DOI: 10.22122/jims.v36i466.8874 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۶۶/هفته‌ی دوم فروردین ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۶ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱/۸

بررسی اثر آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین نوع A2B (BAY 60–6583) بر القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطان کلیه‌ی انسان

عبدالوهاب شفیعی[۱]، محمدرضا شریفی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیرنده‌ی آدنوزین نوع A2B (A2bAR یا A2B adenosine receptor) از خانواده‌ی گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G می‌باشد که در غلظت‌های بالای آدنوزین که در شرایط ویژه‌ی پاتوفیزولوژیکی اتفاق می‌افتد، فعال می‌شود. فعال شدن A2bAR در سلول‌های سرطانی، باعث توقف یا افزایش رشد می‌شود. مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی اثر آگونیست گیرنده‌ی A2bAR در القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی ACHN کارسینومای کلیه انجام شد.

روش‌ها: رده‌ی سلولی کارسینومای کلیه جهت بررسی تأثیر آگونیست BAY 60–6583 بر القای آپوپتوز انتخاب شد. سلول‌ها در محیط کشتبا گلوکز بالای Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شدند. برای بررسی درصد سلول‌های زنده و میزان آپوپتوز به ترتیب از روش‌های 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) و Annexin V/propidium iodide (Annexin V/PI) استفاده شد.

یافته‌ها: آزمون MTT نشان داد از بین نمونه‌هایی که با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از آگونیست BAY 60–6583 تیمار شدند، حدود ۵۰ درصد بعد از ۴۸ ساعت زنده ماندند. همچنین، نتایج آزمون آپوپتوز نشان داد که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آگونیست BAY 60–6583 بعد از ۴۸ ساعت باعث القای بیشترین آپوپتوز شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که BAY 60–6583 با تحریک گیرنده‌ی A2bAR باعث القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی ACHN کارسینومای کلیه می‌شود. بنابراین، آگونیست گیرنده‌ی A2b می‌تواند به عنوان یک عامل جهت مهار سرطان استفاده شود.

واژگان کلیدی: آدنوزین، گیرنده‌ی آدنوزین A2B، BAY 60–6583، آپوپتوز، سرطان کلیه

ارجاع: شفیعی عبدالوهاب، شریفی محمدرضا. **بررسی اثر آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین نوع A2B (BAY 60–6583) بر القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطان کلیه‌ی انسان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۶۶): ۴۱-۳۵

مقدمه

سرطان کلیه، یکی از سرطان‌های شایع به خصوص در کشورهای توسعه یافته می‌باشد. Renal cell carcinoma (RCC) تومورهایی هستند که از سلول‌های اپیتلیال توبول‌های کلیه به وجود می‌آیند و بیش از ۹۰ درصد از تومورهای کلیه را به خود اختصاص می‌دهند. RCC در آمریکا هشتمین بدخیمی در میان سرطان‌های شایع را به خود اختصاص می‌دهد (۱).

در سال‌های اخیر، یافته‌هایی که در شناسایی مولکول‌های دخیل در سلول‌های سرطانی به دست آمده است، منجر به شناسایی داروهای مناسب برای القای آپوپتوز و درمان سرطان شده است (۳-۲).

آدنوزین از سلول‌های فعال از لحاظ متابولیکی و از تغییر Adenosine triphosphate (ATP) آزادشده، تولید می‌شود. چهار گیرنده ی متفاوت A1، A2A، A2B و A3 برای آدنوزین شناسایی و از لحاظ فارماکولوژیکی مشخص شده‌اند. این گیرنده‌ها، از دسته ی گلیکوپروتئین‌های گذرنده از غشا که به پروتئین G جفت می‌شوند، می‌باشند. گیرنده‌های A2A و A2B با فعالیت آدنیلات سیکلاز همراه می باشند و تحریک آن‌ها، سبب افزایش غلظت آدنوزین مونو فسفات حلقوی (cAMP یا Cyclic adenosine monophosphate) سلول

۱- گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا شریفی

Email: mo_sharifi@med.mui.ac.ir

می‌شود. در حالی که تحریک A1 و A3 سبب کاهش cAMP و افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی از طریق جفت شدن با فسفولیپاز C (Phospholipase C یا PLC) می‌شود. آدنوزین، دارای اثرات گسترده و چندگانه‌ای می‌باشد که عملکرد آن به نوع و میزان بیان گیرنده بستگی دارد (۴-۳).

آدنوزین نه تنها به عنوان یک تنظیم کننده‌ی رشد و مهاجرت سلولی عمل می‌کند، بلکه عملکردهای پیچیده‌تری مانند نقش نوروترانسمیتری، تنظیم کننده ی پاسخ ایمنی و انقباض عروق را نیز بر عهده دارد. به این علت که سیگنال‌های مربوط به آدنوزین به طور قوی در ارتباط با حفظ انرژی سلول می‌باشند و از آن جایی که رشد تومور باعث تغییر در متابولیسم سلول می‌شود، توجیه ارتباط اثرآدنوزین با سلول‌های سرطانی منطقی است (۴).

به تازگی، گیرنده‌های جفت شونده به پروتئین G به عنوان اهداف دارویی برای درمان سرطان اهمیت پیدا کرده‌اند و (A2B adenosine receptor) A2BAR یکی از انواع گیرنده‌های جفت شونده به پروتئین G است که در برخی از انواع سرطان ها، به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش بیان پیدا می‌کند (۵).

A2bAR، بر خلاف سایر گیرنده های آدنوزین به غلظت های بالاتری از آدنوزین برای فعال شدن نیاز دارد که این امر با قرار گرفتن در شرایط خاص پاتوفیزولوژیک مانند ایسکمی و تومورها که به طور معمول هیپوکسی در آن‌ها مشاهده می‌شود، اتفاق می‌افتد (۶).

در مطالعه‌ی حاضر، نقش گیرنده‌ی A2BAR در القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطان کلیه مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مطالعه جهت شناخت ویژگی‌های A2BAR برای مدت‌ها به علت نبودن آگونیست اختصاصی بدون پیشرفت و با مشکل رو به رو بود. به تازگی، با به کار بردن روش‌ها و ابزارهای جدید ژنتیکی و دارویی اختصاصی برای A2BAR، به اهمیت این گیرنده در فرایندهای سلولی توجه ویژه‌ای شده است. غلظت آدنوزین خارج سلولی در شرایطی مانند هیپوکسی، التهاب و ایسکمی افزایش می‌یابد. در این حالت نیز بیان A2BAR افزایش پیدا می‌کند. با این شناخت، مطالعات زیادی جهت بررسی نقش A2BAR در شرایط پیش گفته طراحی شده‌اند (۷). گیرنده‌ی A2bAR نقش اساسی در کنترل التهاب سلولی، واکنش‌های ایمنی، مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول، تقسیم سلولی و تمایز سلولی دارد. میزان بیان و عملکرد گیرنده‌ی A2bAR در سلول و بافت‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (۱۱-۸).

شناسایی BAY-60-6583 به عنوان آگونیست اختصاصی A2BAR به شناخت عملکرد این گیرنده کمک قابل توجهی کرده است (۹). با توجه به افزایش شیوع سرطان کلیه در کشورهای در حال توسعه، مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی اثر آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین نوع A2B (BAY 60-6583) در القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی ACHN کارسینومای کلیه انجام شد.

روش‌ها

کشت و تیمار سلول: رده‌ی سلولی کارسینومای کلیه (مرکز ذخایر ژنتیک و زیستی ایران، ایران) تهیه و در محیط کشت (High glucose) (DMEM) Dulbecco's modified eagle medium (بیوایده، ایران) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, Germany) و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین (بیوایده، ایران)، تحت شرایط دمای کنترل شده (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) و اتمسفر مرطوب حاوی Carbon dioxide (CO_2) ۵ درصد کشت داده شدند. آگونیست اختصاصی A2bAR (BAY 60-6583) (Tocris, UK) در ۱ میلی‌لیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) به حالت محلول تهیه شد. سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۱۰ هزار سلول در هر چاهک کشت داده شدند. آگونیست با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به چاهک‌ها اضافه شد. برای هر غلظت سه بار تکرار و سه چاهک به عنوان شاهد (بدون آگونیست، بدون DMSO و بدون آگونیست و با DMSO) در نظر گرفته شد. تیمار سلولی در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide).

آزمون MTT، آزمونی کمی و رنگی است که اساس آن بر پایه‌ی احیای نمک زرد رنگ محلول در آب حاوی 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ تیره و نامحلول فورمازان در آب می‌باشد. احیای MTT، به وسیله‌ی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد و تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد. بلورهای فورمازان در حلال‌های آلی چون DMSO و ایزوپروپانول قابل حل می‌باشند که با سنجش میزان جذب نوری آن، می‌توان تعداد سلول‌های زنده را که فعالیت سوخت و سازی دارند، تعیین نمود.

پس از سپری شدن زمان مورد نظر برای هر تیمار به هر یک از چاهک‌ها، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (sigma, USA) اضافه شد. سپس، با قرار دادن پلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در تاریکی، عمل انکوباسیون انجام شد. پس از سپری شدن مدت زمان لازم برای انکوباسیون، با دقت محتویات هر چاهک خالی و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، چاهک‌ها توسط دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شدند. توان زیستی سلول‌های تیمار شده با BAY 60-6583 به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه‌ی

شاهد در قیاس با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه محاسبه شد.

فلوسایتومتری: به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در جمعیت سلولی تحت تیمار با دارو و قیاس آن با جمعیت سلولی شاهد، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با کیت Annexin-V FITC (BioLegend, USA) انجام گرفت؛ به این صورت که بعد از تیمار کردن سلول‌ها با ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از BAY 60-6583 و ۴۸ ساعت انکوباسیون (در این زمان بیشترین اثر در روش MTT مشاهده شد)، سلول‌ها تریپسینه شدند و با بافر فسفات سالین (Phosphate buffered aline یا PBS) استریل شستشوی سلول‌ها انجام گرفت.

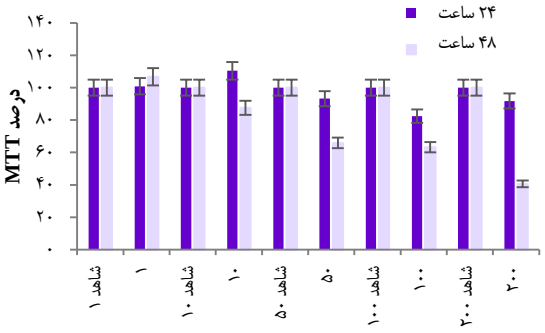
رسوب سلولی به دست آمده، در بایندینگ بافر آنکسین V (Annexin V binding buffer) به حالت محلول درآورده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سلولی در لوله‌ی ۵ میلی‌لیتر فلوسایتومتری ریخته شد. ۵ میکرولیتر از رنگ آنکسین (Annexin-V) و ۱۰ میکرو لیتراز رنگ پروپیدیوم یدید (Propidium iodide یا PI) نیز به محتویات موجود در لوله اضافه شد. سپس، لوله به آرامی ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) و تاریکی انکوبه شد. در نهایت، آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت.

واکاوی آماری: در این مطالعه، همه‌ی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد. آزمون Two-way ANOVA و همچنین، آزمون‌های تعقیبی Tukey و Schefee مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها

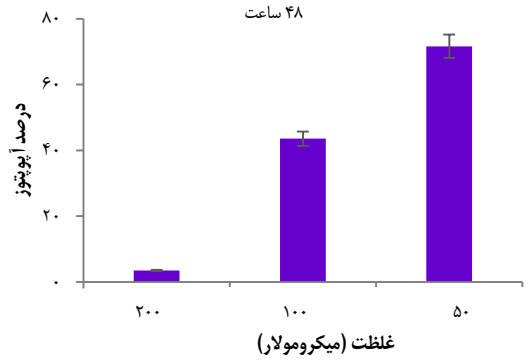
MTT: تأثیر آگونیست BAY 60–6583 بر روی زنده ماندن سلول‌های رده‌ی ACHN از طریق روش MTT ارزیابی شد. جهت ارزیابی اثر دارو بر تعداد سلول های زنده در طی آزمایش، درصد سلول‌های زنده در طی دوره‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اثر دارو در غلظت‌های مختلف محاسبه شد.

نمونه‌های تیمار شده با آگونیست BAY 60–6583، جذب نوری کمتری نسبت به سلول های شاهد داشتند. نتیجه ی آزمایش نشان داد که جمعیت سلول‌های زنده‌ی رده‌ی ACHN در تیمار با آگونیست BAY 60–6583 کاهش یافته است. بیشترین اثر دارو در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت از قرار گرفتن در معرض دارو مشاهده شد. سلول‌های تیمار نشده به عنوان شاهد استفاده شدند (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) غلظت‌های مختلف BAY 60-6583 در رده‌ی سلولی ACHN کارسینومای کلیه در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت

سنجش فلوسایتومتری برای ارزیابی پتانسیل القای آپوپتوز آگونیست BAY 60–6583 بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی ACHN استفاده شد. نتایج نشان داد غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آگونیست BAY 60–6583 بعد از ۴۸ ساعت، باعث القای بیشترین آپوپتوز در رده‌ی سلول‌های ACHN شد که برای دو غلظت پیش‌گفته به ترتیب بیش از ۴۰ و ۷۰ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج روش فلوسایتومتری غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار BAY 60-6583 در رده‌ی سلولی کارسینومای کلیه

بحث

در دهه ی گذشته، مطالعات بسیاری در مورد مکانیسم سرطان کلیه انجام گرفته است. در سال های اخیر، برای درمان سرطان، داروهای متعددی جهت القای آپوپتوز استفاده می‌شود (۱۲). آدنوزین به عنوان یک نوکلئوزید پورینی، تأثیرات فیزیولوژیک بسیاری مانند ممانعت از تجمع پلاکتی، اثر روی سیستم عصبی، سیستم قلبی- عروقی و

سیستم ایمنی دارد (۱۷-۱۳). این تأثیرات، به واسطه‌ی فعال‌سازی گیرنده‌های آدنوزینی می‌باشد. این گیرنده‌ها در بافت و سلول‌های مختلف اثرات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک مختلف مانند تکثیر سلولی، توقف چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز دارند (۱۸).

آدنوزین و آنالوگ‌های آن سبب ایجاد آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال، آستروسیت و سایر سلول‌ها می‌شود. در مطالعات In vivo و In vitro آدنوزین به عنوان یک عامل مهار کننده‌ی تکثیر سلول‌های سرطانی شناسایی شده است (۱).

آدنوزین سبب مرگ سلول‌های تیموس موش با افزایش بیان Tumor protein p53 (P53) می‌شود. این عمل، مستقل از گیرنده‌های آدنوزین و تحریک بیان کاسپازها انجام گرفته است (۲).آدنوزین خارج سلولی سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کلیه‌ی انسان، Renal cell carcinoma4-von Hippel-Lindau (RCC4-VHL) و ACHN می‌شود. در سلول‌های RCC4-VHL و ACHN، به ترتیب گیرنده‌های آدنوزین نوع A3 و A2a باعث القای اثر آپوپتوزی آدنوزین و آگونیست‌های دیگر در این سلول‌ها می‌شوند (۳). در مطالعه‌ی انجام شده بر روی سلول‌های HepG2 مشاهده شد که آدنوزین سبب القای آپوپتوز با فعال کردن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در مسیر واسطه به P53 می‌شود (۴).

در Hepatic stellate cells (HSC) آدنوزین با اثر بر A2A سبب کاهش بیان P53 و retinoblastoma protein (Rb) می‌شود و به دنبال آن، کاهش پیری سلول و آپوپتوز را در این سلول‌ها به همراه دارد (۱۹). مطالعه‌ی دیگری نشان داد که آدنوزین در سلول‌های بدخیم مزوتلیوم پلور، سبب القای آپوپتوز با افزایش بیان P53 اما مستقل از کاسپاز می‌شود. در این مطالعه، همچنین مشاهده گردید که گیرنده‌ی آدنوزین A3 از مسیر جداگانه‌ای سبب القای آپوپتوز می‌شود (۲۰). آدنوزین در سلول‌های Lu-65 (رده‌ی سلولی سرطان ریه) با اثر بر گیرنده‌ی آدنوزین A3، سبب القای آپوپتوز با افزایش بیان P53 و Noxa و به دنبال آن فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ می‌شود (۲۱).

ژن P53 یک هدف برای عامل رونویسی GATA-2 می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های کارسینومای کبد (HepG2) انجام شد، مشاهده گردید که آدنوزین تنظیم رونویسی P53 به وسیله‌ی GATA-2 را افزایش می‌دهد و سبب القای آپوپتوز از مسیر کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ می‌شود (۲۲).

از آن جایی که A2B بر خلاف سایر گیرنده‌ها، میل کمتری برای اتصال به آدنوزین دارد و در شرایط استرس سلولی از جمله سرطان، غلظت آدنوزین خارج سلولی افزایش می‌یابد، می‌توان انتظار داشت که A2B تحت این شرایط عملکرد بهتری را از خود نشان دهد.

مطالعه‌ی بیان ژن‌ها در بافت‌های سرطانی مانند سلول‌های کبد، افزایش بیان A2bAR و نقش آن در رشد تومورها را نشان می‌دهد. علاوه بر این، A2bAR باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بر اساس نوع رده‌ی سلول و غلظت آگونیست و آنتاگونیست می‌شود (۵). به عنوان مثال، در رده‌ی سلولی سرطان پروستات، به کار بردن آنتاگونیست A2bAR (PSB603) توقف رشد این سلول‌ها را به همراه دارد (۶) و در سلول‌های ماهیچه‌ی صاف شریان‌ها، این آگونیست A2bAR است که آپوپتوز را القا می‌کند (۷). در فیبروبلاست‌های قلبی و آئورت و سلول‌های ماهیچه‌ی صاف عروق، آدنوزین با اثر بر A2bAR باعث توقف رشد می‌شود؛ این در حالی است که در سلول‌های اندوتلیال شریانی موش، این عمل باعث تکثیر و رشد سلول‌ها می‌شود. پس با این حال، باید به این امر توجه کرد که A2bAR در سلول‌های ماهیچه‌ی صاف توقف رشد و در سلول‌های اندوتلیال افزایش رشد را تحریک می‌کند (۷).

A2BAR به طور عمده در موریگ‌ها بیان می‌شود و اعتقاد بر این است که بیان عوامل رگ‌زایی را تعدیل می‌کند (۲۳). به طورکلی، آدنوزین سبب فعال کردن A2BAR در سلول‌های اندوتلیال شبکیه‌ی انسان می‌شود که ممکن است موجب تشکیل رگ‌های جدید به واسطه‌ی افزایش بیان عوامل رگ‌زایی شود (۲۴). با توجه به این قضیه، به نظر می‌رسد آنتاگونیست‌های A2BAR جهت تخریب فرایند رگ‌زایی در تومورها که لازمه‌ی رشد آن‌ها است، در In vivo مفید واقع شده است (۲۵).

در سلول‌های سرطانی کبد (Huh-7) آدنوزین خارج سلولی با کاهش بیان Cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein (c-FLIP) سبب القای آپوپتوز می‌شود که این عمل با فعال شدن کاسپاز ۸ به واسطه‌ی کاسپاز ۳ صورت می‌پذیرد. در این مطالعه، مشاهده شد که در سلول‌های Huh-7 آدنوزین از طریق Apoptosis-inducing factor (AIF)-homologous mitochondrion-associated inducer of death (AMID) و جدایی از آپوپتوز، سبب فعال شدن کاسپازها می‌شود (۸). به کار بردن آگونیست اختصاصی A2bAR (BAY 60-6583) در رده‌ی سلولی سرطان پروستات تسریع رشد این سلول‌ها را به همراه دارد و آنتاگونیست آن رشد سلول‌ها را کند می‌کند (۶).

در رده‌ی سلولی سرطان تخمدان، آگونیست A2bAR باعث توقف رشد سلول با القای آپوپتوز می‌شود (۵). در سلول‌های سرطان کلون، عملکرد آدنوزین به عنوان یک عامل مهار کننده‌ی سرطان به واسطه‌ی گیرنده‌ی A2bAR اعمال می‌شود و نیز در سلول‌های ایمنی، A2bAR به واسطه‌ی تولید Vascular endothelial growth factor (VEGF) رشد تومورها را تسریع می‌کند (۹). در سلول‌های سرطانی غدد درون‌ریز، A2bAR افزایش بیان پیدا می‌کند و رشد سلول‌ها را

تسریع می‌نماید (۹).

در مطالعه‌ی حاضر، که به بررسی اثر فعال کنندگی آگونیست A2bAR (BAY 60-6583) در القای آپوپتوز در سلول‌های ACHN پرداخته شد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از BAY 60-6583 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و درصد زنده ماندن سلول‌ها با روش MTT اندازه گرفته شد. با بررسی نتایج MTT پس از سپری شدن ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، بیشترین اثر دارو مشاهد شد. برای بررسی میزان آپوپتوز در غلظت‌های ذکر شده، پس از تیمار و انجام فلوسایتومتری، بیشترین میزان آپوپتوز در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اتفاق افتاد که این میزان آپوپتوز به طور قابل توجهی با گروه شاهد تفاوت داشت.

برای غلظت ۲۰۰ میکرومولار در روش MTT، درصد زنده ماندن سلول‌ها ۴۰ درصد بود، اما نتایج سنجش آپوپتوز با نتایج MTT تفاوت بسیار زیادی داشت؛ به طوری که در این غلظت، میزان سلول‌های نکروز ۸۳ درصد بود.

هر چند میزان زنده ماندن سلول‌ها در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به طور تقریبی مشابه یکدیگر بود، اما میزان آپوپتوز در آن‌ها تفاوت چشم‌گیری داشت؛ به طوری که درصد آپوپتوز در غلظت ۵۰ میکرومولار به طور تقریبی دو برابر غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود.

با این حال، برای بررسی اثر A2BAR در القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی ACHN به مطالعات بیشتری نیاز است. مطالعاتی که در آن میزان بیان ژن‌های دخیل و به دنبال آن میزان تولید پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز و نیز مسیرهای درگیر در آن بررسی شود.

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که آگونیست BAY 60–6583 می‌تواند با تحریک گیرنده‌ی A2bAR در القای آپوپتوز نقش مؤثری داشته باشد. این مطالعه، می‌تواند برای بررسی‌های بیشتر در مورد نقش گیرنده‌ی آدنوزین نوع A2B در سرطان کلیه، یک آغاز باشد و با انجام مطالعات و آزمایش های بیشتر در این زمینه، می‌توان به یافتن عوامل بازدارنده‌ی رشد سلول‌های سرطانی دست یافت.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تصویب شده به شماره‌ی ۳۹۴۹۰۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله، از این دانشگاه جهت تأمین هزینه‌ی اجرای این مطالعه قدردانی می‌گردد.

References

1. de Vivar Chevez AR, Finke J, Bukowski R. The role of inflammation in kidney cancer. Adv Exp Med Biol 2014; 38(816): 197-234.
2. Jin Z, Wallace L, Harper SQ, Yang J. PP2A:B56{epsilon}, a substrate of caspase-3, regulates p53-dependent and p53-independent apoptosis during development. J Biol Chem 2010; 285(45): 34493-502.
3. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. Mol Cancer 2015; 14: 48.
4. Long JS, Crighton D, O'Prey J, Mackay G, Zheng L, Palmer TM, et al. Extracellular adenosine sensing-a metabolic cell death priming mechanism downstream of p53. Mol Cell 2013; 50(3): 394-406.
5. Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG, Jacobson KA. A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. Purinergic Signal 2013; 9(2): 271-80.
6. Fishman P, Bar-Yehuda S, Synowitz M, Powell JD, Klotz KN, Gessi S, et al. Adenosine receptors and cancer. Handb Exp Pharmacol 2009; (193): 399-441.
7. Aherne CM, Kewley EM, Eltzschig HK. The resurgence of A2B adenosine receptor signaling. Biochim Biophys Acta 2011; 1808(5): 1329-39.
8. Williams M, Jarvis MF. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. Biochem Pharmacol 2000; 59(10): 1173-85.
9. Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacol Rev 2006; 58(1): 58-86.
10. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci 2007; 64(12): 1471-83.
11. Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG, et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. Pharmacol Ther 2003; 100(1): 31-48.
12. Oosterwijk E, Rathmell WK, Junker K, Brannon AR, Pouliot F, Finley DS, et al. Basic research in kidney cancer. Eur Urol 2011; 60(4): 622-33.
13. Nylander S, Femia EA, Scavone M, Berntsson P, Asztely AK, Nelander K, et al. Ticagrelor inhibits human platelet aggregation via adenosine in addition to P2Y12 antagonism. J Thromb Haemost 2013; 11(10): 1867-76.
14. Hua X, Chason KD, Jania C, Acosta T, Ledent C, Tilley SL. Gs-coupled adenosine receptors differentially limit antigen-induced mast cell activation. J Pharmacol Exp Ther 2013; 344(2): 426-35.
15. Wei CJ, Li W, Chen JF. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. Biochim Biophys Acta 2011; 1808(5): 1358-79.
16. Giorgi I, Nieri P. Adenosine A1 modulators: A patent update (2008 to present). Expert Opin Ther Pat 2013; 23(9): 1109-21.
17. Kumar V, Sharma A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. Eur J Pharmacol 2009; 616(1-3): 7-15.
18. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz

KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev 2001; 53(4): 527-52.
19. Ahsan MK, Mehal WZ. Activation of adenosine receptor A2A increases HSC proliferation and inhibits death and senescence by down-regulation of p53 and Rb. Front Pharmacol 2014; 5: 69.
20. Nogi Y, Kanno T, Nakano T, Fujita Y, Tabata C, Fukuoka K, et al. AMP converted from intracellularly transported adenosine upregulates p53 expression to induce malignant pleural mesothelioma cell apoptosis. Cell Physiol Biochem 2012; 30(1): 61-74.
21. Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, Tabata C, Fukuoka K, Nakano T, et al. A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. Cell Physiol Biochem 2012; 30(1): 210-20.
22. Yaguchi T, Nakano T, Gotoh A, Nishizaki T. Adenosine promotes GATA-2-regulated p53 gene transcription to induce HepG2 cell apoptosis. Cell Physiol Biochem 2011; 28(4): 761-70.
23. Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, et al. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. Circ Res 2002; 90(5): 531-8.
24. Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, et al. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. Circ Res 1999; 85(8): 699-706.
25. Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA. Adenosine receptors and cancer. Biochim Biophys Acta 2011; 1808(5): 1400-12.

DOI: 10.22122/jims.v36i466.8874 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 466, 2nd Week, April 2018**

Received: 26.09.2017 Accepted: 07.12.2017 Published: 28.03.2018

Evaluation of the Effects A2B Adenosine Receptor-Agonist (BAY 60–6583) in Induction of Apoptosis in ACHN Renal Cancer Cell Line

Abdol-Vahab Shafiee[1], Mohammadreza Sharifi[2]

Original Article

Abstract

Background: A2B adenosine receptor (A2BAR) is member of the family of seven transmembrane G protein coupled receptor that are activated in high concentration of extracellular adenosine that occur in certain pathophysiological conditions. Activation of the A2B adenosine receptor in tumor cell line limits or promotes tumor growth. In current study, we investigated the role of A2B adenosine receptor-agonist in apoptosis induction in ACHN renal cancer cell line.

Methods: ACHN renal cancer cell line was selected to investigate the effect of A2B adenosine receptor-agonist (BAY 60-6583) on apoptosis. The cells were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (10% FBS and 1% penicillin/streptomycin). Cell viability and apoptosis were evaluated using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and Annexin V/propidium iodide (PI), respectively.

Findings: Based on MTT assay, treated samples with 50, 100 and 200 µmol of BAY 60-6583 had approximately 50% viability after 48 hours. In addition, based on Annexin V/propidium iodide test, 50 and 100 µmol concentration of BAY 60-658 induced the most apoptosis after 48 hours.

Conclusion: According to the results, it can be concluded that BAY 60-6583 induces apoptosis in ACHN cell line with A2B adenosine receptor stimulation, therefore the A2B adenosine receptor-agonists can be used as agent that inhibit cancer growth.

Keywords: Adenosine, A2B adenosine receptor, BAY 60–6583, Apoptosis and kidney cancer

Citation: Shafiee AV, Sharifi M. **Evaluation of the Effects A2B Adenosine Receptor-Agonist (BAY 60-6583) in Induction of Apoptosis in ACHN Renal Cancer Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(466): 35-41.

1- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammadreza Sharifi, Email: mo_sharifi@med.mui.ac.ir