کروئیدال، افزایش درجه کارنوفسکی و بهبودی در کیفیت زندگی بیماران با سرطان متاستاتیک کبد و کارسینومای هپاتوسلولار، تاثیر قابل توجه و

CO₂ ۵٪ مورد شمارش قرار گرفتند.

جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی و تعیین IC₅₀

داروی HESA-A با استفاده از روش احیا MTT

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole سلول‌های K562 به تعداد ۱۰^۵ سلول در ۱ میلی لیتر از رقت‌های (۱ و ۲ و ۴ و ۸ و ۱۶ و ۳۲ mg/ml تهیه شده در محیط کشت) در چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی به صورت سه گانه کاشته شد. سرم فیزیولوژی با PH خنثی حاوی اسید و باز، هم حجم بالاترین رقت در محیط کشت در چاهک‌های کنترل ریخته شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه با CO₂ ۵٪، ۱۰۰ میکرولیتر از MTT با رقت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر (sigma، آلمان) به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت در ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد،

سپس محلول رویی پس از سانترفیوژ جدا شد و MTT احیا شده در هر چاهک در ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Merck، آلمان) ۰/۰۴ نرمال اسیدی حل شد. جذب به کمک (Elisa Reader Anthos 2020، اتریش) در ۵۷۰ nm خوانده شد.

به منظور بررسی حیات سلول‌ها نیز سلول‌های K562 به تعداد ۱۰^۵ سلول در ۱ میلی لیتر از رقت‌های (۱ و ۲ و ۴ و ۸ و ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شده در محیط کشت) در چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی به صورت سه گانه کاشته شد و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با رقت‌های دارویی، با تریپان بلو رنگ آمیزی شدند و سلول‌های زنده با استفاده از میکروسکوپ نوری روی لام نئوبار شمارش شدند.

تعداد سلول‌های زنده در نمونه کنترل × ۱۰۰

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده در رقت‌های دارو}}{\text{تعداد سلول‌های زنده در نمونه کنترل} \times 100}$$

تعداد سلول‌های زنده در رقت‌های دارو

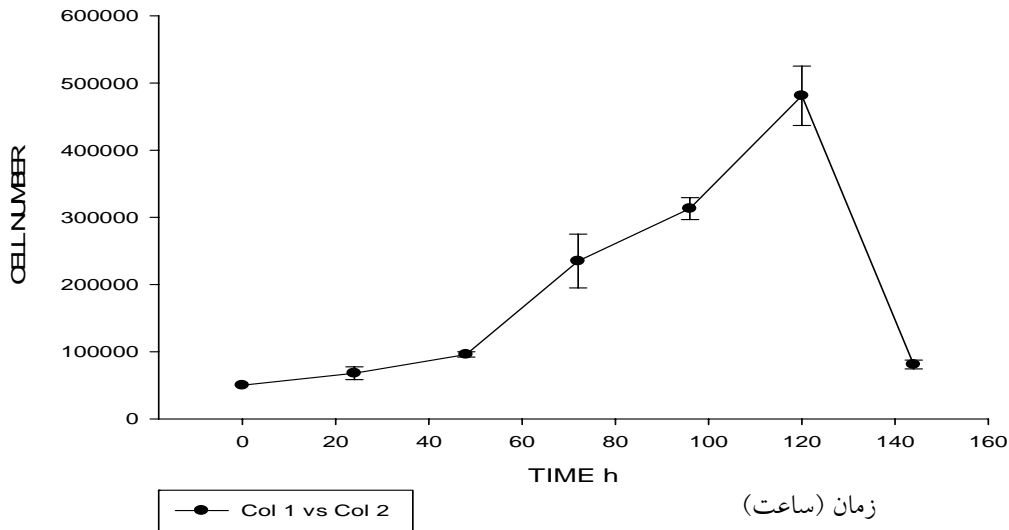
با (USA) Facs Calibur Flowcytometr آنالیز شد. FITC در کانال FL1 و PI در کانال FL2 خوانده شد. PI (Propidium Iodide) : طول موج برانگیزش ۴۸۸ نانومتر و طول موج بازتابش ۶۱۷ نانومتر FITC (Fluorescein) : طول موج برانگیزش ۴۸۸ نانومتر و طول موج بازتابش ۵۱۹ نانومتر در این مطالعه از آزمون Unpaired T.test استفاده شد و تفاوت بین هر دو متوسط شمارش سلولی (p.value < ۰/۰۰۱) معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از شمارش ۵۰۰۰۰ سلول در ۱ میلی لیتر محیط کشت طی ۶ روز، زمان دو برابر شدن سلول‌های K562 در آزمایشگاه ۲۴ ساعت محاسبه شد (نمودار ۱).

برای بررسی آپوپتوز از طریق بروز فسفاتیدیل سرین، ۱۲۵۰۰۰ سلول K562 در ۱ میلی لیتر از رقت IC₅₀ دارو (۳/۵ میلی گرم در میلی لیتر) در چاهک‌های پلیت ۶ تایی کاشته شد. هم حجم دارو، سرم فیزیولوژی با PH خنثی در چاهک‌های کنترل ریخته شد. سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به کمک سانتریفیوژ با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شدند و با PBS سرد شسته شدند. سپس طبق روش کار در ترکیبی از ۱۰۰ میکرولیتر Annexin Binding Buffer، ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC (sigma، آلمان)، ۱۰ میکرولیتر PI (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) (sigma، آلمان) در دمای اتاق در تاریکی برای ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. به سلول‌های رنگ شده ۱ میلی لیتر PBS افزوده شد و

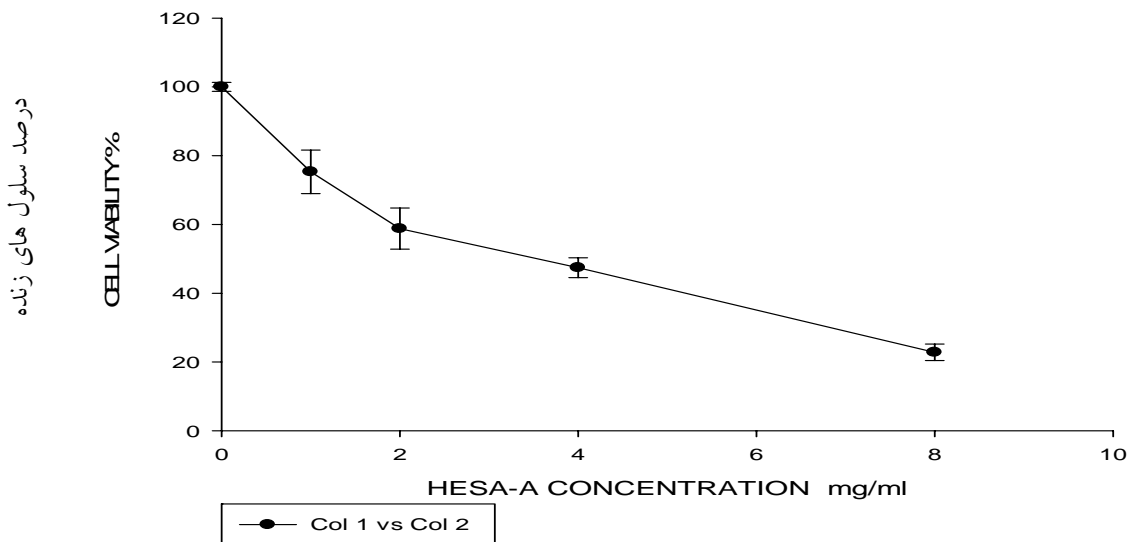
شمارش سلولی



نمودار ۱: منحنی زمان دو برابر شدن سلول K562 (براساس این منحنی این زمان ۷۴ ساعت است).

رشد سلول‌ها در الگوی وابسته به دوز را القا می‌کند (نمودار ۲).

نتایج MTT در بررسی اثر سایتوتوکسیسیته و تعیین IC50 دارو نشان می‌دهد که تیمار با HESA-A، مهار

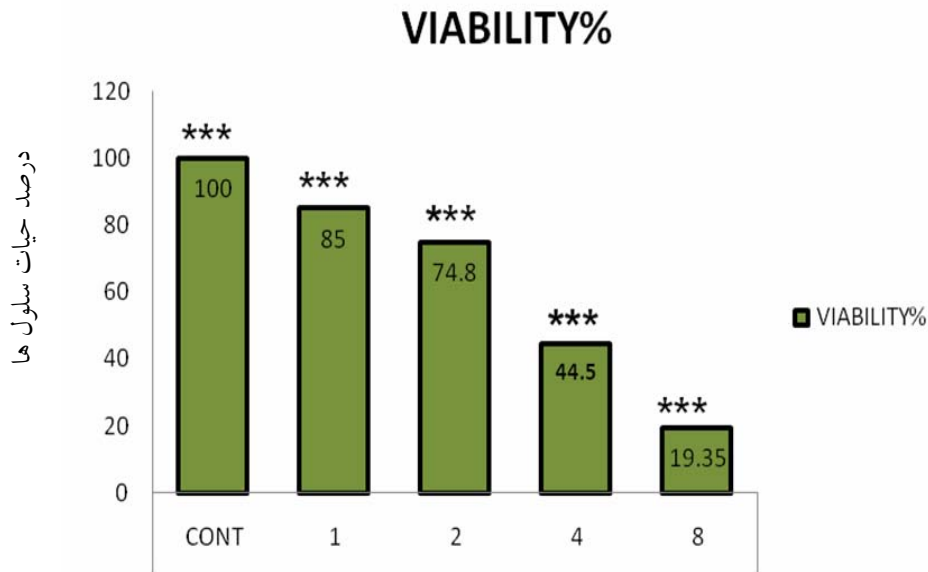


غلظت HESA-A (۱، ۲، ۴، ۸ میلی گرم در میلی لیتر)

نمودار ۲: مهار (رشد سلولها) در الگوی وابسته به دوز با روش MTT (هر نقطه نماینده متوسط سه بار تکرار \pm SD)

نتایج Trypan Blue Exclusion Assay نیز با نتایج MTT مطابقت دارد به طوری که با افزایش غلظت دارو تعداد سلول‌های زنده کاهش یافته است (نمودار ۳).

کریستال‌های زرد رنگ MTT به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری، احیا شده و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول فورمازان می‌دهد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد (۱۵).



غلظت HESA-A (میلی گرم در میلی لیتر)

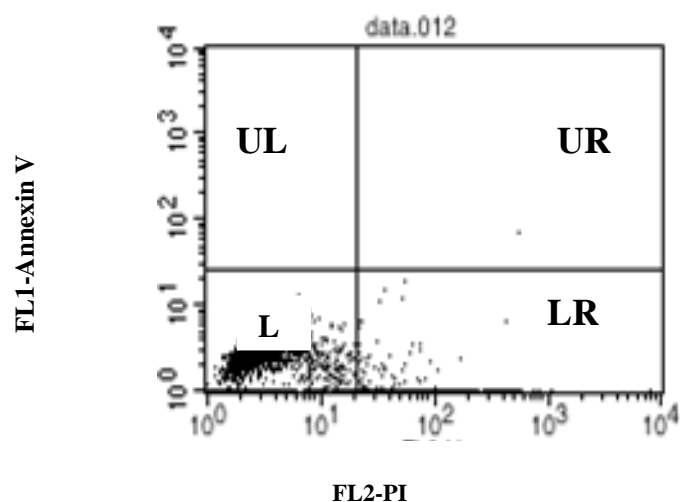
تاثیر سایتوتوکسیسیته دارو در الگوی وابسته به دوز در تمام غلظت‌ها ($p.value < 0.001$) معنی دار است.

نمودار ۳ : درصد سلول‌های زنده با روش تریپان بلو پس از تیمار دارویی (سلول‌های زنده

در الگوی وابسته به دوز کاهش معناداری نشان می‌دهد ($p.value < 0.001$)

هیچ یک از دو رنگ PI و Annexin V-FITC قرار گرفته‌اند. جمعیت سلول‌های نکروزه پس از تیمار دارویی افزایش قابل توجهی یافته است (شکل ۲). در صورت وقوع آپوپتوز در مراحل اولیه، سلول‌ها فسفاتیدیل سرین را بر سطح خود بروز می‌دهند که پروتئین انکسین به آن متصل می‌شود و در هیستوگرام فلوسایتومتری سلول‌ها در ربع بالا/چپ قرار می‌گیرند (۱۶).

مطابق با تاثیرات ضد تکثیری، تاثیر القا نکروز توسط حصاراً در دوز IC50 بعد از ۴۸ ساعت تیمار در سلول‌های K562 قابل مشاهده بود. نتایج فلوسایتومتری قرار گیری سلول‌های تیمار شده را در ربع پائین / راست - جایگاه سلول‌های نکروز شده را نشان می‌دهد، زیرا سلول‌ها فقط رنگ PI را جذب کرده‌اند (شکل ۱). سلول‌های نمونه کنترل در ربع پائین / چپ محل قرار گیری سلول‌های زنده بدون جذب

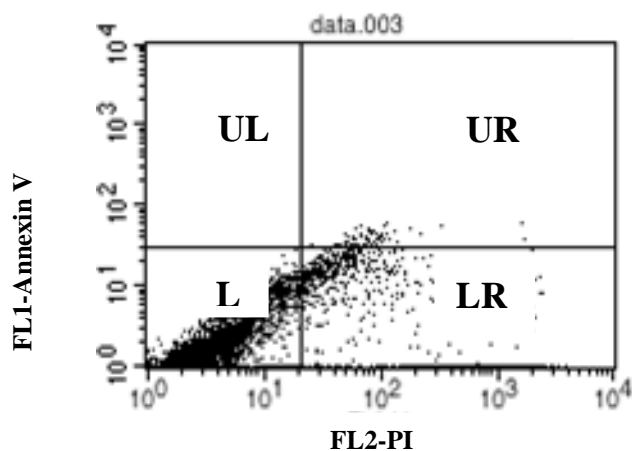


شکل ۱: الگوی فلوسایتومتری نکرورز در نمونه کنترل با تجمع اکثر سلول های زنده در ناحیه LL.

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می شود، جمعیت اندکی از سلول ها که در ناحیه LR قرار گرفته اند تحت تاثیر مراحل جمع آوری و آماده سازی، دچار نکرورز شده اند که در جدول ۱ درصد آنها نشان داده شده است.

جدول ۱: درصد جمعیت سلول ها در بررسی فلوسایتومتری آپوپتوز در نمونه کنترل

یک چهارم	درصد
Upper-Left (بالا-چپ)	۰
Upper-Right (بالا-راست)	۰/۰۲
Lower-Left (پائین-چپ)	۹۱/۲۸
Lower-Right (پائین-راست)	۸/۷۰



شکل ۲: الگوی فلوسایتومتری نکرورز در نمونه K562 بعد از ۴۸ ساعت مجاورت با دوز IC50 داروی مصا آ

با توجه به شکل ۲، سلول‌ها دچار نکروز شده و در ناحیه LR قرار گرفته‌اند که درصد آن در جدول ۲ آمده است. هیچ سلولی در ناحیه UL (جایگاه سلول‌های آپوپتوز شده) وجود ندارد.

جدول ۲: درصد جمعیت سلول‌ها در بررسی فلوسایتومتری آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت مجاورت با دوز IC50 دارو

درصد	یک چهارم
۰	Upper-Left (بالا-چپ)
۱/۵۲	Upper-Right (بالا-راست)
۷۹/۲۶	Lower-Left (پائین-چپ)
۱۹/۲۲	Lower-Right (پائین-راست)

نتیجه استرس اکسیداتیو منجر به فعال شدن PARP-1 می‌شود. Caspase 3 نیز مسئول تخریب PARP-1 است. با مهار Caspase-3، PARP-1 فعال شده و منجر به مصرف NAD⁺ و تخلیه ATP و تبدیل آپوپتوز به نکروز می‌شود (۱۸ و ۱۹). Ca²⁺، فسفات‌های غیرآلی و PH قلبیایی و ROS عواملی هستند که Mitochondrial permeability transition یا MPT را به پیش می‌برند.

MRT مکانیسم اصلی مسئول مرگ آپوپتوزی و نکروزی است. در نتیجه‌ی MPT و باز شدن سریع منافذ permeability transition یا PT میتوکندری سریعاً دپلاریزه شده و تخلیه ATP مرگ نکروتیک را باعث می‌شود چرا که فرایند آپوپتوز وابسته به ATP است (۲۰). از آن جا که بخشی از ساختار HESA-A از فسفات‌های غیر آلی مثل فسفات‌های منیزیم، پتاسیم و سدیم تشکیل شده است و سزیم از عناصر موجود در حصاً قادر است وارد سلول‌های سرطانی شود و با قلبیایی نمودن فضای داخل سلولی تاثیر گذار باشد بنابراین فراهم شدن شرایط لازم برای MPT و القا نکروز توسط این دارو مطرح می‌شود (۲۱). کرومیوم و وانادیوم، نیکل و برومیوم از عناصر موجود در

با توجه به جدول ۲، جمعیت سلول‌های نکروتیک (LR) نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و از جمعیت سلول‌های زنده کاسته شده است (LL).

بحث

با توجه به تاثیر سائیتوتوکسیسیته داروی HESA-A نتایج فلوسایتومتری، القاء مرگ سلولی نکروزی توسط این دارو در رده سلولی K562 در محیط آزمایشگاه مطرح می‌شود. شواهدی وجود دارد که نتایج داده‌ها را تایید می‌کند. در مطالعه‌ای که Iguchi و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام دادند، مشخص شد که سلول‌های کارسینوما‌ی پروستات که در مواجهه با روی (Zn) قرار گرفته‌اند، دچار نکروز شده‌اند و افزودن ماده روی به کشت‌های سلولی از القا آپوپتوز جلوگیری می‌کند. بنابراین، به نظر می‌رسد که افزایش روی داخل سلولی، آپوپتوز القا شده با محرک‌های مختلف را مهار می‌کند. تاثیر روی بر نکروز خیلی شناخته شده نیست. با توجه به نوع سلول، روی می‌تواند آپوپتوز یا نکروز را القا کند (۱۷). روی باعث تولید Reactive Oxygen Species یا ROS و مهار Caspase 3 می‌شود. آسیب شدید به DNA در

از طریق آسیب به DNA و تغییر پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدی مرگ سلولی را القا کنند. این دو عنصر در ساختار داروی HESA-A موجود است و شاید بتواند چنین عملکردهایی بر رده سلولی K562 داشته باشد (۲۶).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات ذکر شده و نتایج مطالعه‌ی حاضر به نظر می‌رسد این دارو توانسته است با توجه به مواد تشکیل دهنده در محیط آزمایشگاه، مرگ سلولی نکروتیک را در سلول‌های K562 در الگوی وابسته به دوز القا نماید. البته بررسی‌های کامل تر در این زمینه لازم به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران اعلام می‌داریم. همچنین از مسئولین محترم شرکت دانش بنیان سیمرخ حکمت که بخشی از هزینه‌های این پایان نامه را پرداخت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

HESA-A قادر هستند ROS را تولید کنند و از طرفی تاثیر آنتی اکسیدانی داروی حضا در دوز (۰/۹-۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر) رخ می‌دهد. بنابراین، می‌توان گفت که دارو خارج از دوز آنتی اکسیدانی (IC50=۳/۵ میلی گرم در میلی لیتر) در آزمایشگاه بر سلول‌های K562 موثر بوده است و تاثیرات اکسیدانی در این دوز داشته است (۲۲ و ۹).

شکل سیتوپلاسمی Cabl واسطه از دست رفتن پتانسیل غشایی میتوکندری با واسطه ROS، تخلیه ATP و القا مرگ نکروتیک می‌شود (۲۳). از آنجا که در سلول‌های K562، cABL به علت ادغام در ژن BCR فعالیت افزایش یافته‌ای دارد و قادر نیست به هسته مهاجرت کند (۲۴)، شاید بتوان علت بروز نکروز در نتیجه دارو را در سلول‌های K562، مربوط به نقش این پروتئین دانست. تولید ROS منجر به استرس اکسیداتیو، آسیب به DNA و مولکول‌های داخل سلولی و نهایتاً نکروز می‌شود. ROS همچنین باعث اکسیداسیون لیپید و از دست رفتن یکپارچگی غشاء پلاسمایی و همه غشاهای داخل سلولی مثل لیزوزوم‌ها و شبکه اندوپلاسمی می‌شود و نهایتاً منجر به تراوش پروتئین‌های داخل سلولی یا ورود کلسیم و نکروز می‌شود (۲۵). کرومیوم و وانادیوم قادر هستند

منابع

1. MC Pherson RA, Pincus MR, Davey FR, Bernard Henry J, Herman CJ, Woods GL, et al. Clinical Diagnosis And Management By Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2011: 616-7.
2. Melo JV & Goldman J. Myeloproliferative Disorder. 1th ed. Berlin: Springer; 2007: 1-13.
3. Geary CG. The Story Of Chronic Myeloid Leukemia. British Journal Of Haematology 2000; 110(1): 2-11.
4. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tudenham EGD & Green AR. Post Graduate Hematology. 6th ed. UK: Wiley Blackwell Publishing; 2011: 483-501.
5. Goldman JM. Treatment Strategies For CML. Best Practice & Research Clinical Haematology 2009; 22(3): 303-13.

6. Danesh Bonyan Simorgh Hekmat Institute. Novel oncology increased life quality of cancer patients. Available at: [Http://www.Persian-Medicine.Com/Modules/Article-Print.aspx?P1=20](http://www.Persian-Medicine.Com/Modules/Article-Print.aspx?P1=20). 2010.
7. Moallem SA, Ahmadi A, Moshafi MH & Taghavi MM. Evaluation Of Fetal Toxicity Of HESA-A, A Natural Anti Cancer Agent, In Mice. *Journal Of Kerman University Of Medical Sciences* 2007; 14(2): 124-33[Article in Persian].
8. Schumacher M, Kelkel M, Diederich M & Dicato M. Survey Of Marine Natural Compounds And Their Derivatives With Anti-Cancer Activity Reported in 2010. *Molecules* 2011; 16(7): 5629-46.
9. Sadeghi Aliabadi H & Ahmadi A. Cytotoxicity And Antitumor Properties Of A Marine Compound, HESA-A, On Cancer Cells. *Daru* 2003; 11(3): 11-3.
10. Ahmadi A, Mohagheghi M, Fazeli MS, Nahavandian B, Bashardoost N, Mousavi Jarahi A, et al. HESA-A: New Treatment For Breast Cancer And Chroidal Metastasis. *Med Sci Monit* 2005; 11(6): 300-3.
11. Ahmadi A. A Study Of Thirty Patients With Metastatic Liver Cancer And Hepatocellular Carcinoma Treated With Hesa-A. Available at: <http://www.aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/abstract/2006/3/A26>. 2006.
12. Ahmadi A, Ghanbari H, Soheilian M & Naseri M. The Effect Of HESA-A(Natural Drug)On Visual Acuity In Age Related Macular Degeneration: A Randomized Double Blind Controlled Clinical Trial. *Afr J Trad Cam* 2009; 6(4): 549-53.
13. Ahmadi A, Mohagheghi M, Karimi M, Golestanha SA & Naseri M. Anticancer Effects of HESA-A In Patients With Metastatic Colon Cancer. *Integrative Cancer Therapies* 2009; 8(1): 71-4.
14. Ahmadi A, Mohagheghi M, Karimi M, Golestanha SA, Naseri M, Faghihzadeh S, et al. Therapeutic Effects Of HESA-A In Patients With End Stage Metastatic Cancers. *Integrative Cancer Therapy* 2010; 9(1): 32-5.
15. Khorrami Zadeh M & Falak R. *Basic Technics Of Cell Cucture*. 1th ed. Tehran: Tehran Univertsity of Medical Sciences Pub; 2009: 21-45/65-9/89-92[Book in Persian].
16. Langdon SP. *Cancer Cell Culture: Methods And Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2004: 191-201.
17. Iguchi K, Hamatake M, Ishida R, Usami Y, Adachi T, Yamamoto H, et al. Induction Of Necrosis By Zinc In Prostate Carcinoma Cells And Identification Of Proteins Increased In Association With This Induction. *Eur J Biochem* 1998; 253(3): 766-70.
18. Eom SJ, Kim EY, Lee JE, Kang HJ, Shim J, Upkim S, et al. Zn²⁺Induces Stimulation Of The C-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway Through Phosphoinositide 3-Kinase. *Molecular Pharmacology* 2001; 59(5): 981-6.
19. Chaitanya GV, Alexander JS & Bubu PP. Parp-1 Cleavage Fragments: Signatures Of Cell-Death Proteases In Neurodegeneration. *Cell Communication And Signaling* 2010; 8(31): 1-11.
20. Kim JS, Lamesters JJ & He L. Mitochondrial Permeability Transition: A Common Pathway To Necrosis And Apoptosis. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 2003; 304(3): 463-70.
21. Burk RF. Selenium, An Anti Oxidant Nutrient. *Nutrition in Clinical Care* 2002; 5(2): 75-9.
22. Ding M, Shi X, Castranova V & Vallyathan V. Predisposing Factors In Occupational Lung Cancer: Inorganic Minerals And Chromium. *Journal Environmental Pathology Toxicology Oncology* 2000; 19(1-2): 129-38.

23. Kumar S, Bharti A, Mishra NC, Raina D, Kharbanda S, Saxena S, et al. Targeting Of The C-Abl Tyrosine Kinase To Mitochondria In The Necrotic Cell Death Response To Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(20): 17281-5.
24. Hazlehursts LA, Bewry N, Rajesh R & Pinilla Ibarz J. Signaling Networks Associated With BCR-ABL Dependent Transformation. *Cancer Control* 2009; 16(2): 100-7.
25. Xing Zong W & Thampson CB. Necrotic Death As A Cell Fate. *Genes & Development* 2006; 20(1): 1-15.
26. Chen F, Vallyathan V, Castranova V & Shi X. Cell Apoptosis Induced By Carcinogenic Metals. *Molecular And Cellular Biochemistry* 2001; 222(1-2): 183-8.

Assesment Of The Efficacy Of HESA-A On The Proliferation And Apoptosis Of Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line(K562)

Ghasemi Madihe¹(MSc.) – Nadali Fatemeh²(Ph.D) – Ostad Seyed Naser³(Ph.D)
Zaker Farhad²(Ph.D) – Rostamy Shahrbanoo⁴(MSc.) –Dargahi Hossein⁵(Ph.D)

1 Master of Sciences in Hematology & Blood Banking, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Associate Professor, Hematology & Blood Banking Department, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Professor, Toxicology Department, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 Ph.D Student in Hematology & Blood Banking, School of Medicine, Tarbiyate Modares University, Tehran, Iran
5 Associate Professor, Health Care Management Department, School of Allied Medicine, Health Information Management Reasearch Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Apr 2012
Accepted : Oct 2012

Background and Aim: Chronic myelogenous leukemia is characterized by Philadelphia (Ph) chromosome, the presence of BCR-ABL fusion gene and constitutive activation of the ABL1 tyrosine kinase. Despite an excellent result of target therapy by imatinib, some patients develop resistance to imatinib. In this study Efficacy of HESA-A on proliferation and apoptosis of K562 cell line was assessed.

Materials and Methods: In this study doubling time of K562 cell line was calculated. The cells were affected by various concentrations of HESA-A(1,2,4 and 8 mg/ml respectively). Cytotoxicity and IC50 dose of HESA-A were detected by MTT and trypan blue exclusion assay. Apoptosis was assessed by flowcytometry after 48 h cell treatment in the presence of IC50 dose.

Results: Doubling time of K562 cells was 24 hours. HESA-A reduced the number of viable K562 cells in a concentration dependent manner. IC50 dose was 3.5 mg/ml. In flowcytometry analysis of apoptosis, 19.22% of the treated cells were located in the position of the necrotic cells.

Conclusion: The results of MTT and trypan blue exclusion assay suggest that HESA-A inhibits the growth of k562 cells in a concentration dependent manner and induces necrosis in K562 cells.

Key words: Chronic Myelogenous Leukemia, HESA-A, Cytotoxicity, Apoptosis

* Corresponding Author:
Nadali Fa ;
E -mail:
Nadalifa@sina.tums.ac.ir