TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بهمن ۱۳۹۵، دوره ۷۴، شماره ۱۱، صفحه‌های ۷۶۳ تا ۷۷۰ مقاله اصیل

اثرات سیکلوفسفامید بر تکثیر و بقای سلول‌های رده سرطانی بدخیم HN5 و مقایسه آن با سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی

الهام حویزی*
طیبه محمدی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۶ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

زمینه و هدف: سرطان از مهمترین عوامل مرگ‌ومیر در دنیا می‌باشد و بنابراین هرگونه مطالعه در زمینه بیولوژی سرطان از اهمیت خاصی برخوردار است. سرطان‌های سروگردن ۵-۲٪ سرطان‌های بدن را در بر می‌گیرند که در برخی کشورها حتی بالاتر است. القای آپوپتوز یکی از مناسب‌ترین درمان‌های سرطان است. سیکلوفسفامید، ماده آلکیله‌کننده‌ای است که باعث توقف تکثیر DNA و در نتیجه توقف تکثیر و بقای سلولی می‌گردد. بنابراین سیکلوفسفامید برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه مقایسه اثر ضد تکثیری سیکلوفسفامید بر بقای سلول‌های HN5 و فیبروبلاست‌ها بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در آزمایشگاه سلولی تکوینی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز در بهار ۱۳۹۵ انجام گرفت و سلول‌های HN5 و فیبروبلاست‌های جنینی در محیط Dulbecco's modi ed Eagle's medium (DMEM) حاوی ۱۰٪ سرم و پنیسیلین/استرپتومایسین در ۳۷ درجه کشت و رقت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر بقای سلول‌ها با روش MTT بررسی شد. رنگ DAPI برای تعیین هسته‌های پیکنوتیک در سلول‌های آپوپتوزی انجام گرفت. فیبروبلاست‌ها بر اساس روش‌های استاندارد از جنین‌های ۱۳ روزه موش‌های نژاد NMRI استخراج شدند. در این مطالعه سلول‌های HN5 و فیبروبلاست‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در معرض سیکلوفسفامید قرار گرفتند.

یافته‌ها: غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر مرگ سلول‌های HN5 و فیبروبلاستی اثرگذارند. غلظت ۱ µg/ml بیشترین درصد کاهش حیات سلولی را در روز سوم با میانگین ۵۰٪ و با P<۰/۰۰۱ در بر داشت. به‌طور جالبی سیکلوفسفامید در غلظت‌های پایین‌تر اثرات توکسیک بیشتری در مقایسه با غلظت‌های بالاتر داشت.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی سیکوفسفامید اثرات سیتوتوکسیک پایینی بر سلول‌ها داشته اما به‌طور معناداری اثرات سیتوتوکسیک آن بر سلول‌های HN5 بیشتر از فیبروبلاست‌ها بود. این نتایج نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید می‌تواند به‌عنوان عامل ضد سرطان استفاده شود.

کلمات کلیدی: سرطان، سیکوفسفامید، بقای سلولی، HN5.

*نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۱۰۴۵
E-mail: e.hoveizi@yahoo.com

مقدمه

یکی از معضلات جامعه بشری در قرن حاضر بیماری سرطان می‌باشد. به‌دلیل آمار بالای مرگ‌ومیر انواع مختلف سرطان، پژوهش‌ها و مطالعات فراوانی در جهت شناسایی و ارایه داروهای مختلف در مورد این بیماری انجام شده است.[1] سرطان‌های سر و گردن که در دهان، لب، بینی، سینوس‌ها، حنجره و گلو بروز می‌کنند. بیش از ۹۰٪ این سرطان‌ها از نوع کارسینومای سلول سنگفرشی هستند که از اپیتلیوم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

منشأ می‌گیرند. راه انتشار این سرطان‌ها به‌صورت کلی از غدد لنفاوی گردن است و بیشتر بدخیم هستند.

همانند سایر سرطان‌ها از سه روش جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی جهت مداوا استفاده می‌شود. چون بیشتر این سرطان‌ها بدخیم هستند و در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند در مجموع پیش‌آگهی بلندمدت بالا نیست. توده‌های خوش‌خیم شامل توده‌های التهابی، توده‌های مادرزادی، توده‌های چربی و غیره می‌باشند. توده‌های بدخیم شامل سرطان‌های مختلف مانند لنفوم، سرطان‌های تیرویید، سرطان‌های غدد بزاقی و غیره هستند. بر اساس آمار در آمریکا سالیانه حدود ۵۵۰۰۰ مورد جدید سرطان سر و گردن تشخیص داده می‌شوند که حدود ۱۳۰۰۰ مورد آن‌ها منجر به مرگ خواهند شد.[۲]

هنوز روند کامل فرآیند شکل‌گیری سرطان شناخته شده نیست ولی عوامل گوناگونی هستند که در سطح سلولی اثر می‌کنند و موجب صدمه ژن‌های کنترل‌کننده سلول می‌شوند که برآیند نهایی عملکرد آن‌ها تکثیر خارج از کنترل سلول‌ها است.[۳]

امروزه بیماری سرطان در جهان به‌شدت در حال گسترش است، افزون بر شیوه زندگی، عوامل خطرآفرین ذاتی در عملکرد اندام‌های بدن خودمان نیز وجود دارد. محصولات جانبی سوخت‌وساز بدن و خطاهایی که در طول همانندسازی DNA رخ می‌دهند در سرطان‌زایی دخیل هستند. متابولیسم هوازی، محصولات جانبی رادیکال‌های اکسیژن تولید می‌کند که جهش‌زا هستند. چندین بیماری متابولیکی ارثی نیز، محصولات جانبی جهش‌زا تولید می‌کنند.[٤]

توجه به مفهوم سلول‌های بنیادی سرطانی در طراحی و آزمایش داروهای جدید سرطان دارای اهمیت است. ازآن‌جا که سلول‌های بنیادی سرطانی باعث رشد و مهاجرت تومور می‌شوند، داروهایی مورد نیاز است که این جمعیت سلولی کوچک در تومور را هدف قرار می‌دهند. بسیاری از داروهای سنتی موجود، در ابتدا پاسخ‌های امیدوارکننده‌ای نشان می‌دهند که با بازگشت دوباره و عود بیماری همراه هستند، ممکن است بتوانند از بازگشت دوباره بیماری جلوگیری کرده و به‌طور واقعی سرطان متاستازی شده را درمان کنند. البته بهترین راه حل، یافتن داروهایی است که سلول‌های بنیادی سرطانی را بدون تأثیر بر سلول‌های بنیادی طبیعی همان بافت، هدف قرار می‌دهند.[۵]

سیکلوفسفامید یک داروی ضد سرطان است که در بدن به یک متابولیت فعال آلکیله‌کننده تبدیل می‌گردد و یک جز اساسی و مهم در بسیاری از ترکیبات دارویی موثر می‌باشد. سیکلوفسفامید به‌راحتی از دستگاه گوارش جذب می‌گردد و از سد خونی مغزی عبور کرده و به‌طور گسترده در بافت‌ها و مایعات بدن توزیع می‌گردد و در کبد به متابولیت‌های فعال تبدیل شده و سرانجام از طریق کلیه‌ها دفع می‌گردد.[٦]

سیکلوفسفامید به گروه داروهای سیتوتوکسیک (آلکیله‌کننده) تعلق دارد که تحت تاثیر آنزیم‌های کبدی به متابولیت‌های فعال فسفرآمید موستارد و آکرلیین تبدیل می‌شود. فسفرآمید موستارد مسئول خواص ضدسرطانی سیکلوفسفامید است اما آکرولیین با تداخل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها و تولید مقدار زیادی رادیکال آزاد اکسیژن دارای خواص موتاژنی است. سیکلوفسفامید دارویی پرمصرف در درمان سرطان است که اولین‌بار در سال ۱۹۵۸ تولید شد و نمونه اولیه آن اکسازافسفرین بدون عمل آلکیله‌کننده مستقیم بود. آن یک پیش‌دارو از غیرموستاردها است که به تغییرات زیستی نیاز دارد تا به متابولیت‌های فعال تبدیل شود.[۷]

مکانیسم اثر این دارو به‌طور عمده ناشی از ایجاد اتصال بین دو رشته مولکولی DNA و شکستن DNA و نیز RNA و همچنین مهار سنتز پروتیین است. اثرات آنتی‌نئوپلاستیکی سیکلوفسفامید مربوط به فسفورآمید موستارد است. درحالی‌که آکرولین از طریق تداخل با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن کرده و مسئول پیدایش اثرات سمی مانند مرگ سلولی، آپوپتوز، تشکیل تومورهای گوناگون و نکروز می‌باشد.[٦و٨]

دو هدفی که در سنتز داروهای شیمی‌درمانی در نظر می‌گیرند این است که دارو علاوه بر اینکه جنبه سایتوتوکسیکی داشته و سلول‌های سرطانی را از بین ببرد بر سلول‌های سالم فرد بیمار نیز کمترین تأثیر را داشته باشد. یکی از متداول‌ترین داروهایی که به‌طور گسترده در شیمی‌درمانی استفاده می‌شود سیس‌پلاتین است ولی برای سلول‌های سالم فرد بیمار به‌ویژه کلیه سمیت ایجاد می‌کند.

کاهش اثرات سمی داروهای شیمیایی بر سلول‌های سالم یکی از اهداف دانشمندان برای سنتز داروهای جدید و جایگزین کردن آن‌ها با داروهای پیشین است تا ضمن حفظ و افزایش اثر سایتوتوکسیتی بر سلول‌های سرطانی، کمترین تأثیر را نیز بر دیگر بخش‌های سالم فرد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

بیمار گذاشته و روند بهبود را تسریع نماید.[۹]

در این پژوهش به بررسی خاصیت ضد سرطانی غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر میزان تکثیر و بقای رده سلولی سرطانی HN5 و مقایسه آن با تاثیر بر سلول‌های غیرسرطانی فیبروبلاست جنینی پرداخته شده است.

روش بررسی

این آزمایش به‌صورت تجربی بر روی سلول‌های سرطانی سر و گردن، رده HN5 و سلول‌های غیرسرطانی فیبروبلاست‌های جنینی در آزمایشگاه سلولی تکوینی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز در بهار ۱۳۹۵ و با رعایت کامل آیین‌نامه‌های اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. جامعه پژوهش رده سلولی سرطانی HN5 تهیه‌شده از انستیتو پاستور و سلول‌های فیبروبلاست‌های جنینی استخراج شده از جنین‌های ۱۳ روزه موش‌های نژاد NMRI بود. متغیرهای مطالعه دوز و زمان مصرف سیکلوفسفامید بود. بر اساس استاندارد برای گروه کنترل و ماده‌ی ارزیابی‌شونده حداقل سه چاهک باید تهیه شود که در پژوهش کنونی از شش چاهک استفاده شد.

سیکلوفسفامید (Endoxan, Baxter, USA) با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/ml در محیط کشت تهیه شد. سپس نمونه‌هایی با غلظت‌های مختلف جهت حذف آلودگی‌های باکتریایی و قارچی با فیلتر ۰/۲۲ µm فیلتر شد و در شرایط دمایی مناسب نگهداری شدند. سلول‌های سرطانی رده سلولی HN5 از موسسه پاستور تهران خریداری شد. سلول‌های HN5 در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) با ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) در انکوباتور (Galaxy, USA) حاوی ۵٪ CO2 با ۹۰٪ رطوبت و در دمای ۳۷ °C نگهداری شد. پس از اینکه حدود ۸۰٪ فلاسک پر شد سلول‌ها پاساژ و حدود 5×10^4 cells/cm^2 سلول در ظروف کشت سلول ۲۴ خانه در محیط معمول قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید تیمار و به‌مدت سه روز در این شرایط نگهداری شدند.

در این پژوهش از موش‌های نژاد NMRI به این منظور استفاده شد (خریداری‌شده از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز) و تمامی ملاحظات اخلاقی در ارتباط با کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. موش‌های باردار را در روز ۱۳ بارداری به طریق نخاعی کشته و جنین‌ها از رحم خارج شد و در یک ظرف حاوی PBS (Sigma, USA) قرار داده شد و سپس کیسه زرده، آمنیون و جفت از آن‌ها جدا شد. با استفاده از یک جفت پنس ظریف سر قطع و کبد خارج گردید. تعداد ۸-۵ جنین قطعه‌قطعه شده و با Trypsin/EDTA (Gibco, USA) هضم آنزیمی انجام گرفت. جنین‌ها به‌همراه آنزیم به‌مدت ۱۵ دقیقه درون انکوباتور انکوبه شد. برای شستن تریپسین از بافت، لوله به‌مدت دو دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه (RPM) سانتریفوژ و محیط رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها به یک فلاسک بزرگ T75 منتقل شد و ۲۰ ml محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم به آن اضافه گردید و فلاسک به انکوباتور منتقل شد. روز بعد تعویض محیط انجام شد تا ضایعات سلولی و قطعاتی که کف ظرف نچسبیده‌اند حذف شوند. به‌طور تقریبی مجموعه‌های سلولی به‌سرعت به فلاسک چسبیده و طی ۳-۲ روز سلول‌های فیبروبلاستی بیشتر ظرف را پوشاندند و تا روز سوم، کف ظرف به‌طور کامل پوشیده شد.

میزان بقای سلول‌های کشت‌داده‌شده با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید با استفاده از 2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)3-(4, 5-di-methylthiazol- با غلظت ۵ mg/ml ارزیابی شد.

در این مطالعه دو گروه سلولی شامل سلول‌های سرطانی HN5 و سلول‌های غیرسرطانی فیبروبلاستی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید قرار گرفتند و برای هر گروه سلول‌های بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

تست MTT در روزهای یک، دو و سه پس از قرار دادن سلول‌های سرطانی HN5 و در روز اول پس از قرار دادن سلول‌های فیبروبلاستی در معرض غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید انجام شد به‌این‌صورت که در زمان مناسب پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۳۰۰ ml محیط تازه حاوی ۳۰ µl از محلول MTT اضافه شد، پس از سه تا چهار ساعت انکوباسیون با دمای ۳۷ °C محلول MTT خارج و به هر خانه ۲۰۰ µl (Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Merck, USA, 100%) اضافه و سپس جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ با استفاده از دستگاه الیزاریدر خوانده شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

برای بررسی مرگ سلولی، سلول‌های HN5 به‌مدت ٢٤ ساعت با محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید کشت شدند و سپس محیط رویی سلول‌ها خارج و سلول‌ها با PBS شسته و سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ٤٪ تثبیت و با استفاده از رنگ 300 nM, DAPI (Sigma, USA) رنگ‌آمیزی شد.

برای شمارش سلولی در هر روز خاص سلول‌های ۲۰ منطقه (با ابعاد ۱ mm^2) به‌صورت اتفاقی انتخاب و شمارش و میانگین سلولی به‌دست آمد. سلول‌های آپوپتوز شده با مورفولوژی هسته چروکیده، قطعه‌قطعه شده و با شدت فلورسانس بالا به‌عنوان سلول‌های آپوپتوز شده گزارش شد.

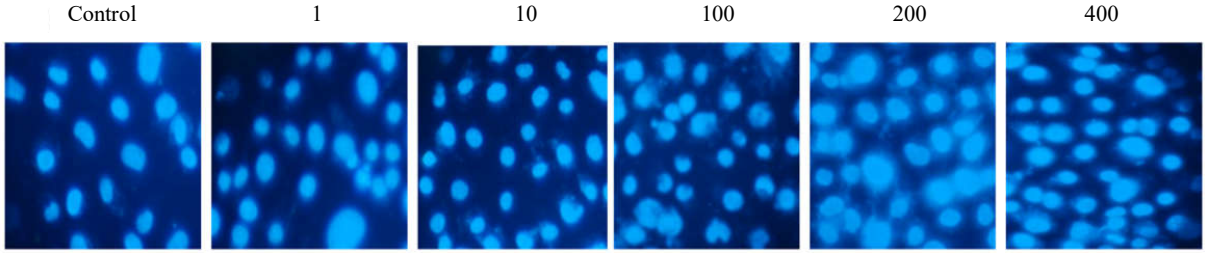
نتایج با استفاده از SPSS software, version 12 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون‌های آماری two-way analysis of variance (ANOVA) به‌صورت (Mean±SE) مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) انجام و تفاوت‌ها با P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات مورفولوژی سلول‌های HN5 با استفاده از میکروسکوپ نوری و همچنین رنگ‌آمیزی فلئورسنت DAPI بررسی شد. سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید، دچار تغییرات متفاوتی شدند به‌طوری‌که در غلظت‌های پایین‌تر اثر توکسیک بیشتری مانند چروکیدگی، گرد شدن، قطعه‌قطعه‌شدن کروماتین، برآمدن غشا و همچنین پررنگ شدن رنگ آبی فلورسنت در مورد سلول‌های آسیب‌دیده رخ داد درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر سیکلوفسفامید اثرات توکسیک کمتری مشاهده شد (شکل ۱).

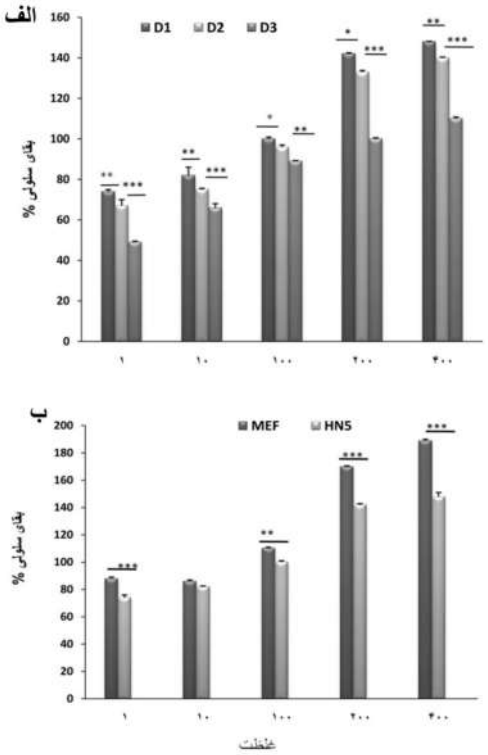
برای بررسی تأثیر سیتوتوکسیته غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر سلول‌های HN5 و فیبروبلاستی، از روش MTT assay استفاده شد. نمودار ۱ نشان‌دهنده تأثیر سیکلوفسفامید با غلظت‌های مختلف بر رده سلولی سرطانی HN5 در سه بازه زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت و مقایسه بین سلول‌های سرطانی HN5 و سلول‌های فیبروبلاستی پس از ٢٤ ساعت می‌باشد.

برای کنترل از کشت سلول هم زمانی استفاده شد که هیچ تیماری روی آن صورت نگرفته بود. نتایج نشان داد که سیکلوفسفامید با غلظت‌های بالاتر تاثیر سیتوتوکسیک چشمگیری بر سلول‌ها نداشته اما در غلظت‌های پایین باعث کاهش بقای سلولی در هر سه بازه زمانی شده است. البته در بازه زمانی ۷۲ ساعت کاهش بقای سلولی نسبت به دو زمان دیگر شدیدتر بوده و از نظر آماری معنادار بود. این نتایج نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید در غلظت‌های پایین باعث القای فرآیند آپوپتوز در سلول‌های HN5 و سلول‌های فیبروبلاستی می‌شود و همچنین به‌طور معناداری اثرات سیتوتوکسیک سیکلوفسفامید بر رده سرطانی HN5 بیشتر از رده سلول‌های فیبروبلاستی بوده است (جداول ۱ و ۲).



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ معکوس و رنگ‌آمیزی فلوئورسنت با رنگ DAPI برای سلول‌های رده سرطانی HN5 در مواجه با سیکلوفسفامید با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ µg/ml

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]



نمودار ۱: بررسی بقای سلول‌های HN5 و سلول‌های فیبروبلاستی با روش MTT.
الف- نمودار بقای سلول‌های HN5 در مواجه با سیکلوفسفامید با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ µg/ml در روزهای ۱ (D1)، ۲ (D2) و ۳ (D3) پس از تیمار.
ب- نمودار مقایسه بقای سلول‌های HN5 و سلول‌های فیبروبلاستی در مواجه با سیکلوفسفامید با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ µg/ml پس از ۲٤ ساعت تیمار.

جدول ۱: مقایسه میزان بقای سلول‌های HN5 کشت داده شده با استفاده از روش MTT در روزهای ۱، ۲ و ۷ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید

گروه‌های آزمایش (غلظت)	درصد بقا		
	روز ۱ پس از کشت	روز ۲ پس از کشت	روز ۳ پس از کشت
۱ µg/ml	۷٤±۱	٦۷±۲	٤۹±۳
۱۰ µg/ml	۸۲±۲	۷۵±۱	٦٦±۲
۱۰۰ µg/ml	۱۰۰±۳	۹٦±۱	۸۹±۳
۲۰۰ µg/ml	۱٤۲±٤	۱۳۳±٤	۱۰۰±۱
٤۰۰ µg/ml	۱٤۸±۲	۱٤۰±۲	۱۱۰±۲

(Mean± SE)

جدول ۲: مقایسه میزان بقای سلول‌های HN5 و سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده با استفاده از روش MTT در روز ۱ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید

گروه‌های آزمایش (غلظت)	درصد بقا روز ۱ پس از کشت	
	سلول‌های HN5	سلول‌های فیبروبلاست
۱ µg/ml	۷٤±۱	۸۸±۲
۱۰ µg/ml	۸۲±۲	۸٦±۲
۱۰۰ µg/ml	۱۰۰±۳	۱۱۰±۱
۲۰۰ µg/ml	۱٤۲±٤	۱۸۰±۱
٤۰۰ µg/ml	۱٤۸±۲	۱۸۹±۲

(Mean±SE)

بحث

یافته‌های پژوهش کنونی نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید سبب القای مرگ سلولی می‌گردد. همچنان‌که Zhang و همکاران اشاره کردند که سیکلوفسفامید به‌همراه برخی تغییرات در مسیرهای متابولیکی گلوکز در سلول‌های سرطانی پستان منجر به افزایش مرگ سلولی در این سلول‌های سرطانی می‌گردد.[۱۰] افزون بر این Trebunova و همکاران به بررسی اثر هم‌زمان سیکلوفسفامید و چند داروی دیگر بر رده سلول‌های سرطان سینه انسانی (سلول‌های MCF-7) پرداختند و اعلام کردند که سیکلوفسفامید با غلظت معین و به‌همراه داروهای دیگر به‌صورت موثری سبب کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های سرطان پستان در انسان می‌گردد.[۱۱] همچنین Bakirel و همکاران به بررسی اثر آپوپتوزی سیکلوفسفامید به‌همراه کورکامین بر رده سرطانی سلول‌های سرطانی رکتوم موش پرداختند و اعلام کردند که سیکلوفسفامید دارای خواص ضد سرطانی بوده و سبب القای آپوپتوز در این سلول‌های سرطانی می‌گردد.[۱۲]

نتایج پژوهش کنونی نشان داد که سیکلوفسفامید اثرات متفاوتی بر سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی دارد. به‌نظر می‌رسد به‌دلیل مواجهه سلول‌های سرطانی با تنش‌های مختلف، بین سلول‌های سرطانی و سالم تفاوت اساسی در وضعیت فعال‌سازی کاسپاز، وجود دارد. تفاوت در این است که سلول‌های سرطانی دارای کاسپازهای فعال‌شده‌ای هستند که به‌واسطه‌ی افزایش بیان *IAP*ها (مهارکننده‌های

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

آپوپتوزی)، مهار می‌گردند اما سلول‌های سالم نیازمند شکست پروتئولیتیکی پیش کاسپازهای کاملاً غیرفعال هستند. بنابراین، سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم، در راه‌اندازی پاسخ آپوپتوزی در مرحله‌ی جلوتری قرار دارند. در حمایت از این مطلب کاسپاز سه پردازش شده در سلول‌های توموری شناسایی شده است. در فرآیند آپوپتوز در سلول‌های طبیعی دروزوفیلا، کاسپازهای فعال‌شده توسط *IAP* ها مهار شده و القای آپوپتوز، نیازمند رهایی از مهار *IAP* است، سلول‌های توموری در این ویژگی با سلول‌های طبیعی دروزوفیلا، وجه مشترک دارند. به‌عبارت دیگر پیام‌های آپوپتوزی، پردازش پیش کاسپازها را در سلول‌های سالم تحریک می‌کنند، درحالی‌که پیام‌های آپوپتوزی در سلول سرطانی، توقف اثر مهاری *IAP* بر کاسپازهای پردازش‌شده را فعال می‌کنند.[۱۳و۱۴]

در پژوهش کنونی بررسی هسته با رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که سیکلوفسفامید به‌واسطه ایجاد آسیب در کروماتین سبب ایجاد آپوپتوز می‌گردد همچنان که مطالعات پیشین نیز تاییدکننده این مهم می‌باشند. به‌طوری‌که Tsai-turton و همکاران در مطالعه‌ای اعلام کردند که سیکلوفسفامید افزون بر آسیب DNA سلول، باعث القای استرس اکسیداتیو نیز می‌شود، سیکلوفسفامید باعث تخلیه گلوتاتیون در سلول‌های توموری گرانولوزای انسان می‌شود که منجر به مرگ آپوپتیک این سلول‌ها می‌گردد.[۱۵]

همچنین Chakraborty و همکاران اعلام کردند که سیکلوفسفامید به‌همراه سایر داروها می‌تواند با ایجاد آسیب در DNA سلول‌های سرطانی سبب القای مرگ این سلول‌ها گردد و پیشنهاد کردند این عامل احتمالا به‌واسطه القای استرس اکسیداتیو می‌باشد که سبب آزادسازی ROS و فعالیت P53 که با افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 سبب آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری می‌گردد. در نهایت تولید کاسپاز سه به‌همراه سایر عوامل سبب القای آپوپتوز در این سلول‌های سرطانی می‌گردد.[۱۶]

افزون بر این Majzner و همکاران سیکلوفسفامید را به‌عنوان دارویی مناسب بر علیه سلول‌های سرطانی معرفی کردند و اعلام داشتند تزریق این دارو به بیمارانی که تحت سلول درمانی می‌باشند از بروز سرطان در آن‌ها جلوگیری می‌کند.[۱۷]

همسو با پژوهش کنونی مبنی بر تاثیر آپوپتوزی سیکلوفسفامید بر سلول‌های غیرسرطانی Kemp و همکاران اثرات منفی سیکلوفسفامید را روی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان انسان گزارش کردند. آن‌ها همچنین بیان کردند که سیکلوفسفامید مهاجرت و جمعیت سلول‌های بنیادی خونساز در مغز استخوان را دستخوش تغییر می‌کند. البته آن‌ها اثر سیکلوفسفامید بر این سلول‌ها را با اثر آن بر سلول‌های غیرسرطانی مقایسه نکردند.[۱۸] بنابراین سیکلوفسفامید به‌صورت وابسته به غلظت می‌تواند به‌عنوان یک داروی ضد سرطانی در از بین بردن و القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی در سرطان سر و گردن مفید واقع شود و با توجه به این‌که در سلول‌های غیرسرطانی اثرات توکسیک کمتری دارد پس اثرات مضر جانبی کمتری متوجه بیمار خواهد شد. البته به‌منظور تکمیل نتایج به‌دست‌آمده، مطالعه بر روی تعداد بیشتری از رده‌های سلولی سرطانی و غیرسرطانی و غلظت‌های متنوع‌تر پیشنهاد می‌گردد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، سیکلوفسفامید با غلظت ۱ µg/ml نسبت به سایر غلظت‌ها تا حدودی فعالیت سایتوتوکسیک بیشتری روی رده سلول سرطانی HN5 و سلول‌های فیبروبلاستی نشان داد و همچنین به‌طور معناداری اثرات سیتوتوکسیک سیکلوفسفامید بر رده سرطانی HN5 بیشتر از رده سلول‌های فیبروبلاستی بوده است.

سپاسگزاری: این مطالعه حاصل فعالیت پژوهشی نویسندگان در بخش سلولی تکوینی گروه زیست‌شناسی می‌باشد که با حمایت دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است.

References

1. Rundberg Nilsson A, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and murine hematopoietic stem cell aging is associated with functional impairments and intrinsic megakaryocytic/erythroid bias. *PLoS One* 2016;11(7):e0158369.
2. Welsh L, Panek R, Riddell A, Wong K, Leach MO, Tavassoli M, et al. Blood transfusion during radical chemo-radiotherapy does not reduce tumour hypoxia in squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* 2017;116(1):28-35.
3. Wang VE, Grandis JR, Ko AH. New Strategies in Esophageal Carcinoma: Translational Insights from Signaling Pathways and Immune Checkpoints. *Clin Cancer Res* 2016;22(17):4283-90.
4. Wu C, Zhang J, Liu T, Jiao G, Li C, Hu B. Astaxanthin inhibits proliferation and promotes apoptosis of A549 lung cancer cells via blocking JAK1/STAT3 pathway. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2016;32(6):784-8.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

5. Ganz PA. Survivorship: adult cancer survivors. *Prim Care* 2009;36(4):721-41.
6. Janelsins MC, Heckler CE, Thompson BD, Gross RA, Opanashuk LA, Cory-Slechta DA. A clinically relevant dose of cyclophosphamide chemotherapy impairs memory performance on the delayed spatial alternation task that is sustained over time as mice age. *Neurotoxicology* 2016;56:287-293.
7. Mauro FR, Carella AM, Molica S, Paoloni F, Liberati AM, Zaja F, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and lenalidomide in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. A multicenter phase I-II GIMEMA trial. *Leuk Lymphoma* 2016:1-8.
8. Hill BT, Rybicki L, Carlstrom KD, Jagadeesh D, Gerds A, Hamilton B, et al. Daily weight-based busulfan with cyclophosphamide and etoposide produces comparable outcomes to four-times-daily busulfan dosing for lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(9):1588-95.
9. Oka N, Soeda A, Noda S, Iwama T. Brain tumor stem cells from an adenoid glioblastoma multiforme. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2009;49(4):146-50; discussion 150-1.
10. Zhang F, Aft RL. Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells. *J Cancer Res Ther* 2009;5 Suppl 1:S41-3.
11. Trebunova M, Laputkova G, Slaba E, Lacjakova K, Verebova A. Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 2012;32(7):2849-54.
12. Bakirel T, Alkan FÜ, Üstüner O, Çinar S, Yildirim F, Erten G, et al. Synergistic growth inhibitory effect of deracoxib with doxorubicin against a canine mammary tumor cell line, CMT-U27. *J Vet Med Sci* 2016;78(4):657-68.
13. Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(3):483-93.
14. Kim S, Lee JH, Kang I, Hyun S, Yu J, Shin C. An amphiphilic peptide induces apoptosis through the miR29b-p53 pathway in cancer cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016;5(7):e330.
15. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol Sci* 2007;98(1):216-30.
16. Chakraborty A, Kumar P, Ghosh K, Roy P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur J Pharmacol* 2010;647(1-3):1-12.
17. Majzner RG, Mogri H, Varadhan R, Brown P, Cooke KR1, Bolaños-Meade J, et al. Post-transplantation cyclophosphamide after bone marrow transplantation is not associated with an increased risk of donor-derived malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017:S1083-8791(17)30065-4.
18. Kemp K, Morse R, Sanders K, Hows J, Donaldson C. Alkylating chemotherapeutic agents cyclophosphamide and melphalan cause functional injury to human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* 2011;90(7):777-89.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2017; Vol. 74, No. 11: 763-770 Original Article

Effects of cyclophosphamide on proliferation and viability of malignant HN5 cell line and comparing with embryonic fibroblast cells

Elham Hoveizi Ph.D.*
Tayebeh Mohammadi Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Received: 06 Sep. 2016 Revised: 07 Feb. 2017 Accepted: 17 Feb. 2017 Available online: 18 Feb. 2017

Background: One of the major causes of death in the world is cancer and therefore any study in the field of cancer biology is of great importance. Head and neck cancers represent approximately 2-5% of neoplasms which is higher in some countries. The most appropriate therapy for various cancers is identifying effective and efficient ways that contribute to initiation of apoptosis. Cyclophosphamide is an alkylating agent that stops the replication of DNA and then, it stops the cell proliferation and viability. Therefore, cyclophosphamide is used to treat various types of cancer. In this study we evaluate the cytotoxic effects of cyclophosphamide on viability of (head and neck cancer cells) HN5 cell line and compare it with fibroblast cells as noncancerous cells.

Methods: This experimental study was done in cell and developmental laboratory in faculty of science, Shahid Chamran University of Ahvaz in Spring of 2016. HN5 cell line and embryonic fibroblast cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) at 37 °C, then the effects of different concentrations of cyclophosphamide on cell viability was evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was performed to determine the proportion of apoptotic cells by manually counting pyknotic nuclei. According to standard procedures from day 13 embryos of outbred strains naval medical research institute (NMRI), fibroblast cells were isolated. In this study HN5 cell line and fibroblasts were exposed to cytostatics for 72 hours.

Results: Various concentrations of cyclophosphamide were effective in cytotoxicity of HN5 cancer and fibroblast cells. A significant cytotoxicity was observed with the examined concentration of 1 µg/ml of cyclophosphamide with 50% in 3th day and $P< 0.001$. Interestingly, at low concentrations, cyclophosphamide was more toxic than at higher concentrations.

Conclusion: Totally cyclophosphamide had low toxicity effects on both of the cell lines but the toxicity effects of cyclophosphamide on HN5 were significantly greater than fibroblast cells. These results indicate that cyclophosphamide can be a potential anticancer agent.

Keywords: cancer, cell viability, cyclophosphamide, HN5.

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Tel: +98 61 33331045
E-mail: e.hoveizi@yahoo.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]