جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۸۷، صفحات ۲۰۹ تا ۲۱۵

Original Article

بررسی اثرات دی بنزو -۱۸- کراون-۶ بر کلنی زایی سلولهای مغز قرمز استخوان موش نژاد Balb/C در شرایط in vitro

مسعود مشهدی اکبر بوجار[۱]، کاظم پریور[۲]، عباس شکروی[۳]، مارال مولایی[۴]

[۱] دانشیار، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه تربیت معلم تهران
[۲] استاد،گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران
[۳] استاد, گروه شیمی آلی ، دانشکده شیمی ، دانشگاه تربیت معلم تهران
[۴] کارشناس ارشد ، دانشکده علوم پایه ، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *باتوجه به اثرات بیولوژیکی شناخته شده کراون‌اترها ، انجام تحقیقات گسترده در جهت کاربردی کردن این ترکیبات در صنایع دارویی ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ بر کلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان موش در محیط کشت و مکانیسم احتمالی عملکرد آن بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، از سلول‌های مغز قرمز استخوان موش نژاد Balb/C به عنوان منبع سلول‌های بنیادی خونساز استفاده شد. کشت سلول‌های مغز قرمز استخوان به صورت نیمه‌جامد در حضور غلظت‌های متفاوت کراون‌اتر، cAMP، PO_4H_2Na و PO_4H_2K در شرایط in vitro انجام گرفت.*

یافته‌ها: *اثرات مهاری قابل‌ملاحظه‌ای بر کلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان در تمامی‌غلظت‌های کراون‌اتر مشاهده شد. این اثرات مهاری در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کراون‌اتر به حداکثر رسید و هیچ کلنی در محیط کشت مشاهده نشد. اثرات مهاری ایجاد شده بوسیله کراون اتر در حضور cAMP با غلظت 10×10^{-6} مول، PO4H2Na با غلظت 10×10^{-6} مول و PO4H2K با غلظت 5×10^{-6} تا حدودی بر طرف شد، اما به میزان کنترل فاقد کراون‌اتر نرسید. استفاده از روش HPLC برای تعیین مقدار باقی مانده کراون اتر در محیط کشت مشخص کرد که غلظت کراون‌اتر در محیط کشت در ساعت ششم از شروع کشت به صفر می‌رسد.*

نتیجه‌گیری: *این تحقیق نشان داد که اثر کراون‌اتر در مهار کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان احتمالا از دو طریق کاهش میزان کاتیون‌ها و تغییر در فیزیولوژی غشاء که خود منجر به اختلال در مسیر سیگنالینگ cAMP می‌شود، اعمال می‌شود.*

واژگان کلیدی: *دی بنزو-۱۸-کراون-۶، مغز قرمز استخوان، کلنی زایی.*

مقدمه

انواع سلول‌های خونی از سلولهای بنیادی خونساز موجود در مغز قرمز استخوان بوجود می‌آیند. تکثیر و تمایز این سلول‌های بنیادی مستلزم وجود فاکتورهای رشد خارج سلولی است. این فاکتورها که فاکتورهای تحریک کننده کلنی (CSF) نیز نامیده می‌شوند، در بافت‌های مختلف از جمله ریه تولید شده و پس از انتقال به مناطق خون‌سازی به گیرنده‌های خاصی در سطح سلول‌های هدف متصل شده و مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی را راه‌اندازی می‌کنند که در نهایت منجر به تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شوند (۱). یکی از مسیرهای دخیل

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دکتر مسعود مشهدی اکبر بوجار (**email**: aboojar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۷/۷

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در سیگنالینگ فاکتورهای رشد مسیر Gprotein-cAMP است. در این مسیر اتصال فاکتور رشد به رسپتور، باعث تحریک آنزیم آدنیلات سیکلاز شده که خود منجر به سنتز مقدار زیادی cAMP می‌شود. cAMP به عنوان پیامبر ثانویه عمل کرده و تغییرات گوناگونی را در سلول بوجود می‌آورد (۲). علاوه بر cAMP غلظت یون‌های محیطی مثل Na^+ و K^+ و pH نیز نقش مهمی در اعمال فاکتورهای رشد ایفا می‌کنند (۳).

کراون‌اترها، پلی‌اترهای حلقوی خنثی‌ای هستند که از تعداد متفاوتی واحدهای اتیلن اکسید تشکیل شده‌اند. از نظر ساختاری این ترکیبات دارای یک حفره هیدروفیل داخلی هستند که به وسیله یک حلقه هیدروفوب خارجی احاطه شده است (۴). حفره هیدروفیل داخلی باعث می‌شود که کراون‌اترها کمپلکس‌های محکمی با یون‌های فلزی تشکیل دهند و حلقه هیدروفوب خارجی این توانایی را به آنها می‌دهد که از غشاهای لیپیدی عبور کرده و کاتیونی که با آن کمپلکس شده‌اند را نیز عبور دهند (۶،۵). مطالعات نشان داده که کراون‌اترها و مشتقات آنها دارای اثرات بیولوژیکی متعددی هستند که از جمله آنها می‌توان به اثرات ضد سرطانی (۹-۷)، اثرات سایتوتوکسیک (۱۰) و خاصیت آنتی‌کوکسیدیال (۱۱) اشاره کرد. با این وجود هنوز این مواد هیچ‌گونه استفاده دارویی یا بهداشتی نداشته و انسان با آن مواجه نیست، چرا که انجام این امر نیاز به تلاش و تحقیقات گسترده بخصوص در زمینه تاثیر این مواد بر سلول‌های سالم بدن دارد. این پژوهش نمونه‌ای از این تلاش‌ها برای شناخت بیشتر این ترکیبات و مکانیسم عملشان و کاربردی کردن آنها است.

هدف ما از این تحقیق، بررسی تأثیر ترکیب دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ برکلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان موش در شرایط in vitro، تعیین مؤثرترین غلظت و زمان اثر این ترکیب بر کلنی‌زایی این سلول‌ها، بررسی مکانیسم‌های احتمالی تأثیر این ماده و میانکنش آن با فاکتورهای تحریک کلنی (CSF_S) استخراج شده از محیط کشت پیرامونی بافت ریه موش بود.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی،از موش نژاد Balb/C که نژاد مناسبی برای کشت سلولهای مغز قرمز استخوان است، استفاده شد. موش‌های مورد آزمایش همگی بالغ ۶-۴ هفته‌ای با وزن حدود ۳۰-۲۵ گرم نر یا ماده بودند. مغز قرمز استخوان ران و ساق پای موش‌ها به عنوان منبع سلول‌های بنیادی خونسازمورد استفاده قرار گرفت. کشت بافت ریه موش به عنوان بافت مترشحه فاکتورهای رشد خون‌سازی (CSF_S) (۱۳،۱۲) با توجه به روش‌های به کار گرفته شده توسط **burgess** و همکارانش(۱۴) انجام شد و سپس این فاکتورهای رشد از محیط کشت بافت ریه استخراج گردید. به منظور کشت سلول‌های مغز قرمز استخوان و مشاهده کلنی‌زایی آنها روش کشت نیمه جامد آگار (۱۵) استفاده شد و پس از ۷ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌ها رنگ‌آمیزی و شمارش گردیدند. در موارد زیر از محیط‌های کشت ذکر شده به عنوان کنترل استفاده شد:

برای بررسی اثر کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان، کراون‌اتر در غلظت‌های ۲۰ و۴۰، ۶۰ ، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به محیط‌های کشت سلولهای مغز قرمز استخوان اضافه شد و سپس بقیه مراحل کشت انجام گرفت.

برای بررسی تاثیر پیش انکوباسیون سلول‌های مغز قرمز استخوان با CSFهای استخراج شده از بافت ریه، ابتدا CSF_S به همراه سلول‌های مغز قرمز استخوان برای زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس کراون‌اتر با غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (غلظت مهارکننده کلنی‌زایی) اضافه شد و کشت انجام گرفت.

برای بررسی تأثیر cAMP بر کلنی‌زایی سلول‌هی مغز قرمز استخوان، غلظت‌های $۲/۵x۱۰^{-۶}$، $۵x۱۰^{-۶}$، $۱۰x۱۰^{-۶}$ و $۲۰x۱۰^{-۶}$ مول cAMP در حضور و عدم حضور کراون‌اتر به محیط کشت سلول‌های مغز قرمز استخوان اضافه شدند. در یک آزمایش تکمیلی به منظور بررسی اینکه آیا cAMP می‌تواند به تنهایی و بدون CSFها باعث تحریک کلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان شود یا خیر، این ماده در غیاب کراون‌اتر و CSFها به مجیط‌های کشت اضافه گردید.

در بررسی تأثیر PO_4H_2Na و PO_4H_2K بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان، با توجه به توانایی دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ برای تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سدیم و پتاسیم (۱۷،۱۶،۵)، از فسفات منوسدیک و فسفات منوپتاسیک در آزمایشات استفاده گردید و این دو ماده هر کدام به طور جداگانه در غلظت‌های $۵x۱۰^{-۶}$، $۵x۱۰^{-۶}$ و $۵x۱۰^{-۶}$ مول، در حضور و عدم حضور کراون‌اتر به محیط‌های کشت اضافه شدند.

در بررسی تاثیر همزمان کراون‌اتر، cAMP و فسفات منوسدیک بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان، ابتدا cAMP و PO_4H_2Na با غلظت $۱۰x۱۰^{-۶}$ مول و بدون کراون‌اتر به محیط‌های کشت اضافه گردید. سپس همین غلظت‌های cAMP و PO_4H_2Na به همراه غلظت مهارکننده کلنی‌زایی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کراون‌اتر به محیط کشت سلول‌های مغز قرمز استخوان وارد شد.

برای بررسی تأثیر همزمان کراون‌اتر، cAMP و فسفات منوپتاسیک بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان، نیز مثل مرحله قبل cAMP با غلظت 10×10^{-6} مول همراه با PO_4H_2K با غلظت 5×10^{-6} مول ابتدا در عدم حضور کراون‌اتر و سپس همراه با غلظت مهار کننده کلنی‌زایی کراون‌اتر به محیط‌های کشت اضافه گردید.

برای اندازه‌گیری مقدار باقی مانده کراون‌اتر در محیط کشت سلول‌های مغز قرمز استخوان طی فواصل زمانی یک ساعته از روش HPLC استفاده شد.

در این مطالعه تجربی، هر آزمایش سه بار تکرار گردید و پس ازشمارش کلنی‌ها و بدست آوردن میانگین تعداد کلنی و انحراف معیار، از آنالیز واریانس یک عاملی با تکرار (ANOVA) برای تحلیل آماری استفاده شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS(version11.0) انجام گرفت

یافته‌ها

در بررسی نتایج تأثیر کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان، شمارش تعداد کلنی‌ها در محیط کشت سلولهای مغز قرمز استخوان، نشان دهنده کاهش معنی‌داری در تعداد کلنی‌ها در تمامی غلظت‌های به کار رفته کراون‌اتر نسبت به کنترل بود. این اثرمهاری کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کراون‌اتر به حداکثر رسید و هیچ کلنی در محیط کشت مشاهده نگردید (جدول ۱). به همین دلیل این غلظت به عنوان غلظت مهارکننده کلنی‌زایی در آزمایشات و سنجش‌های بعدی به کار برده شد.

جدول۱- اثر دی‌بنزو۱۸-کراون-۶ بر کلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان موش

غلظت کراون اتر (mg/ml)	۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
میانگین تعداد کلنی در ml	۱۳۵±۱۴*	۹۱±۹	۵۲±۶	۱۱±۲	.	.

*میانگین ± انحراف معیار

در نتایج پیش انکوباسیون سلول‌های مغز قرمز استخوان با CSFها، هنگامی که سلولهای مغز قرمز استخوان برای زمان‌های مختلف پیش از اضافه کردن کراون اتر با CSFها انکوبه شدند، در تمامی کشت‌ها کلنی‌ها ظاهر شدند که البته از نظر آماری میانگین تعداد کلنی‌های بدست آمده در تمام موارد از کنترل کمتر بود. میانگین تعداد کلنی‌ها در ۶ ساعت پیش انکوباسیون به حداکثر رسید و تا ساعت هشتم تقریباً ثابت ماند و تفاوت معنی‌داری بین ساعت ششم و هشتم مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر پیش انکوباسیون سلولهای مغز قرمز استخوان باCSFها

زمان(ساعت)	۰	۲	۴	۶	۸
میانگین تعداد کلنی در ml	۰	۱۲ ±۲*	۲۱ ±۴	۳۹ ±۶	۳۳ ±۵

*میانگین ± انحراف معیار

در آزمایشاتی که غلظت مهار کننده کلنی‌زایی کراون‌اتر همراه با غلظت‌های مختلف cAMP به محیط‌های کشت اضافه شدند، در تمامی غلظت‌های به کار رفته cAMP، کلنی‌ها ظاهر و شمارش شدند. میانگین تعداد کلنی‌ها در غلظت 10×10^{-6} مول cAMP به حداکثر رسید که از نظر آماری از کنترل پایین‌تر بود. با افزایش غلظت cAMP میانگین تعداد کلنی‌ها از نظر آماری به میزان قابل توجهی نسبت به غلظت 10×10^{-6} مول کاهش پیدا کرد (جدول ۳). هنگامی که cAMP با غلظت‌های مختلف و بدون کراون‌اتر به محیط‌های کشت اضافه شد، میانگین تعداد کلنی‌ها در غلظت 10×10^{-6} مول cAMP به حداکثر رسید که به طور معنی‌داری از کنترل بیشتر بود. زمانی که غلظت cAMP به 20×10^{-6} مول رسید، کاهش شدیدی در میانگین تعداد کلنی‌ها مشاهده شد. در آزمایش تکمیلی که cAMP به محیط کشت سلولهای مغز قرمز استخوان فاقد فاکتورهای رشد و بدون حضور کراون‌اتر اضافه شد، هیچ کلنی در محیط‌های کشت دیده نشد (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر همزمان cAMP وکراون اتر بر کلنی زایی سلولهای مغز قرمز استخوان

cAMP(M)	$2/5\times10^{-6}$	5×10^{-6}	10×10^{-6}	20×10^{-6}	۰
در حضور کراون اتر	۱۸±۵*	۶۴±۱۲	۸۱±۱۴	۴۰±۶	۰
بدون کراون اتر	۱۶۱±۱۵	۱۷۲±۱۶	۱۹۸±۱۸	۴۳±۷	۱۰۶±۹
بدون کراون اتر و CSF_s	۰	۰	۰	۰	۰

*میانگین ± انحراف معیار

در مورد نتایج حضور PO_4H_2Na و PO_4H_2K بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان، در غیاب کراون‌اتر تعداد کلنی‌ها در غلظت 10×10^{-6} مول PO_4H_2Na به حداکثر رسید که به

طور معنی‌دار از کنترل بیشتر بود. هنگامی که PO_4H_2Na همراه با غلظت مهار کننده کلنی‌زایی کراون‌اتر به پتریها اضافه شد، در غلظت‌های $۵x۱۰^{-۶}$، $۱۰x۱۰^{-۶}$ و $۲۰x۱۰^{-۶}$ مول PO_4H_2Na کلنی‌ها مشاهده گردیدند. میانگین تعداد کلنی‌ها در غلظت $۱۰x۱۰^{-۶}$ مول PO_4H_2Na به حداکثر رسید که به طور معنی‌دار از کنترل کمتر بود (جدول ۴). میانگین تعداد کلنی‌ها در عدم حضور کراون‌اتر در غلظت $۵x۱۰^{-۶}$ مول PO_4H_2K به حداکثر رسید که به طور معنی‌داری از کنترل بیشتر بود. زمانی که PO_4H_2K همراه با کراون‌اتر به محیط‌های کشت اضافه شد، در غلظت‌های $۵x۱۰^{-۶}$، $۱۰x۱۰^{-۶}$ و $۲۰x۱۰^{-۶}$ مول PO_4H_2K کلنی‌ها ظاهر و شمارش شدند. میانگین تعداد کلنی‌ها در این حالت، در غلظت $۵x۱۰^{-۶}$ مول PO_4H_2K به حداکثر رسید که به طور معنی‌داری از کنترل کمتر بود (جدول ۴).

جدول ۴- اثر حضور فسفات منوسدیک و فسفات منوپتاسیک در حضور و عدم حضور کراون اتر بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان

	PO_4H_2Na		PO_4H_2K	
غلظت فسفات (M)	کراون‌اتر (۸۰ mg/ml)	بدون کراون‌اتر	کراون‌اتر (۸۰ mg/ml)	بدون کراون‌اتر
۰	۰	۱۰۳±۶*	۰	۹۶±۵
$۱۰^{-۶}$	۰	۹۲±۵	۰	۸۸±۶
$۵×۱۰^{-۶}$	۲۱±۴	۱۳۱±۷	۵۹±۷	۱۷۹±۱۰
$۱۰×۱۰^{-۶}$	۷۲±۸	۱۶۳±۹	۳۸±۶	۱۵۴±۹
$۲۰×۱۰^{-۶}$	۱۵±۲	۸۱±۴	۱۷±۳	۱۰۵±۶

*میانگین ± انحراف معیار

در مورد نتایج تأثیر همزمان cAMP، PO_4H_2Na و کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان، در آزمایش اول که cAMP و فسفات منوسدیک در عدم حضور کراون‌اتر به پتریها اضافه شدند، تعداد کلنی‌های بدست آمده به طور معنی‌داری از کنترل بیشتر بود. در آزمایش دوم یعنی هنگامی که cAMP و PO_4H_2K و کراون‌اتر به طور همزمان به پتری‌ها اضافه شدند، تعداد کلنی‌های مشاهده شده در محیط کشت به طور معنی‌داری از کنترل بیشتر بود، اما از تعداد کلنی‌های بدست آمده در آزمایش اول کمتر بود (جدول ۵).

در مورد نتایج تأثیر همزمان cAMP و PO_4H_2K و کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان، هنگامی که cAMP و PO_4H_2K بدون کراون‌اتر به محیط‌های کشت اضافه شد، میانگین تعداد کلنی‌های مشاهده شده به طور معنی‌داری از کنترل بیشتر بود. همچنین زمانی که این دو ماده همراه با کراون‌اتر به پتری‌ها اضافه شدند، میانگین تعداد کلنی‌های بدست آمده به طور معنی‌داری از کنترل بیشتر ولی از تعداد کلنی‌ها در آزمایش اول کمتر بود (جدول ۶).

جدول ۵- تاثیر همزمان فسفات منوسدیک، cAMP و کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان

	cAMP $۱۰×۱۰^{-۶}$M	PO_4H_2Na $۱۰×۱۰^{-۶}$M	کراون اتر ۸۰mg/ml	CSF_s	تعداد کلنی*
آزمایش۱	+	+	-	+	۱۹۱±۱۸
آزمایش۲	+	+	+	+	۱۲۹±۱۱
کنترل	-	-	-	+	۹۷±۸

*میانگین ± انحراف معیار تعداد کلنی در ml

جدول ۶- تاثیر همزمان فسفات منوپتاسیک، cAMP و کراون‌اتر بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان

	cAMP $۱۰×۱۰^{-۶}$M	PO_4H_2Na $۵×۱۰^{-۶}$M	کراون اتر ۸۰mg/ml	CSF_s	تعداد کلنی*
آزمایش۱	+	+	-	+	۲۵۴±۲۵
آزمایش۲	+	+	+	+	۱۴۴±۱۵
کنترل	-	-	-	+	۱۰۹±۱۲

*میانگین ± انحراف معیار تعداد کلنی در ml

اندازه‌گیری مقدار باقیمانده کراون‌اتر در محیط‌های کشت نشان داد که مقدار این ماده در محیط‌های کشت قبل از ساعت ششم به صفر می‌رسد (جدول ۷).

جدول ۷- بررسی مقدار باقی مانده کراون اتر در محیط کشت سلولهای مغزقرمز استخوان

زمان(ساعت)	غلظت کراون اتر در محیط کشت (mg/ml)
۰	۸۰±۲/۴۱
۱	۷۳/۱۷±۲/۰۶
۲	۵۸/۷۲±۱/۴۹
۳	۴۱/۱۲±۱/۳۰
۴	۲۹/۲۰±۱/۰۹
۵	۱۰±۰/۴۱
۶	۰
۷	۰

بحث

وجود فاکتورهای رشد خون‌سازی (CSF_S) نه تنها در بدن موجودات زنده (۲،۱)، بلکه در شرایط in vitro نیز برای تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی خون‌ساز لازم است. صحت این مسئله در آزمایشاتی که ما انجام دادیم نیز تایید شد، به طوری که در

محیط کشت فاقد CSFها هیچ تکثیر و تمایزی در سلول‌های بنیادی مغز قرمز استخوان مشاهده نشد. در این تحقیق مشخص شد که دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ دارای اثر مهاری بر کلنی‌زایی سلولهای مغز قرمز استخوان است که این اثر مهاری وابسته به غلظت بوده و در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیچ کلنی در محیط کشت مشاهده نشد. در تحقیقات گذشته نیز اثرات سمی و سایتوتوکسیک کراون‌اترها بررسی و اثبات شده بود. به طور مثال مشخص شده که کراون‌اترها باعث آسیب‌های اکسیداتیو در کشت بافت ریه موش (۱۸) و کشت سلول‌های WI38 (۱۹) می‌شوند. هم‌چنین این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌کوکسیدیال در کشت بافت کلیه جوجه (۱۱) و اثر سایتوتوکسیک در کشت سلولهای V79 هامستر چینی (۱۰) می‌باشند. اثرات ضد سرطانی نیز برای گروهی از مشتقات کراون‌اترها گزارش شده است (۹-۷). مطالعات متعددی بیانگر این مطلب است که کراون‌اترها می‌توانند به تنهایی یا پس از کمپلکس شدن با کاتیون‌ها از غشاهای سلولی عبور کرده و در نتیجه باعث تغییراتی در فیزیولوژی غشاء و نقل و انتقال یون‌ها بشوند (۶). برای مثال می‌توان به توانایی دی بنزو-۱۸-کراون-۶ در افزایش نفوذپذیری غشاء (۵) و تاثیر ۱۸-کراون-۶ بر هدایت کانال‌های α- همولیزین (۲۰) اشاره کرد. هم‌چنین این ترکیبات باعث کاهش نفوذپذیری Na^+ و K^+ در گره رانویه (۲۲،۲۱) و مسدود شدن کانال‌های سدیمی در غشاءهای سلولی ماهیچه صاف (۲۴،۲۳) می گردند. در این تحقیق، غلظت کراون‌اتردر محیطهای کشت قبل از ساعت ششم به صفر رسید، در نتیجه این طور به نظر می‌رسد که این ترکیب پس از کمپلکس شدن با یون مربوطه به غشاء متصل یا از آن عبور کرده است. در آزمایشات ما اضافه کردن Na^+ و K^+ توانست تا حدودی اثر مهاری کراون‌اتر را خنثی کند. بنابراین با توجه به نقش فاکتورهای رشد در فعالیت کانال‌های یونی و تغییر pH سیتوزولی (۳)، می‌توان چنین استنباط کرد که کراون‌اتر احتمالاً با ایجاد کمپلکس با یونها و اثر بر نقل و انتقال آنها و متعاقباً مختل کردن سیستم‌های نقل و انتقال این کاتیون‌ها مثل آنتی‌پورتر Na^+/H^+، پمپ یونی Na^+/K^+ ATPase و کانالهای سدیم و پتاسیم باعث اختلال در عملکرد CSFها می‌شود. شبیه بودن کراون‌اترها به آنتی‌بیوتیک‌های یونوفور که باعث اختلال در تبادل یونهای فلزی می‌شوند، این نتایج را تایید می‌کند (۵). پیش انکوباسیون سلول‌های مغز قرمز استخوان با CSFها بیانگر این مطلب بود که دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ حتی پس از تأثیر CSFها بر سلولهای مغز قرمز استخوان نیز می‌تواند تا حدودی اثر مهاری خود را بروز دهد. نتایج آزمایشاتی که به منظور بررسی تأثیر cAMP بر مهار ایجاد شده توسط کراون اتر انجام شد نشان دادند که افزودن cAMP در غلظت‌های نسبتاً کم می‌تواند تا حدودی اثر مهاری دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ را خنثی کند. با توجه به اینکه cAMP یکی از مولکول‌های دخیل در انتقال سیگنال ایجاد شده توسط CSFها است، این احتمال وجود دارد که اثر مهاری دی‌بنزو-۱۸کراون-۶ به علت توانایی آن برای انتقال کاتیون‌ها یا عبور خودش به تنهایی از خلال غشاء و ایجاد تغییراتی در فیزیولوژی غشاء، در نتیجه کم شدن فعالیت آدنیلات سیکلاز و کاهش میزان cAMP باشد. بر این اساس ما نتیجه گرفتیم که cAMP اضافه شده به محیط کشت، کاهش ایجاد شده در میزان cAMP را جبران کرده است. اما اضافه کردن مقادیر زیاد cAMP خود باعث اختلال در مسیرهای درون سلولی و در نتیجه کاهش رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود که می‌تواند عامل کاهش نقش جبرانی این ماده در رفع مهار ایجاد شده به وسیله کراون‌اتر باشد. در تحقیقی که بر روی ماکروفاژهای جدا شده از مغز قرمز استخوان موش انجام گرفت، مشخص شد که عوامل افزایش دهنده غلظت cAMP درون سلولی باعث مهار سنتز DNA تحریک شده توسط IL-3، GM-CSF و M-CSF می‌گردند (۲۵). پژوهش‌هایی که توسط Arenaz و همکارانش بر روی سلول‌های تخمدان هامستر چینی (۲۶) و سالمونلا تیفی موریوم (۲۷) انجام شد، این احتمال را که کراون‌اترها دارای خاصیت ژنوتوکسیک هستند، رد کرد. در پایان آزمایشاتی که براساس میانکنش همزمان ۳ عامل کراون‌اتر، کاتیون و cAMP انجام شد، نشان داد که افزودن توأم cAMP با Na^+ و K^+ باعث برطرف شدن کامل اثر مهاری کراون اتر می‌شود. با توجه به اینکه اضافه کردن cAMP و کاتیون‌ها به طور جداگانه و به تنهایی نتوانستند به طور کامل اثر مهاری کراون‌اتر را از بین ببرند و با در نظر گرفتن اینکه اضافه کردن همزمان cAMP و کاتیونها باعث از بین رفتن کامل اثر مهاری کراون اتر شد، ما اینطور نتیجه گرفتیم که اثرات مهاری دی‌بنزو-۱۸-کراون-۶ احتمالاً با دو عامل در ارتباط است:

۱- ایجاد کمپلکس با کاتیونها و اثر بر نقل و انتقال آنها از خلال غشاء که متعاقباً منجر به مختل شدن سیستم‌های نقل و انتقال یونها مثل آنتی پورتر Na^+/H^+، کانال‌های سدیم یا پتاسیم و پمپ یونی Na^+/K^+ ATPase می‌شود.

۲- تغییر در فیزیولوژی غشاء و کم کردن فعالیت آدنیلات‌سیکلاز که منجر به کم شدن میزان cAMP و در نهایتً اختلال در سیگنالینگ CSFها خواهد شد.

در این تحقیق مشخص شد که دی‌بنزو-۱۸-کراون مانع کلونی‌زایی سلول‌های مغز قرمز استخوان موش می‌گردد. این اثر وابسته به توانایی این ماده برای ایجاد کمپلکس با کاتیون‌ها، عبور از غشا سلولها، اثر بر نقل و انتقال کاتیون‌ها و اختلال در فیزیولوژی غشا است. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق امید است که بتوان در آینده از دی بنزو-۱۸-کراون-۶ در جهت انتقال یونهای سدیم و پتاسیم یا تغییر فیزیولوژی غشاء در سلولهای سرطانی و در نتیجه از بین بردن آنها استفاده کرد. هم‌چنین نظر به اینکه این ماده توانایی عبور از غشاء را دارد، می‌توان از آن برای انتقال برخی داروهای کوچک مولکول از عرض غشاء سلولهای هدف به گونه‌ای که اثرات جانبی دارو به حداقل برسد، بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه اعضا محترم گروه‌های زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و دانشگاه تربیت معلم تهران که امکان اجرای این تحقیق را فراهم کردند، سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH, editors. Essential haematology, 4th edition. Philadelphia: Blackwell Science, Ltd 2001. p.1-11.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular biology of the cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
3. Pouyssegur J, Chaimbard JC, Franchi A, Allemain GL, Paris S, Van Obbcrghen-Schiling E, editors. Growth factor activation of the Na+/H+ antiporter control growth of fibroblasts by regulating intracellular pH., Cancer Cells3/Growth Factors and Transformation. Philadelphia: Cold Spring Harbor Laboratory; 1985. p. 409.
4. Freemantle M. Crowning achievement. Sci Technol 2003;81:29-33.
5. Naumowicz M, Petelska AD, Figaszewski A. The effect of the presence of crown ether on ion transport across the lipid bilayer. Cell Mol Biol Lett 2003;8:383-89.
6. Vijayvergiya V, Ghosh P, Bera AK, Das S. Bis [(benzo-15-crown-5)-15ymethyl] pimelate forms ion channels in planar lipid bilayer: a novel modle ion channel. **:** Physiol Chem Phys Med NMR 1999;31:93-102.
7. Rotello VM. Crown ether-peptide construct selectively kills cancer cells. Chem Biol Drug Des 2008;72:1-2.
8. Karawajew L, Glibin EN, Maleev VY, Czerwoy G, Drken B, Davies DB, et al. Role of crown - like chains in the biological substituted phenoxazone drugs. Anticancer Drug Des 2000;15:331-38.
9. McPhee MM, Kerwin SM. Synthesis, DNA cleavage, and cytotoxicity of a series of bis (propargylic) sulfone crown ethers. Bioorg Med Chem 2001;9:2809-18.
10. Arenaz P, Bitticks L, Pannell KH, Garcia S. Genotoxic potential of crown ethers in mammalian cells: induction of sister-chromatid exchanges. Mut Res 1992;280:109-15.
11. Brown GR, Foubister AJ. Anticoccidial activity of crown polyethers. J Med Chem 1983;26:590-92.
12. Neumeier R, Maurer HR. Bovine lung conditioned medium as a source of both human and murine colony-stimulating factor. Exp Hematol 1980;8:728-36.
13. Sheridan JW, Metcalf D. Purification of mouse lung-conditined medium colony stimulating factor (CSF). Proc Soc Exp Biol Med 1974;146:218-21.
14. Burgess AW, Kamakaris J, Metcalf D. Purification and properties of colony-stimulating factors from mouse lung-conditioned medium. J Boil Chem 1977;252:1998-2003.
15. Bradly TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 1966;44:287-300.
16. Katusta S, Ito Y, Tekada Y. Stabilities in nitromethane of alkali metal ion complexes with dibenzo-18-crown-6 and dibenzo-24-crown-8and their transfer from nitromethane to other polar solvents. Inorganic chimica Acta 2003;357:541-47.
17. Nishi N, Murakami H, Imakura S, Kakiuchi T. Faciliated transfer of alkali-Metal cations by Dibenzo-18-crown-6 across the electrochemically polarized Interface between an aqueous solution and a hydrophobic room-temperature Ionic Liquid. Anal Chem 2006;6:797-799.
18. Mashhadi Akbar Boojar M, Goodarzi F. Oxidative response of rat lung tissue after crown ethers exposure and the effects of alpha-tocopheral treatment. Clinica Chimica Acta 2006;370:158-64.

19. Mashhadi Akbar Boojar M, Goodarzi F. Cytotoxicity and the levels of oxidative stress parameters in WI38 cells following 2 macrocyclic crown ethers treatment. Clinica Chimica Acta 2005;364:321-27.

20. Sergey MB, Krasilnikov OV, Yuldasheva LN, Berezhkovskii AM, Rodrigues CG. Field-dependent effect of crown ether (18-crown-6) on ionic conductance of alpha-hemolysin channels. Biophys J 2004;87:3162-71.

21. Arhem P, Frankenhaeuser B, Kristbjarnarson H. Inactivation of potassium transport system of myelinated nerve in the presence of a cyclic ionophore. Acta Physiol Scand 1982;114:593-600.

22. Kristbjarnarson H, Arhem P. The effect of crown ethers on ionic currents in myelinated nerve fibers from Xenopus laevis. Acta Physiol Scand 1985;123:261-68.

23. Kolbeck RC, Hendry LB, Bransome ED, Speri WA. Crown ethers which influence cardiac and respiratory muscle contractility. Experientia 1984;40:727-31.

24. Kolbeck RC. Lonotropic influence of macrocyclic polyethers on tracheal smooth muscle. Pharmacol Biochem Behav 1992;42:645-50.

25. Vario G, Argyriou S, Bordun M, Whitty G, Hamilton JA. Inhibition of the signaling pathways for macrophage proliferation by cyclic AMP lack of effect on early responses to colony stimulating factor-l. J Biol Chem 1990;265:2692-701.

26. Arenaz P, Bitticks L, Pannell KH, Garcia S. Genotoxic potential of crown ethers in mammalian cells: induction of sister-chromatid exchanges. Mut Res 1992;280:109-15.

27. Arenaz P, Bitticks L, Pannell K, Garcia S. Genotoxic potential of crown ethers in Salmonella typhimoriurn. Mutagenesis 1989;4:437-38.