● **مقاله تحقیقی**

اثرات ضد توموری ترکیب جدید تری‌آزنی: یک مطالعه آزمایشگاهی

صابر امیرپور اصل[۱]، *محمد نبیونی[۲]، زینب یزدانیان[۱]، محمدکاظم رفوئی[۳]، مهدی مهدوی[۴]، امیر خوشوقتی[۵]، لطیفه کریم زاده[۱]

چکیده

مقدمه: تری‌آزن‌ها ترکیباتی هستند که کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف ازجمله تولید داروهای ضد سرطانی دارند. هدف این پژوهش بررسی اثرات ضدسرطانی ترکیب جدیدی به نام ۱-(۳و۵-دی کلروفنیل)-۳-(۲-اتوکسی فنیل) تری‌آزن بر روی تومورهای پستانی القا شده توسط رده سلولی **4T1** در موش بالغ نژاد **Balb/C** بود.

روش بررسی: رده سلولی سرطانی **4T1** کشت داده شده و با غلظت‌های مختلف ترکیب تری‌آزنی جدید در مدت زمان ۲۴ ساعت تحت تیمار قرارگرفتند. درصد بقاء سلول‌ها توسط آزمون ام.تی.تی بررسی شد. برای القای تومور، موش‌های ۷ الی ۸ هفته‌ای انتخاب شده و سلول‌های **4T1** به‌صورت زیرجلدی با غلظت مناسب تزریق شدند. پس از مشاهده تومور، موش‌ها به‌صورت تصادفی گروه‌بندی شده و با ترکیب تری‌آزنی تحت تیمار قرار گرفتند. اندازه تومورها در گروه‌های مختلف، قبل و بعد از تیمار با یکدیگر مقایسه شد. بیان ژن **Bax** توسط روش **RT-PCR** مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون ام.تی.تی نشان داد که ترکیب تری‌آزنی در یک الگوی وابسته به غلظت موجب القای مرگ سلولی و کاهش زیست‌پذیری در رده سلولی **4T1** گردید. میزان غلظت مهار تکثیر برای رده سلولی **4T1**، در مدت ۲۴ ساعت، ۳۰ میکرومول بود. بررسی اندازه تومورها کاهش معنی‌داری را در گروه‌های تیمار شده با ترکیب تری‌آزنی در مقایسه با گروه‌های کنترل نشان داد. نتایج **RT-PCR** افزایش بیان ژن **Bax** را در گروه‌های تیمار شده با ترکیب تری‌آزنی در مقایسه با گروه‌های کنترل نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: ترکیب تری‌آزنی جدید قادر به کاهش درصد بقاء سلول‌های **4T1** در محیط **in vitro** و کاهش اندازه تومورهای پستانی القا شده است و همچنین قادر به افزایش بیان ژن **Bax** در بافت توموری است.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، ترکیبات تری‌آزن، رده سلولی توموری، پروتئین Bax

فصلنامه علمی پژوهشی ابن سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال هفدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۴، مسلسل ۵۱)

تاریخ دریافت:۹۴/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۴

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، تهران، ایران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی

۲. دانشیار، تهران، ایران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی (*مؤلف مسئول)

Saber.amirpour@gmail.com

۳. استاد، تهران، ایران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده شیمی

۴. دانشیار، تهران، ایران، انستیتو پاستور ایران

۵. استادیار، تهران، ایران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده طب هوافضا و زیرسطحی

مقدمه

سرطان پستان، تومور بدخیمی است که از سلول‌های پستان منشأ می‌گیرد. این بیماری تقریباً مختص زنان است اما مردان نیز ممکن است به آن مبتلا شوند [۱]. بیشترین میزان این بیماری در کشورهای توسعه یافته اروپایی و شمال آمریکا بوده و بیشترین میزان مرگ و میر این دسته از سرطان‌ها بین سنین ۴۰ تا۵۰ سال مشاهده می‌شود [۲]. همچنین سرطان پستان به عنوان دومین سرطان شایع در بین زنان ایرانی مطرح بوده و میزان شیوع آن در کشور ما ۱۲۰/۱۰۰.۰۰۰ می‌باشد که در مقایسه با برخی از کشورهای غربی، آمار بالاتری را به خود اختصاص می‌دهد [۳].

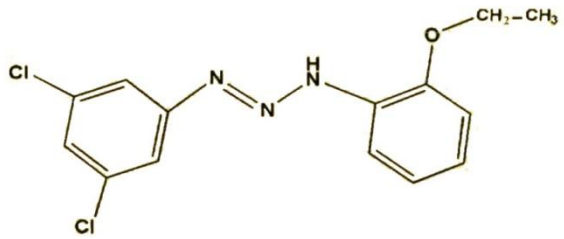
درمان سرطان پستان به دو دسته کلی درمان‌های موضعی و درمان‌های سیستمیک تقسیم‌بندی می‌شود. شیمی درمانی که از جمله درمان‌های سیستمیک به‌شمار می‌رود، به دو صورت مونوتراپی و ترکیبی انجام می‌گیرد که فرم ترکیبی اثرات مفیدتری را در موارد متاستاتیک دارد. مشاهده شده است که شیمی درمانی عود بیماری را به تأخیر انداخته و گاهی افزایش بقا را سبب می‌شود. مکانیسم عملی که برای روش‌های شیمی درمانی در نظر گرفته‌اند کشتن سلول‌های در حال تقسیم و یا مهار تقسیم سلولی است [۴].

آپوپتوز یکی از اشکال مرگ سلولی می‌باشد که دارای عملکردهای تکوینی و هومئوستاتیک مختلفی می‌باشد. نقایصی در مسیر وقوع این نوع مرگ منجر به بروز مشکلات متعددی از جمله نامیرایی سلول و تومورزایی می‌گردد [۵]. دو مسیر اصلی آپوپتوز در پستانداران شناسایی شده است: مسیر خارجی یا مسیر به واسطه رسپتور مرگ که برای حفظ هومئوستازی بافتی خصوصاً در سیستم ایمنی لازم است. مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی که از طریق تحریکات مختلفی مانند آسیب به DNA، فعال شدن انکوژن‌ها، آسیب به سایتواسکلتون، استرس شبکه اندوپلاسمی، مهار سنتز ماکرومولکول‌ها، تابش‌های UV، عوامل شیمیایی و رادیکال‌های آزاد به راه می‌افتد [۶].

اعضای خانواده Bcl-2[1] که از مهمترین عوامل تأثیرگذار در پروسه آپوپتوز هستند، براساس عملکردشان در تنظیم آپوپتوز به دو گروه پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی تقسیم می‌شوند. این پروتئین‌ها از نظر داشتن نواحی حفاظت شده‌ای که دمین‌های هومولوژی Bcl-2[2] نامیده می‌شوند به یکدیگر شباهت دارند. اعضای این خانواده در سیتوزول، شبکه اندوپلاسمی و پوشش هسته‌ای یافت می‌شوند. پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی خانواده Bcl-2 (مانند Bax[3]) از طریق برهمکنش مستقیم با Bid[4] به‌عنوان یک پروتئین پیش‌آپوپتوزی فعال می‌شوند و از طرف دیگر اتصال سایر پروتئین‌های پیش آپوپتوزی به اعضای ضدآپوپتوزی خانواده Bcl-2 منجر به فعال شدن Bax می‌گردد. در حالت عادی Bax در سیتوزول واقع شده است، اما در پاسخ به تحریک مرگ متحمل تغییر کنفورماسیونی گشته و در غشاء خارجی میتوکندری قرار می‌گیرد که منجر به نفوذپذیر شدن غشای خارجی میتوکندری و آزاد شدن پروتئین‌های پروآپوپتوتیک می‌گردد [۷].

تری‌آزن‌ها[5] دسته‌ای از ترکیبات آلی هستند که دارای گروه عاملی «دی آزو آمینو» (N=N-N) می‌باشند. ترکیبات تری‌آزن کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، پزشکی و داروسازی، کشاورزی، شیمی تجزیه و شیمی رنگ و پلیمر دارند [۸]. ترکیبات تری‌آزن به‌عنوان داروهای ضدسرطان کاربردهای زیادی دارند. در بسیاری از شیمی درمانی‌ها و درمان تومورها از عوامل آلکیل‌دار کننده استفاده می‌شود. گونه‌هایی از تری‌آزن‌ها مانند ۱- آریل-۳و۳- دی آلکیل و ۳- آسیل-۱و۳- دی آلکیل به‌عنوان عوامل آلکیل‌دار کننده عمل می‌کنند و اثر ضدسرطانی دارند [۹، ۱۰]. به‌عنوان مثال داکاربازین که سال‌های زیادی است به‌عنوان داروی ضد سرطان مصرف می‌شود، مولکول DNA را متیل‌دار

1. B-cell lymphoma 2
2. Bcl-2 homology (BH) domains
3. Bcl-2-associated X protein
4. BH3 interacting-domain death agonist
5. Triazene



شکل ۱- ساختار ۱-(۳و۵-دی کلروفنیل)-۳-(۲-اتوکسی فنیل) تری‌آزن

کرده و عمدتاً روی اتم‌های نیتروژن و اکسیژن مولکول گوانین متصل می‌شود [۱۱].

محققان به‌دنبال ترکیباتی هستند که علاوه بر کارایی بیشتر، عوارض جانبی کمتری داشته باشند. ما نیز در این پژوهش اثرات ضد توموری و ضد تکثیری ترکیب جدید به نام ۱-(۳و۵-دی کلروفنیل)-۳-(۲-اتوکسی فنیل) تری‌آزن را مورد بررسی قرار دادیم. این ترکیب در مراکز پژوهشی داخل کشور و در دانشکده شیمی دانشگاه خوارزمی تهران سنتز شده است (شکل ۱).

روش بررسی

رده سلولی 4T1 (NCBI code:C604) از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی FBS[1] ۱۰٪، آنتی‌بیوتیک (در هر میلی‌لیتر ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین) و درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. سلول‌ها با غلظت 4×10^3 cell/cm^2 در فلاسک‌های ۲۵ cm^2 کشت شدند. محیط آنها هر روز تعویض گردید و هنگامی که سلول‌ها ۸۰٪ سطح فلاسک را پر نمودند پاساژ سلولی یا فریز سلولی انجام شد. به منظور شمارش سلولی از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو ۰/۴٪ و لام هموسایتومتر (نئوبار) استفاده شد. سلول‌های زنده به دلیل حفظ تمامیت غشایی از ورود رنگ به داخل سیتوپلاسم ممانعت می‌کنند. در صورتی که سلول‌های مرده به رنگ آبی و با اندازه درشت‌تر مشاهده می‌شوند.

برای بررسی اثر ترکیب تری‌آزنی، سلول‌ها با غلظت 5×10^4 سلول به هر خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای اضافه شدند. ترکیب تری‌آزنی در اتانول ۹۶٪ حل شده و پس از آن محلول به‌دست آمده از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد. سپس سلول‌ها با ترکیب تری‌آزنی مورد نظر با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول به مدت ۲۴ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی میزان بقا و تکثیر سلولی، از روش رنگ سنجی ام.تی.تی[2] استفاده شد. سلول‌های زنده محلول زرد رنگ ام.تی.تی را به بلورهای فورمازان آبی رنگ تبدیل کرده و این تغییر رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

درصد بقاء سلول‌های زنده با این فرمول محاسبه گردید:

$$\text{درصد بقای هر نمونه‌ی تیمار} = \frac{\text{جذب نمونه‌ی تیمار}}{\text{جذب نمونه‌ی کنترل}} \times 100$$

به منظور القای تومور، موش‌های ماده ۷ الی ۸ هفته‌ای نژاد Balb/C از انستیتو پاستور ایران تهیه گردیدند. حیوانات در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی در شرایط استاندارد شامل دمای پایدار ۲۱±۲°C، شرایط نور مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۵ ± ۵۵٪ در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند و آب و غذای کافی در اختیار داشتند. کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق پروتکل اخلاقی دانشگاه خوارزمی انجام شد.

تعداد ۸ سر موش برای القای تومور اولیه انتخاب شدند و سلول‌های 4T1 به‌صورت زیر جلدی با غلظت 10^6 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS[3] به هر موش تزریق شد. ده روز پس از تزریق تومورهای اولیه در محل تزریق قابل مشاهده بودند. در روز بیستم پس از تزریق سلول‌ها، تومورها خارج شده و توسط تیغ اسکالپل به قطعات ۳ میلی‌متر مکعبی برش داده شدند. به‌منظور القای تومور ثانویه، این قطعات به موش‌های Balb/C

1. Fetal bovin serum

2. MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

3. Phosphate-buffered saline

که توسط کتامین و زایلـزین بیهـوش شـده بودنـد، بـه‌صـورت زیرجلدی و بـه ناحیـه پهلـوی راسـت[1] پیونـد زده شـدند. ایـن موش‌ها ده روز پس از پیوند آماده تیمار بودند.

برای به‌دست آوردن غلظت کشنده (LD_{50})[2] غلظـت‌هـای ۲۵۰، ۲۵۵، ۲۶۰، ۲۶۵، ۲۷۰، ۲۷۵، ۲۸۰، ۲۸۵، ۲۹۰، ۲۹۵ و ۳۰۰ mg/kg ترکیب تری‌آزنی به گـروه‌هـای مختلـف تزریـق شـد. پـس از مشـخص شـدن محـدوده تقریبـی ۲۶۵ تـا ۲۷۰ mg/kg مجـدداً غلظـت‌هـای ۲۶۶، ۲۶۷، ۲۶۸، ۲۶۹ و ۲۷۰ mg/kg تزریـق شـد و غلظـت نهـایی بـه‌دسـت آمـد. سـپس غلظت‌های ۱/۵ و ۱/۳ غلظت کشنده به‌منظور تیمـار مـوش‌هـای سرطانی مورد استفاده قرار گرفت.

موش‌های القا شده به صورت تصادفی در گروه‌های کنترل، کنترل حلال (الکل)، گروه تیمار ۱/۵ غلظت کشنده، گروه تیمـار ۱/۳ غلظـت کشـنده و گـروه کنتـرل مثبـت (تیمـار بـا داروی سیکلوفسفامید با دوز ۴۰mg/kg) تقسیم‌بنـدی شـدند. در هـر گروه تعداد ۶ سر موش قرار گرفت. در همـه گـروه‌هـای مـورد آزمـایش تزریـق بـه صـورت درون صـفاقی، در حجـم ۱۰۰ میکرولیتر و در روزهای یکـم، سـوم و پـنجم آزمـایش صـورت گرفت.

به‌منظور بررسی مورفومتریک تومورها، اندازه بزرگ‌تـرین و کوچک‌ترین قطر هر تومور در گروه‌های مختلـف انـدازه‌گیـری شد. به این منظور قطر بـزرگ و کوچـک تومورهـا روز قبـل از اولین تزریق (روز صفر) و نیز پس از آخرین تزریق (روز ششـم)، توسط کولیس اندازه‌گیری شد. کـاهش یـا افـزایش معنـادار در اندازه تومـور قبـل و بعـد از تیمـار نشـان‌دهنـده تـأثیر ترکیـب تری‌آزنی بر رشد تومور بود.

برای بررسی بیان ژن Bax از روش RT-PCR[3] اسـتفاده شـد. پـس از اسـتخراج mRNA و سـنتز پرایمـر اختصاصـی (جـدول ۱)، از دسـتگاه ترموسـایکلر بـرای انجـام مراحـل RT-PCR استفاده شـد. سـپس محصـولات PCR روی ژل

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های Bax و Beta-actin.

Bax R	GATCAGCTCGGGCACTTTAG
Bax F	AGCTGCAGAGGATGATTGCT
Beta-actin R	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
Beta-actin F	AGCCATGTACGTAGCCATCC

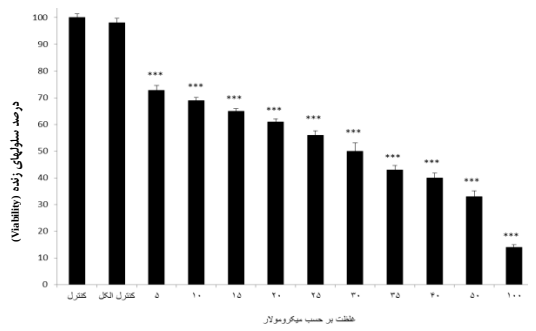
آگارز ۱/۵٪ تفکیک و با ایتیدیم بروماید رنـگ آمیـزی شـد. در نهایت ژل بـه‌دسـت آمـده تحـت نـور UV و توسـط دسـتگاه GelDoc مورد مشاهده قرار گرفت.

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار InStat-3 و آزمون پارامتری توکی آنوا استفاده شـد و نمودارهـا از طریـق نرم افزار اکسل رسم شدند. $p<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید و هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد.

یافته‌ها

بررسی میزان بقاء و تکثیر سلولی در رده سلولی 4T1 تحت تیمار با ترکیب تری‌آزنی با استفاده از آزمـون ام.تی.تـی انجـام گرفت. سلول‌های 4T1 با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول از ترکیب جدید تری‌آزنی تحـت تیمار قرار گرفتند. نتایج حاصـل از ایـن بررسـی نشـان داد کـه ترکیب تری‌آزنی در یک الگوی وابسته به غلظت موجب القـای مرگ سلولی و کاهش زیست پذیری در رده سلولی 4T1 شـد. به‌طوری که غلظت ۳۰ میکرومول از ترکیب تری‌آزنـی پـس از طی ۲۴ ساعت منجر به القای ۵۰٪ مرگ سلولی در سلول‌هـای 4T1 گشت. نتـایج حاصـل از ایـن بررسـی در نمـودار ۱ ارائـه گردیده است.

پس از اینکه دوز کشنده (LD_{50}) برای ترکیـب تـری‌آزنـی ۲۶۶ mg/kg به‌دست آمد، غلظت‌های ۱/۵ و ۱/۳ غلظت کشـنده

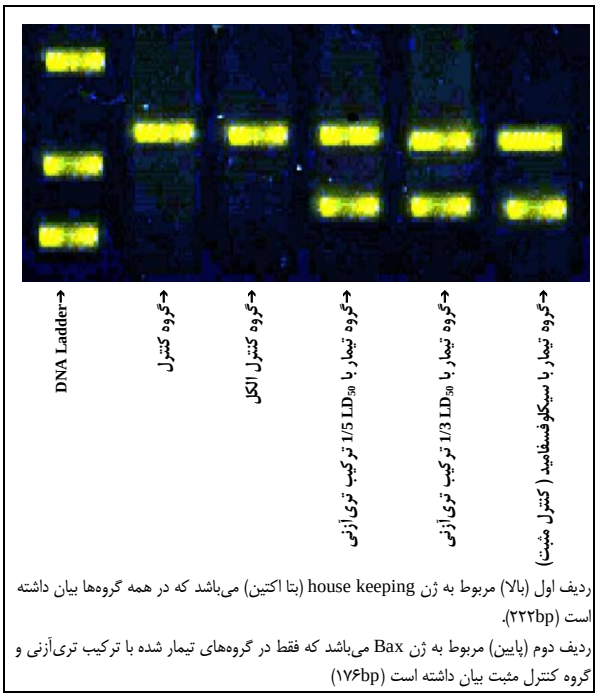


نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف ترکیب تری‌آزنی بر درصد بقای سلول‌های 4T1

1. Right flank
2. lethal dose, 50%
3. Reverse transcription polymerase chain reaction

(به ترتیب ۵۳/۲ mg/kg و ۸۸/۶۶ mg/kg) برای تیمار مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی مورفومتریک قطر تومورهای تحت تیمار با ترکیب تری‌آزنی جدید با اندازه‌گیری کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین قطر هر تومور قبل و بعد از اتمام دوره تیمار انجام گرفت و نشان‌دهنده کاهش معنادار در اندازه قطرهای تومور در گروه‌های تیمارشده با ترکیب مورد نظر بود. درحالی که در گروه‌های کنترل و کنترل حلال این روند افزایشی بود. نتایج حاصل از این بررسی در نمودارهای ۲ و ۳ ارائه شده‌اند.

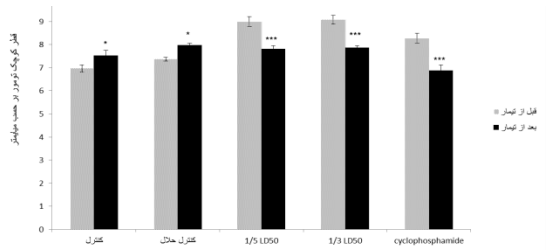
نتایج حاصل از بررسی بیان ژن Bax در تومورهای تحت تیمار با ترکیب تری‌آزنی توسط آزمون RT-PCR :نشان داد میزان بیان ژن Bax در گروه‌های تیمار شده با ترکیب تری‌آزنی و نیز در گروه تیمار شده با داروی ضدسرطان سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه‌های کنترل و کنترل الکل افزایش چشم‌گیری نشان داد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن Bax در شکل ۲ نشان داده شده است.



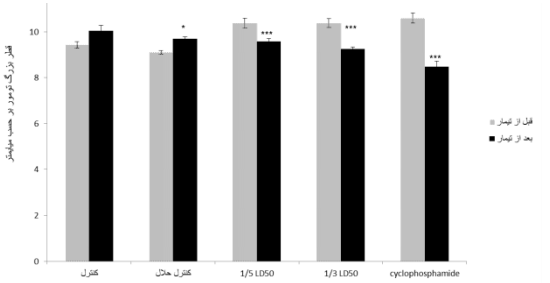
ردیف اول (بالا) مربوط به ژن house keeping (بتا اکتین) می‌باشد که در همه گروه‌ها بیان داشته است (۲۲۲bp).

ردیف دوم (پایین) مربوط به ژن Bax می‌باشد که فقط در گروه‌های تیمار شده با ترکیب تری‌آزنی و گروه کنترل مثبت بیان داشته است (۱۷۶bp)

شکل ۲- نتایج بررسی بیان ژن Bax توسط آزمون RT-PCR.



نمودار ۲- مقایسه اندازه قطر کوچک تومور در گروه‌های مختلف
(Mean ± S.D, P<0.001 ***, P<0.05 *)



نمودار ۳- مقایسه اندازه قطر بزرگ تومور در گروه‌های مختلف
(Mean ± S.D, P<0.001 ***, P<0.05 *)

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش به بررسی اثرات ضد تکثیری و ضد توموری یک ترکیب تری‌آزنی جدید به نام ۱-(۳و۵-دی کلروفنیل)-۳-(۲-اتوکسی فنیل) تری‌آزن بر روی رده سلولی 4T1 (یک رده سلولی سرطان پستان موشی) و نیز بر روی تومورهای پستانی القاء شده توسط این رده سلولی در موش سوری نژاد Balb/C که مدلی برای مرحله ۴ سرطان پستان انسانی است، پرداخته شد.

این مطالعه اولین گزارش از اثرات ترکیب جدید تری‌آزنی بر روی رده سلولی سرطان پستان و نیز تومور پستانی القاء شده است. بر اساس نتایج حاصله این ترکیب قادر است مرگ سلولی را در رده سلولی 4T1 القاء کرده و قابلیت زنده ماندن این سلول‌ها را کاهش دهد. همچنین این ترکیب قادر است با القای مرگ سلولی، رشد تومورهای القاء شده در محیط in vivo را به میزان معناداری کاهش دهد. بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد مرگ سلولی رخ داده از نوع آپوپتوز بوده و از مسیر وابسته به کاسپاز رقم می‌خورد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون ام.تی.تی این ترکیب

تری‌آزنی جدید در یک الگوی وابسته به غلظت موجب القای مرگ سلولی در رده سلولی 4T1 می‌شود. غلظتی از این ترکیب که پس از گذشت ۲۴ ساعت موجب القای ۵۰٪ مرگ سلولی در سلول‌های 4T1 شد، ۳۰ میکرومول بود. همچنین تیمار موش‌های توموری شده با غلظت‌های ۵۳/۲ mg/kg و ۸۸/۶۶ mg/kg تری‌آزن، کاهش معناداری در اندازه تومورها قبل و بعد از تیمار نشان داد. در حالی که در موش‌های گروه کنترل، اندازه‌گیری نشان دهنده افزایش رشد اندازه تومور بود.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن توسط تکنیک RT-PCR نیز نشان دهنده افزایش بیان ژن Bax در تومورهای موش‌های تحت تیمار با ترکیب تری‌آزنی در مقایسه با تومورهای موش‌های گروه کنترل بود که نشان دهنده وقوع آپوپتوز می‌باشد. Bax از جمله اعضای پروآپوپتوتیک خانواده Bcl2 است که نقش مهمی در تنظیم مسیر میتوکندریایی آپوپتوز ایفا می‌کنند [۷]. در مسیر آپوپتوزی داخلی، پروتئین‌های پیش آپوپتوزی خانواده Bcl-2 مانند Bak و Bax به میتوکندری منتقل شده و باعث القای یک سری منافذ نفوذپذیر موقت در غشای خارجی میتوکندری می‌شوند. این مسئله مسیری را برای آزادسازی پروتئین‌های فضای بین دو غشای میتوکندری به درون سیتوزول باز می‌کند، که از مهمترین آنها می‌توان به سیتوکروم C، AIF[1] و اندونوکلئاز G اشاره کرد که منجر به فعالیت آپوپتوزی وابسته به کاسپاز و مستقل از کاسپاز می‌شوند [۱۲]. همچنین Bax به‌عنوان یک عامل پایین دست ضروری برای مسیر آپوپتوزی میانجی‌گری شده توسط پروتئین P53 است و به علاوه با تشکیل دایمر با پروتئین Bcl-2، عملکرد مهاری آن بر وقوع آپوپتوز را مهار می‌کند [۱۳].

القای آپوپتوز در سلول‌های توموری یکی از مهمترین سازوکارهای سایتوتوکسیک اغلب داروهای ضد سرطان می‌باشد، به‌طوری که مهار آپوپتوز یکی از ویژگی‌های شاخص سرطان‌های مهاجم و از جمله ملانومای بدخیم است [۱۴]. آسیب سلولی و از جمله آسیب به DNA که توسط عوامل شیمی درمانی ایجاد می‌شوند، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را توسط مجموعه‌ای از وقایع آبشاری، از جمله فعال شدن مسیر کاسپازی راه اندازی می‌کند [۱۵].

از جمله داروهای مورد استفاده در درمان سرطان می‌توان به داروهای آلکیله کننده اشاره نمود. آلکیلاسیون DNA از مهمترین واکنش‌های مهم منجر به مرگ سلولی به‌شمار می‌آید و داروهای آلکیله کننده با اعمال اثرات سایتوتوکسیک از طریق انتقال گروه‌های آلکیل DNA عمل می‌کنند. محل اصلی آلکیلاسیون در DNA موقعیت N^7 گوانین، موقعیت‌های N^1 و N^3 آدنین، موقعیت N^3 سیتوزین و O^6 گوانین و همچنین اتم‌های فسفات می‌باشد. این واکنش‌ها می‌توانند بر روی یک رشته واحد و یا هر دو رشته DNA از طریق اتصال عرضی روی دهند. آلکیلاسیون گوانین می‌تواند موجب جفت شدن غیرطبیعی با تیمین و یا جدا شدن باقیمانده گوانینی و دپورینه شدن DNA گردد که در نهایت منجر به شکسته شدن رشته DNA بواسطه بریده شدن داربست قند- فسفات در DNA می‌شود. اتصالات عرضی DNA اهمیت عمده‌ای در تأثیر سایتوتوکسیک عوامل آلکیله کننده دارد. باید توجه داشت با وجود اینکه آلکیله شدن موقعیت O^6 گوانین مهمترین نقش را در القای آپوپتوز به وسیله عوامل آلکیله کننده دارد، ولی اثبات شده است که ۳- متیل آدنین نیز قادر به القای آپوپتوز می‌باشد [۱۶].

O^6 متیل گوانین در صورتی که توسط سامانه‌های ترمیم DNA تشخیص داده نشود موجب جفت شدن ناجور با باز تیمین می‌شود. این جفت شدن ناجور بازها نیز می‌تواند توسط سامانه ترمیم بازهای ناجور (MMR)[2] اصلاح شود. این سیستم با فعال کردن اگزونوکلئازها، قسمت آسیب دیده را حذف کرده شروع به ترمیم آن ناحیه می‌کند. ولی درصورتی که تلاش برای ترمیم این آسیب موفقیت آمیز نباشد باعث شکستگی در DNA شده و با متوقف ساختن چرخه سلولی در نهایت منجر به آپوپتوز سلولی می‌شود [۱۷].

1. Apoptosis-Inducing Factor

2. DNA mismatch repair

مدل غالبی که برای توصیف مکانیسم مرگ سلولی القا شده توسط تری‌آزن‌ها و تحت سیستم ترمیم MMR به‌کار می‌رود، Futile Cycle model نامیده می‌شود. بر طبق این مدل، سیستم MMR جفت شدگی ناجور O^6 متیل گوانین و سیتوزین و همچنین O^6 متیل گوانین و تیمین را شناسایی کرده و در جهت ترمیم آن تلاش می‌کند. گرچه باز متیله شده (O^6 متیل گوانین) در رشته الگو قرار دارد ولی MMR رشته تازه سنتز شده را مورد هدف قرار می‌دهد و این اصلاح انجام گرفته منجر به از هم پاشیدگی رشته دارای پیریمیدین می‌شود و سبب جاگذاری ثانویه سیتوزین و یا تیمین در مقابل O^6 متیل گوانین می‌گردد. تلاش‌های مکرر بیهوده در ترمیم در اصل منجر به ایجاد فواصلی در DNA تازه سنتز شده می‌شود. DNA صدمه دیده با فعال کردن آبشاری از رویدادها چرخه سلولی را در فاز G2 متوقف کرده، مرگ سلولی را القا می‌کند [۱۸، ۱۹].

نتایج حاصل نشان می‌دهد ترکیب تری‌آزنی جدید دارای اثرات آنتی توموری قابل توجهی است و هم در شرایط in vitro بر روی رده سلولی 4T1 و هم در شرایط in vivo بر روی تومورهای ایجاد شده قادر به القای مرگ سلولی و بیان ژن Bax است. بر اساس شواهد موجود به‌نظر می‌رسد این ترکیب برای القای آپوپتوز از مسیر داخلی آپوپتوز عمل می‌کند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد با توجه به بروز مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای رایج، ترکیب ۱-(۳و۵-دی کلروفنیل)-۳-(۲-اتوکسی فنیل) تری‌آزن در آینده می‌تواند مسیری جدید در جهت طراحی و سنتز داروهای نو برای شیمی درمانی باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری مسئولین آزمایشگاه زیست شناسی تکوینی و مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی تهران قدردانی می‌گردد.

References

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Science Health Science Division; 2014.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(1):9-29.
3. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. The breast journal. 2007;13(4):383-391.
4. Adamowicz K, Marczewska M, Jassem J. Combining systemic therapies with radiation in breast cancer. Cancer treatment reviews. 2009;35(5):409-416.
5. Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. Cell Cycle. 2007;6(6):686-695.
6. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends in cell biology. 2001;11(12):526-534.
7. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. American journal of physiology. Cell physiology. 2007;292(1):C45-51.
8. Stefane B, Kocevar M, Polanc S. Nitrosation with Sodium Hexanitrocobaltate(III). The Journal of organic chemistry. 1997;62(21):7165-7169.
9. Brahimi F, Rachid Z, McNamee JP, Alaoui-Jamali MA, Tari AM, Jean-Claude BJ. Mechanism of action of a novel "combi-triazene" engineered to possess a polar functional group on the alkylating moiety: evidence for enhancement of potency. Biochemical pharmacology. 2005;70(4):511-519.
10. Kimball DB, Haley MM. Triazenes: a versatile tool in organic synthesis. Angewandte Chemie. 2002;41(18):3338-3351.
11. Cohen GL, Falkson CI. Current treatment options for malignant melanoma. Drugs. 1998;55(6):791-799.
12. Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. Cellular signalling. 2008;20(1):21-30.
13. Haque ME, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K-i, Ogawa N. Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2003;1619(1):39-52.
14. Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Kurbanov BM, Fechner H. Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma. Experimental dermatology. 2008;17(1):1-11.
15. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. Oncogene. 1998;17(25):3237-3245.
16. Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. Pharmacological research. 2007;56(4):275-287.
17. Boeckmann L, Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Kuschal C, et al. Modulation of the efficacy of temozolomide and dacarbazine melanoma treatment by DNA-repair factors in vivo and in vitro. International journal of clinical pharmacology and therapeutics. 2009;47(1):33-35.
18. Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. Mutation research. 2000;462(2-3):71-82.
19. Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. Mutation research. 1997;381(2):227-241.

Anti-tumor effects of a new triazene compound: A laboratory study

Amirpour Asl S[1], *Nabiuni M[2], Yazdanian Z[1], Rofouei MK[3], Mahdavi M[4], Khoshvagti A[5], Karimzadeh L[1]

Abstract

Background: Triazene compounds have many applications in various fields such as anticancer drugs. In this study, we aimed to find out anti-cancerous effects of 1-(3, 5-dichlorophenyl)-3-(2-ethoxyphenyl) triazene on 4T1 cell line and induced breast cancer in mice.

Materials and methods: 4T1 cell line was cultured and then treated for 24h with different concentrations of new triazene compound. Cell viability was assessed by MTT assay. For tumor induction, we used 7-8 weeks old Balb/C mice. Then 4T1 cells were injected subcutaneously with appropriate concentration. When tumor observed, mice were randomly assigned to groups. Mice were treated with different concentration of new triazene compound. Tumor sizes in each group were compared before and after the treatment. Expression of Bax gene was analyzed by RT-PCR.

Results: MTT assay results shows that IC_{50} for new triazene compound on 4T1 cell line in 24h was 30µ Mol. Also analysis of tumor size shows a significant reduction at triazene treated groups compared with the control group. RT-PCR result shows increase in Bax gene expression at triazene treated groups compared with the control group.

Conclusion: New triazene compound could reduce 4T1 cell viability *invitro* and also could reduce tumor size *invivo*. Also, it could induce apoptosis in tumor tissues by increase in Bax gene expression.

Keywords: Breast Cancer, Diazoamino Compounds, Tumor Cell Lines, Bax Protein.

1. MSc in Cell & developmental Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Associate professor, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran (*Corresponding author)

3. Professor, Faculty of Chemistry, Kharazmi University, Tehran, Iran

4. Associate professor, Pasteur Institute, Tehran, Iran

5. Assistant professor, Faculty of Aerospace & Subaquatic Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.