Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره اول ـ بهار ۹۰
صفحات ٦١ الی ٧٤

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر استازولامید بر توان زیستی سلول‌های سرطان سینه در رده سلولی T-47D

راضیه محمدپور[۱]، شاهرخ صفریان[۲]، فاطمه اژئیان[۳]، محمدحسین عبدالمحمدی[٤]

[۱]دانشجوی کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۲]استادیار بیوشیمی، علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۴]استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در این مقاله به بررسی اثر بازدارندگی استازولامید در رشد و تکثیر رده‌ای از سلول‌های سرطان سینه (T-47D) پرداخته شده است.

روش بررسی: در این مطالعه، ظهور علائم ریخت‌شناسی ویژه آپاپتوزیس به‌وسیله میکروسکوپ فلوئورسانس پس از رنگ‌آمیزی با Annexin-PI بررسی گردید. تحقیقات فلوسایتومتری برای بررسی میزان و نوع مرگ سلولی، همچنین مطالعه چرخه سلولی با بهره‌گیری از رنگ DAPI صورت گرفت. میزان فعالیت کاسپاز-۳ و نیز الگوی DNA Laddering در سلول‌های تیمارشده تعیین و با نمونه شاهد مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه صورت گرفت و مقایسه گروه‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ انجام شد.

یافته ها: بررسی علائم ریخت‌شناسی توسط میکروسکوپ فلوئورسانس در کنار نمودارهای حاصل از مطالعات فلوسایتومتری، پتانسیل قابل توجهی را برای داروی استازولامید در القای فرآیند آپاپتوزیس نشان داد. اما در مقابل، میزان فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در زمان تیمار سلول‌ها با دارو افزایش مشخصی داشت. این در حالی بود که در بررسی‌های انجام‌شده بر روی DNA ژنومی، الگوی نردبانی مشخصی در رابطه با سلول‌های تیمارشده با دارو مشاهده نشد و این خود دلیل دیگری را بر وقوع درصد پایین آپاپتوزیس در زمان تیمار سلول‌ها با دارو آشکار ساخت. از سوی دیگر، نمودارهای فلوسایتومتری رسم‌شده با استفاده از نشانگر DAPI بیان کننده آن بود که داروی سدیم استازولامید توان کمی را در کاهش سرعت چرخه تقسیم سلولی دارد و تنها توقف بخش اندکی از جمعیت سلولی را در مرحله $G_۲/M$ باعث می‌شود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، یافته‌های فوق نشان داد که اثر بازدارندگی داروی استازولامید بر روی رده T-47D را می‌توان از طریق اثرگذاری به روی سایر فرآیندهای سلولی به غیر از آپاپتوزیس و یا توقف چرخه سلولی (احتمالاً از طریق القای فرآیندهایی مانند کاتاستروف میتوزی) توضیح داد.

کلید واژه‌ها: استازولامید؛ سرطان‌های سینه؛ آپاپتوزیس؛ چرخه سلولی؛ فلوسایتومتری.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛
تلفن: ۶۱۱۱۳۲۳۷-۰۲۱ آدرس پست الکترونیکی: safarian@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲۲

مقدمه

سولفونامیدها اولین داروهای مؤثر برای درمان عفونت‌های سیستمیک باکتریایی بوده‌اند. شکل اولیه این داروها در سال ۱۹۰۸ کشف شد و برای اولین بار در سال ۱۹۳۳ از لحاظ بالینی استفاده گردید (۱). از آن به بعد مشتقات بسیاری از این دارو ساخته شده و پیشرفت‌های زیادی در مورد کاربرد درمانی آن، از جمله افزایش حلالیت سولفونامیدها در ادرار، که موجب کاهش مسمومیت کلیوی می‌شود و نیز کشف استفاده ترکیبی از این داروها، مانند تریپل سولفا (ترکیبی از ۳ داروی سولفاتیازول، سولفابنزامید و سولفاستامید) و به‌خصوص ترکیب تری متوپریم و سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول) صورت گرفته است (۱). همچنین این دسته از داروها به‌عنوان آنتی‌متابولیت نیز مطرح

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشند و با ساختاری مشابه ۴- آمینو بنزوئیک اسید، از تبدیل پارا آمینوبنزوئیک اسید به دی هیدروفولیک اسید جلوگیری کرده و در نهایت باعث مهار رقابتی بیوسنتز اسیدفولیک می‌شوند. مهار مسیر ساخت اسید فولیک در سلول باکتریایی، ساخت دیواره سلولی و اسیدهای نوکلئیک را با مشکل روبرو می‌سازد و باعث نابودی باکتری‌ها می‌شود (۳-۱). برخی از سولفونامیدها فعالیت ضد توموری دارند و اخیراً در درمان‌های بالینی برای درمان سرطان استفاده می‌شوند (۹-۴). همچنین مطالعات، بررسی رابطه ساختار با عملکرد وجود دو گروه از ضد تومورهای سولفونامیدی را به‌نام‌های [N- (۳-کلرو-۷- ایندولیل) ۴،۱- بنزن دی سولفونامید] (E7070) و (N-[۲- [(۴- هیدروکسی فنیل) آمینو]-۳- پیریدینیل] -۴- متوکسی بنزن سولفونامید) (E7010) نشان داده‌اند (۴). E7070 و همسانه‌های آن متعلق به گروه جدیدی از مهارکننده‌های چرخه سلولی هستند که پیشبرد چرخه سلولی را در نقاط چندگانه کنترلی مهار می‌کنند. این ترکیبات با هدف قرار دادن فازهای G_2/M و یا G_1/S خصوصیات ضد توموری خود را نشان می‌دهند (۶،۵). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد E7010 با مهار پلی‌مریزاسیون توبولین‌ها و ممانعت از تشکیل میکروتوبول‌ها رشد و تکثیر سلول‌ها را متوقف می‌کند. E7010 به‌طور برگشت‌پذیر به مکان اتصال کلشی‌سین در β-توبولین متصل می‌شود و در مقابل تومورهای موش و چندین نوع از تومورهای انسانی فعالیت ضد توموری خود را نشان می‌دهد (۷). به‌علاوه، این ترکیبات در مقابل انواع گوناگونی از رده‌های سلولی مقاوم به دارو اثرگذارند (۷). اخیراً هر دو داروی E7070 و E7010 در حال عبور از مرحله دوم سنجش بالینی می‌باشند و در این مسیر الگوی سمی نسبتاً خوبی را در مواجهه با سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند (۴). مشتقات سولفونامیدی جدیدی نیز با فعالیت ضد پروتئازی (متالو- سرین- سیستئین- و آسپارتیک- پروتئازهایی با منشأ پستانداران و یا ویروسی) گزارش شده است که اثرات ضد ویروسی، ضد توموری و ضد التهابی مناسبی را از خود نشان می‌دهند (۷). بعضی از سیستئین پروتئازهای انسانی مانند کاسپازها و کتپسین‌ها در آسیب‌شناسی چند بیماری التهابی مثل آرتریت روماتوئید و آسیب‌های مغزی مطرح می‌باشند (۷). کاسپازها همچنین نقش مهمی را در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپاپتوزیس) ایفا می‌کنند و مهار آنها توسط بعضی مشتقات سولفونامیدی که مراحل ابتدایی تحقیقات خود را طی می‌کند، می‌تواند به منزله داروی مناسبی برای جلوگیری از مرگ بی‌رویه سلولی مطرح باشد. استازولامید (۲- استیل آمینو-۱،۳،۴- تیادیازول-۵- سولفونامید) یا Diamox با فرمول مولکولی $C_4H_6N_4O_3S_2$ عضو خانواده دارویی سولفونامیدها است که از طریق مهار کربونیک انیدراز در درمان گلوکوم، صرع و... استفاده می‌شود (شکل شماره ۱، A). استازولامید به‌عنوان یک داروی عمومی ادرارآور به‌عنوان درمان مکمل در تورم وابسته به مصرف دارو، نارسایی قلبی، صرع‌های وابسته به مغز و گلوکوم ساده به کار می‌رود (۱۰). استازولامید فاقد قابلیت ضد باکتریایی است و با سایر اعضای این خانواده تفاوت ساختاری و عملکردی مشخصی دارد. این دارو مهارکننده قوی آنزیم کربونیک انیدراز بوده و به دلیل حلالیت بسیار پایین نمک سدیم آن در آب، استفاده می شود (۱۳-۱۰). سولفونامیدهای آروماتیکی با اثرات مهارکنندگی به روی کربونیک انیدراز مانند استازولامید، متازولامید، اتاکسوزولامید و بیس سولفونامیدها، دی کلروفنامید بیش از ۴۰ سال است که به‌عنوان دارو در سطح کلینیکی استفاده می‌شوند (۱۴). اثرات رقابتی استازولامید در مهار آنزیم کربونیک انیدراز II گاوی نیز در سال ۲۰۰۷ نشان داده شده است (۱۵). در سال ۱۹۹۵ برای اولین بار Chegwidden و Spencer گزارش کردند بعضی از سولفونامیدها روی مهار رشدی سلول‌های سرطانی انسانی تأثیرگذار هستند. آنها نشان دادند استازولامید (LC_{50}=۰/۲۵mM) و اتاکسوزولامید (LC_{50}=۰/۵mM) رشد سلول‌های لنفومای انسانی را مهار می‌کنند (۱۶). یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های زنان در سراسر دنیا سرطان سینه است که پس از سرطان ریه، بالاترین آمار ابتلا به سرطان را در جهان به خود اختصاص داده است. بیشتر تومورهای تشکیل‌شده در بافت سینه، خوش‌خیم و فاقد قابلیت تهاجم و رشد غیرقابل کنترل می‌باشند. اما تومورهای بدخیم تشکیل‌شده در لوبول‌ها و مجاری عبور شیر اغلب مهاجم بوده و توانایی انتشار به بافت‌های مجاور را دارند (۱۷). بدون شک درمان‌های هدف‌دار، در نتیجه شناخت بیشتر مکانیسم‌ها و مسیرهای انتقال پیام مرتبط با سرطان حاصل شده‌اند. این روش‌های درمانی بر پایه ایجاد تداخل با مولکول‌های ویژه

www.SID.ir

Archive of SID

مؤثر در سرطان‌زایی استوار گشته‌اند و از این طریق موجب توقف رشد و انتشار سرطان می‌شوند.

در این پژوهش، سعی گردید با وجود گزارش‌های ضد و نقیض موجود در ارتباط با مکانیسم عمل داروهای سولفونامیدی، به این سؤال اساسی پاسخ داده شود که آیا واقعاً این خانواده دارویی از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و یا توقف چرخه تقسیم سلولی باعث توقف رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می شود، یا از طرق دیگری این اثر را از خود نشان می‌دهد. به همین دلیل اثرات یکی از اعضای مهم این خانواده دارویی (استازولامید) به روی رده سلولی T-47D مورد توجه قرار گرفت. مطالعات نشان‌دهنده بینش جدیدی در نحوه اثرگذاری داروی استازولامید بر روی سلول‌های سرطانی است که می‌تواند در نابودی درمان سرطان‌هایی مثل سرطان سینه راهگشا باشد.

روش بررسی

محیط کشت سلولی RPMI1640 و سرم جنین گاوی از شرکت GIBCO انگلستان، [۳- (۴،۵- دیمتیل تیازول-۲-ئیل)-۲، ۵-دیفنیل تترازولیوم بروماید] (MTT) و محلول تریپسین- EDTA از شرکت Sigma انگلستان، استرپتومایسین- پنی‌سیلین، کیت DNA Laddering، کیت رنگ‌آمیزی Annexin-V-FLOUS، کیت رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید، کیت سنجش فعالیت کاسپاز-۳، کیت ۴، ۶- دی آمیدینو-۲- فنیل ایندول (DAPI) از شرکت Roche آلمان، دوکسوروبیسین از شرکت Ebewe Pharma اتریش و نمک سدیم‌دار استازولامید از شرکت Aventis Farma تهیه گردید. در این پژوهش از دستگاه‌های ثبت الایزا ساخت شرکت Rayto چین؛ میکروسکوپ فلوئورسانس ساخت شرکت Karl Zeiss آلمان؛ طیف نورسنج فلوئورسانس مدل MPF-4A ساخت شرکت HITACHI ژاپن؛ طیف نورسنج Nanodrop ساخت شرکت Thermsientific آمریکا و دستگاه فلوسایتومتر ساخت شرکت Partec آمریکا مجهز به نرم‌افزار Flowmax استفاده شد.

سلول‌های T-47D (رده سلولی سرطانی بافت پوششی مجاری شیری سینه در انسان) تهیه‌شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (با کد HTB-133 ATCC) در محیط سترون RPMI1640 غنی‌شده با سرم جنین گاو (۱۰٪ حجم/حجم) و پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (۱٪ حجم/حجم) تحت شرایط کنترل‌شده دما ($37^{\circ}C$) و اتمسفر مرطوب حاوی CO_2 (۵٪ حجم/حجم) کشت داده شد و تعویض محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک‌بار صورت گرفت. در زمان پاساژ سلولی جهت انتقال سلول‌ها به فلاسک جدید از محلول سترون تریپسین- EDTA با زمان انکوباسیون ۵-۳ دقیقه استفاده گردید. براساس نتایج حاصل از MTT و تعیین غلظت مؤثر دارو جهت کاهش ۵۰ درصدی بقای سلول‌ها در ۴۸ ساعت (LC_{50})، پودر سدیم استازولامید (MW=۲۴۴/۲۳gr/mol) در محیط کشت تا حصول غلظت ۲۶mM حل و سپس محیط کشت به دست آمده با استفاده از فیلتر ۰/۲۲µM سترون گردید. سپس محیط کشت حاوی دارو در زمانی که سلول‌ها حدوداً ۸۰٪ از سطح فلاسک سلولی را پوشاندند، طی فرآیند تعویض محیط کشت به فلاسک افزوده شد. پس از طی شدن ۲۴ ساعت محیط کشت رویی تخلیه و با افزودن محلول سترون تریپسین-EDTA سلول‌های جداشده از کف فلاسک ۳ بار با استفاده از بافر فسفات- سالین شستشو و سپس به دمای $-70^{\circ}C$ منتقل شدند (تعیین توان زیستی سلول‌ها با استفاده از ماده شیمیایی MTT صورت می‌گیرد. این ماده میزان فعالیت تنفسی میتوکندری‌های مستقر در سلول‌های زنده را سنجش می‌کند). برای تعیین توان زیستی سلول‌ها در حضور دارو و قیاس آن با نمونه شاهد منفی، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به چاهک‌های صفحات ۹۶ خانه منتقل و پس از ۲۴ ساعت تحمل شرایط کشت سلولی (۵٪ CO_2 و $37^{\circ}C$) و اتصال به کف چاهک‌ها، محیط کشت رویی جدا و محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف دارو (سدیم استازولامید، شکل شماره ۱A و دوکسوروبیسین، شکل شماره ۱B) افزوده شد. جهت بررسی اثر دارو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد ۳ صفحه ۹۶ خانه (هر صفحه مختص یک زمان انکوباسیون دارویی) در نظر گرفته شد؛ به‌طوری‌که در هر صفحه، دستجات ۳ تایی از چاهک‌های کنار هم، به‌منظور ایجاد شرایط تکرار آزمایش مرتبط با یک غلظت از دارو، فراهم شود. آزمایش فوق در ۳ تکرار مجزا برای هر زمان انکوباسیون صورت گرفت؛ به‌نحوی‌که برای هر غلظت دارویی حداقل ۹ تکرار موجود باشد. پس از گذران زمان انکوباسیون دارویی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) ۲۵µl از محلول ذخیره MTT با غلظت ۴mg/ml به هر چاهک افزوده شد؛ تا غلظت خالص ۱۰۰µg از MTT در هر چاهک به دست آید. سپس محصول فورمازان به دست آمده (پس از انکوباسیون ۳ ساعته در دمای $37^{\circ}C$)

www.SID.ir

Archive of SID

در ۱۰۰ml دی متیل سولفوکساید حل و میزان جذب نوری فورمازون تولیدشده با استفاده از دستگاه ثبت الایزا در طول موج ۵۷۰nm تعیین گردید. توان زیستی سلول‌های تیمارشده با دارو (در هر غلظت از دارو) به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازون تولیدی در شاهد منفی (در همان غلظت از دارو) تعیین و در یک منحنی دوبعدی (درصد توان زیستی یا بقای سلول‌ها در مقابل غلظت دارو) نشان داده شد. از منحنی به دست آمده می‌توان LC_{50} را برای ۲ داروی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعیین نمود. به‌منظور تعیین تعداد سلول‌های آپاپتوزشده در یک جمعیت سلولی تیمارشده با دارو (سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین) و قیاس آن با جمعیت سلولی شاهد منفی، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با ۲ رنگ Annexin-FITC و پروپیدیوم یدید (PI)، طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت‌شده در منحنی دوبعدی به ۴ ناحیه Q_1-Q_4 صورت گرفت؛ به‌نحوی که ناحیه Q_1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^-$ و PI^+؛ ناحیه Q_2 نمایانگر سلول‌های آپاپتوزشده پیر با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^+$ و PI^+؛ ناحیه Q_3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^-$ و PI^- و ناحیه Q_4 نمایانگر سلول‌های آپاپتوزی جوان با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^+$ و PI^- بود. به‌منظور تعیین اثرات داروهای به کار رفته در جهت القای آپاپتوزیس و یا نکروز، درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه توسط نرم‌افزار محاسبه و گزارش گردید. اندازه‌گیری محتوای DNA سلول‌ها در یک جمعیت سلولی با استفاده از نشانگر DAPI صورت گرفت. در این روش، تعداد $5x10^5$ سلول برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی با محلول DAPI در بافر PBS با غلظت ۱۰μg/ml حاوی ۶٪ تریتون X100 انکوبه شد. سپس نشر فلوئورسانس نشانگر به کار رفته پس از تهییج در طول موج ۳۵۹nm ثبت گردید. ثبت فوتون‌های نشری در طول موج ۴۶۱nm، تجزیه و تحلیل داده‌ها به روی منحنی دوبعدی پهنا (W) در برابر سطح زیرپیک (A) با استفاده از نرم‌افزار FloMax صورت گرفت. بررسی حضور فسفاتیدیل سرین در نیم غشای خارجی سلول‌ها به‌عنوان یک ویژگی مهم سلول‌های آپاپتوزی به همراه نفوذ پروپیدیوم یدید به داخل هسته سلول‌های آپاپتوزی پیر و سلول‌های نکروزی، با بهره‌گیری از میکروسکوپ فلوئورسانس صورت گرفت. در این روش سلول‌ها به روی لامل‌های پوشانده‌شده با پلی ال-لیزین کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت با تخلیه محیط کشت رویی، محیط کشت حاوی دارو (استازولامید و یا دوکسوروبیسین) افزوده شد و پس از طی شدن زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته، محلول رنگی Annexin V-FITC (۲۰μg/ml) و پروپیدیوم یدید (۲۰μg/ml) به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی در مجاورت سلول‌ها قرار گرفت. سپس تصاویر سلولی در درشت‌نمایی‌های مختلف در زیر میکروسکوپ فلوئورسانس (طول موج تحریکی ۵۰۰nm-۴۵۰ و طول موج ثبتی ۵۶۵nm-۵۱۵) بررسی شد. سنجش فعالیت کاسپاز-۳ با استفاده از کیت نشرزای شرکت Roche با حساسیت بسیار بالا، طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. در این روش سلول‌های تیمارشده با دارو با بافر PBS شسته و به مدت ۱ دقیقه به روی یخ در مجاورت بافر لیز سلولی قرار داده شدند. پس از انجام سانتریفوژ، بخش رویی جدا و به روی چاهک پوشیده‌شده با آنتی‌بادی ضد کاسپاز-۳ انتقال داده شد، تا پس از گذشت زمان انکوباسیون و انجام فرآیند شستشو، سوبسترای ویژه کاسپاز-۳ (AC-DEVED-AFC) در اختیار مولکول‌های آنزیمی به دام افتاده در ته چاهک قرار داده شود. (انجام فرآیند کاتالیز آنزیمی به روی سوبسترا باعث رهاسازی ماده نشرزای AFC می‌شود که می‌توان غلظت آن را در واحد زمانی (یک ساعت) براساس منحنی استاندارد AFC آزاد، مشخص و ملاکی را برای مشخص نمودن فعالیت آنزیمی تعیین نمود). در این راستا، تحریک نمونه‌ها در طول موج ۴۰۰nm و ثبت فوتون‌های نشری در طول موج ۵۰۵nm صورت گرفت. به‌منظور بررسی قطعات DNA حاصل از عملکرد کاسپازها در سلول‌های تیمارشده با دارو (سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین) و مقایسه آن با شاهد منفی از کیت DNA Laddering ساخت شرکت Roche استفاده گردید. در این روش تعداد $2x10^6$ سلول پس از شستشو با بافر PBS در دمای ۲۵-۱۵°C با حجم مساوی از بافر لیز سلولی انکوبه شد. سپس DNA با استفاده از لوله‌های ویژه‌ای که حاوی فیلتر اتصال یابنده به DNA می‌باشد، پس از یک دقیقه انجام سانتریفوژ در ۸۰۰۰ RPM جداسازی شد. DNA اتصال‌یافته به فیلتر پس از ۲ بار شستشو از درون لوله خارج و توسط سانتریفوژ جمع‌آوری شد. غلظت DNA با روش جذب‌خوانی تعیین و الکتروفورز آن به روی آگاروز ۱٪ و تحت ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱/۵ ساعت انجام گرفت. نرم‌افزار Flowmax جهت

www.SID.ir

Archive of SID

پردازش داده‌های فلوسایتومتری به‌منظور تعیین درصد سلول‌های سالم، آپاپتوزی و نکروزی و نیز تعیین درصد سلول‌های مستقر در مراحل S، G_1 و G_2/M مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و Excel 2007 و آزمون آماری واریانس یک‌طرفه صورت گرفت و مقایسه گروه‌های مختلف با هم در سطح $p<0/05$ انجام شد. نتایج در کل به شکل میانگین±خطای استاندارد گزارش گردید.

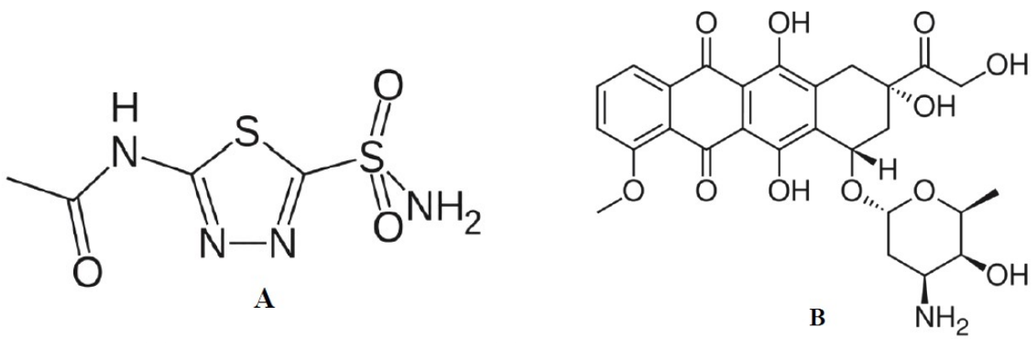
یافته‌ها

در این بررسی از آزمون MTT جهت سنجش توان زیستی و قدرت بقای سلول‌ها در مجاورت با دارو، به‌منظور تعیین غلظتی از دارو (سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین) که در آن توان زیستی سلول‌ها در قیاس با شاهد منفی به نصف کاهش می‌یابد (LC_{50})، استفاده شد. نمودار جذب نوری محلول فورمازان در حلال DMSO، که براساس غلظت‌های افزاینده استازولامید (شکل شماره ۱، A) و دوکسوروبیسین (شکل شماره ۲، B) رسم شده است، نشان‌دهنده اثرات بازدارندگی وابسته به غلظت دارو در رشد و تکثیر سلول‌ها در محدوده غلظت ۰/۰-۳۰mM برای سدیم استازولامید و ۰/۰-۰/۶۰μM برای دوکسوروبیسین می‌باشد (شکل شماره ۲). به‌منظور تعیین رابطه اثر دارو با زمان، نمونه‌ها بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محدوده غلظت تعیین‌شده، بررسی شدند و میزان توان زیستی سلول‌ها پس از تیمار دارویی در قیاس با نمونه شاهد محاسبه گردید. در شکل شماره ۲ ارتباط میزان توان زیستی سلول‌ها (محور y) با افزایش غلظت دارو (محور x) نشان داده شده است. با استفاده از این نمودار غلظت مؤثر دارو برای کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلول‌ها (LC_{50}) در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه و در ۴۸ ساعت برای سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین به ترتیب برابر با ۲۶mM و ۰/۳۳۷μM مشخص شده است که این غلظت در تمامی تحقیقات انجام شده در این مقاله جهت تشخیص نوع اثر بازدارندگی دارو مورد استفاده قرار گرفت.

جدول: نتایج عددی آزمون فلوسایتومتری

سلول‌های تیمار شده	Q_3	Q_1	Q_2	Q_4	Q_1+Q_2	Q_2+Q_4	$\%G_1$	$\%S$	$\%G_2/M$
کنترل منفی	۹۹/۲۸±۰/۳۰	۰/۵۰۵±۰/۱۹	۰/۰۶±۰/۰۴	۰/۴±۰/۰۷	۰/۵۳۵±۰/۱۳	۰/۴۳±۰/۱۱	۶۷/۰۶±۵/۷۹	۱۶/۳۹±۴/۲۷	۱۶/۵۴±۳/۲۰
دوکسوروبیسین	۹۸/۴۹±۰/۲۲	۰/۷۴±۰/۱	۰/۳±۰/۰۲	۰/۷۲±۰/۱۱	۰/۷۶±۰/۱۲	۰/۹۵±۰/۳۱	۳۰/۵۸±۱/۱۴	۴۰/۵۵±۴/۶۵	۲۸/۸۶±۳/۵۱
استازولامید	۹۹/۰۹±۰/۱۴	۰/۴±۰/۰۵۶	۰/۰۶±۰/۰۲۱	۰/۴۶۵±۰/۱	۰/۴۴۵±۰/۰۳۵	۰/۵۱±۰/۰۸۴	۶۳/۹۱±۰/۱۲	۱۶/۶۲±۳/۵۰	۱۹/۳۸±۳/۴۰

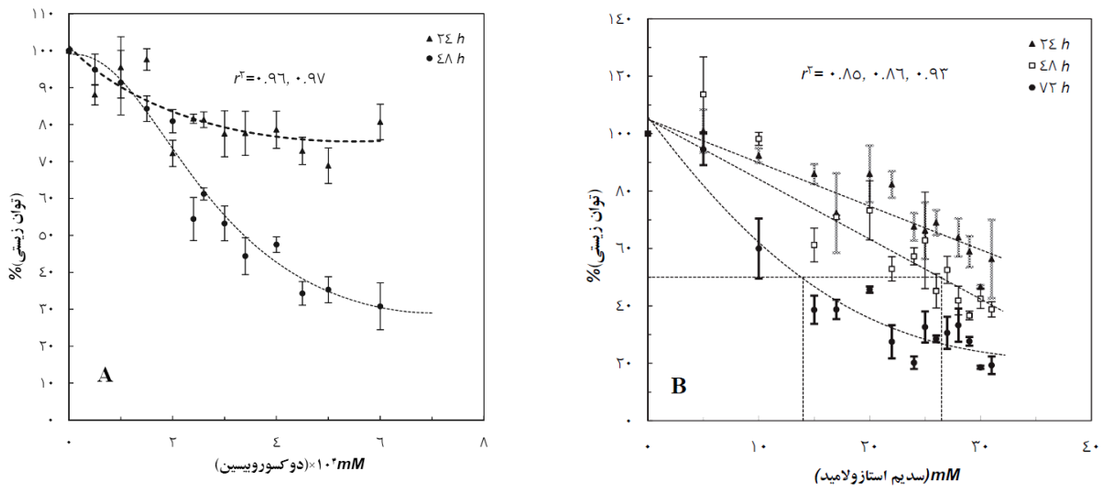
نتایج برای حداقل ۲ تکرار آزمایش به شکل درصد میانگین سلول‌ها±خطای معیار گزارش شده است. هر ستون Q_i نشان‌دهنده هریک از نواحی چهارگانه در نمودارهای آورده‌شده در شکل شماره ٤ می‌باشد. ستون‌های Q_1 و یا Q_1+Q_2 نمایانگر سلول‌های نکروزی و ستون‌های Q_4 و یا Q_2+Q_4 نمایانگر درصد کل سلول‌های آپاپتوزشده براساس هریک از ۲ روش ذکرشده در بخش نتایج است (نگاه به متن). ستون Q_3 معرف سلول‌های سالم می‌باشد. ستون‌های S، G_1 و G_2/M نشان‌دهنده درصد سلول‌های واقع در هر مرحله چرخه سلولی است که در شکل شماره ۵ نشان داده شده است. درصد سلول‌های قرار گرفته در G_1 sub بسیار اندک و قابل چشم‌پوشی است.



شکل شماره ۱ : ساختار شیمیایی داروی استازولامید (A)، ساختار شیمیایی داروی دوکسوروبیسین (B).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۲: منحنی توان زیستی سلول‌های T-47D بر حسب افزایش غلظت دوکسوروبیسین (A) و سدیم استازولامید(B)
درصد توان زیستی سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل منفی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سدیم استازولامید (۰/۰-۳۰mM) و دوکسوروبیسین (۰-۰/٦μM) به ترتیب به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ برای سدیم استازولامید و ۲٤ و ٤۸ ساعت برای دوکسوروبیسین محاسبه گردید. منحنی حاصل نشان‌دهنده اثر بازدارندگی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین بر روی سلول‌ها به‌صورت تابعی از غلظت و زمان می‌باشد. هریک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از حداقل ۳ آزمون مستقل با ±خطای معیار (SD) است. در بالای نمودار ضریب همبستگی برای سدیم استازولامید در زمان‌های به ترتیب از چپ به راست ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت؛ و برای داروی دوکسوروبیسین برای زمان‌های به ترتیب از چپ به راست ۲٤ و ٤۸ ساعت مشاهده می‌شود.

قطعه‌قطعه شدن DNA کروماتینی یکی از نشانه‌های وقوع مرگ سلولی است. در مرگ ناگهانی سلول (نکروز) DNA بدون نظم مشخص و به‌صورت اتفاقی از نقاط مختلف شکسته می‌شود، درحالی‌که در مراحل انتهایی فرآیند آپاپتوزیس، بر اثر فعال شدن آنزیم‌های اندونوکلئاز درونی (مانند $CAD/CPAN/DFF_{40}$) به‌وسیله کاسپازها، DNA کروموزومی از نواحی بین نوکلئوزومی بریده و قطعات یک و یا چند نوکلئوزومی تشکیل می شود. قطعات حاصل پس از تفکیک به‌وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، الگوی نردبانی مشخصی را ایجاد می کنند که به‌راحتی از الگوی پیوسته DNA در سلول‌های نکروتیک قابل تفکیک است (۱۸). در این مطالعه، DNA ژنومی سلول‌های تیمارشده با سدیم استازولامید، دوکسوروبیسین و شاهد منفی، استخراج و بر روی ژل آگارز تفکیک و رنگ‌آمیزی شد. مشاهده الگوی شکست نردبانی مشخص در نمونه کنترل مثبت نشان‌دهنده درستی کارکرد کیت به‌منظور آشکارسازی الگوی نردبانی شکل می‌باشد (شکل شماره ۳). در این بررسی از عصاره سلول‌های U937 تیمارشده با غلظت ۴μg/ml داروی Camptothesin به‌عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شده است. این دارو موجب القای آپاپتوزیس در حدود ۳۰٪ در سلول‌های U937 می گردد که الگوی شکست نردبانی DNA آن به روی ژل آگاروز قابل مشاهده است (شکل شماره ۳). همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود، الگوی مورد نظر در مورد DNAهای استخراج‌شده از سلول‌های تیمارشده با سدیم استازولامید، دوکسوروبیسین و سلول‌های نمونه شاهد منفی، قابل مشاهده نیست که این موضوع بیان‌کننده عدم بروز آپاپتوزیس در این نمونه‌ها می‌باشد (شکل شماره ۳). آنزیم کاسپاز-۳ به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کاسپازهای عمل کننده در زمان بروز آپاپتوزیس فعال می شود (۱۹). بنابراین افزایش میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های تیمارشده (در قیاس با سلول‌های شاهد) می‌تواند نشان‌دهنده القای آپاپتوزیس در سلول‌های سرطانی T-47D و در حضور سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین باشد. همان‌گونه که در بخش روش بررسی توضیح داده شد با استفاده از سوبسترای اختصاصی کاسپاز-۳ (AC-DEVD-AFC) و آزادسازی AFC در نتیجه برش آنزیمی سوبسترا، می‌توان به میزان فعالیت کاسپاز-۳ در مدت زمان مشخص پی برد. میانگین میزان نشر فلوئورسانس حاصل از ۳ بار تکرار صورت پذیرفته در نمونه‌های کنترل منفی سلول‌های تیمارشده با غلظت ۲۶mM سدیم استازولامید و سلول‌های تیمارشده با ۰/۳۳۷μM دوکسوروبیسین به ترتیب برابر

www.SID.ir

Archive of SID

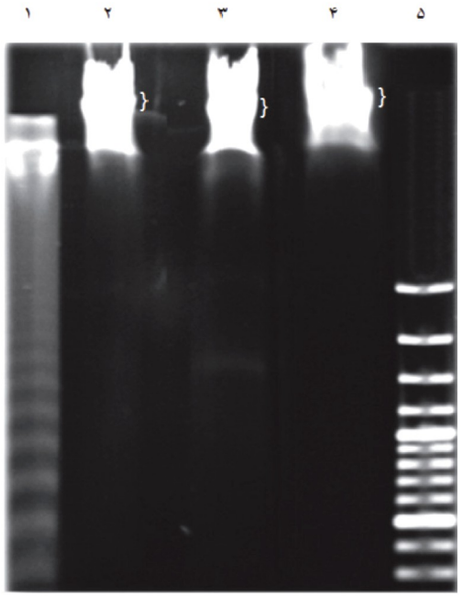
۱/۴۲±۱۶/۵، ۱/۷۱±۳۸/۳ و ۰/۸۹±۳۱/۶ بود. این افزایش نشر نمونه‌های تیمارشده با دارو در قیاس با نمونه شاهد منفی به خودی خود نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در زمان مجاورت سلول‌ها با دارو می‌باشد. به‌وسیله رسم منحنی استاندارد می‌توان از روی میزان نشر نمونه‌ها، غلظت دقیق AFC آزادشده ناشی از فعالیت آنزیمی را در واحد زمان (که معرف فعالیت آنزیمی است) همراه با انحراف معیار مربوط به آن به دست آورد (شکل شماره ۴). فعالیت آنزیمی در نمونه کنترل منفی ۱/۳۰۸±۰/۱۱۵nM/h در نمونه تیمارشده با سدیم استازولامید ۳/۰۳۵±۰/۱۳۶nM/h و در نمونه تیمارشده با دوکسوروبیسین برابر با ۲/۴۹۶±۰/۰۸nM/h محاسبه شد (شکل شماره ۴). افزایش ۲/۳ و ۱/۹ برابری فعالیت کاسپاز-۳ به ترتیب در نمونه‌های تیمارشده با سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین به ظاهر نمایانگر وقوع فرآیند آپاپتوزیس دراین نمونه‌ها در قیاس با شاهد منفی است که از این منظر با نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA مغایرت نشان می‌دهد. این عدم همخوانی ظاهری موجود در بین نتایج، در بخش تفسیر یافته‌ها مورد بحث قرار گرفته و به آن توضیح داده شده است.

نتایج حاصل از مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلوئورسانس نشان داد در یک جمعیت سلولی استقراریافته در سطح لام، پس از تیمار دارویی با سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین (به مدت ۴۸ ساعت) و رنگ‌آمیزی با سامانه رنگی Annexin-PI، پیدایش ظاهر مشابه با آنچه در مورد سلول‌های قرار گرفته در مراحل ابتدایی آپاپتوزیس گزارش شده است، تنها در مورد تعداد بسیار کمی از سلول‌ها (در میدان‌های دید مختلف) مشاهده می‌شود که از این نظر این موضوع مؤید وقوع کم آپاپتوزیس در بین سلول‌های تیمارشده با دارو در قیاس با شاهد منفی (همانند نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA) می‌باشد (شکل شماره ۵). گردشدگی سلول‌ها در نتیجه سست شدن اتصالات سلولی همراه با شناسایی فسفا تیدیل سرین‌های غشایی توسط مولکول‌های نشاندارشده Annexin-FITC، سلول‌های آپاپتوزشده را به‌صورت دایره‌ای درخشان مشخص می‌کند (شکل شماره 5a). در سلول‌های آپاپتوزی پیر (که نفوذپذیری غشا و در نتیجه خصوصیات رنگ‌پذیری هسته در آنها مشابه سلول‌های نکروزی است)، به دلیل تجمع PI در هسته، این غشای درخشان با هسته‌ای مشخص به رنگ قرمز رنگ‌آمیزی‌شده مشاهده می‌گردد، درحالی‌که در سلول‌های آپاپتوزی جوان تجمع هیچ رنگی در هسته دیده نمی‌شود (شکل شماره 5b). در شکل شماره 5c نیز نشانه‌هایی از جوانه‌زنی غشا و تشکیل اجسام آپاپتوزی مشاهده می‌گردد. وجود سلول‌های زنده در محیط که به‌علت عدم رنگ‌پذیری با رنگ‌های فلوئورسنت در میدان دید فلوئورسانس قابل تشخیص نمی‌باشند، در یک میدان دید مشخص با استفاده از امکانات فاز کنتراست میکروسکوپ به تعداد زیاد رؤیت شدند که تصاویر آن نشان داده نشده است. به‌منظور دستیابی به مقادیر عددی القای آپوپتوزیس و نکروز در نمونه‌های کنترل منفی (سلول‌های تیمارنشده)، و سلول‌های تیمارشده با داروهای سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین، آزمون فلوسایتومتری با نشانگرهای PI و Annexin-FITC انجام شد. سلول‌های واردشده به دستگاه فلوسایتومتر براساس اختلاف در میزان نشر رنگ‌های فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و پروپیدیوم یدید (PI) که جذب سلول می‌شوند، تفکیک شدند. در یک جمعیت سلولی فاقد رنگ، تعیین حدود اصلی سلول‌ها و حذف ذرات نامناسب با استفاده از منحنی دوبعدی (FSC) در برابر (SSC) صورت گرفت. در نمودار دوبعدی Annexin-FITC در برابر PI محاسبات مورد نظر با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی به روی ۴ ناحیه اصلی Q_1-Q_4 انجام پذیرفت و درصد سلول‌های سالم، آپاپتوزی و نکروزی براساس آنچه در بخش روش بررسی بدان اشاره شد، مشخص گردید (شکل شماره ۶، ۷ و جدول). در اینجا با توجه به نوع نتیجه‌گیری در اغلب منابع، مجموع درصد سلول‌های واقع‌شده در نواحی Q_2 و Q_4 به‌عنوان درصد کل وقوع آپاپتوزیس (سلول‌های آپاپتوزشده پیر و جوان) در نظر گرفته شد (۲۳-۲۰). در این حالت، سلول‌های قرار گرفته در نواحی Q_1 و Q_3 به ترتیب، معرف سلول‌های نکروزی و سالم می‌باشد. در شکل شماره ۷ و جدول علاوه بر مجموع درصد سلول‌های واقع‌شده در نواحی Q_2 و Q_4 به مجموع اعداد نواحی Q_1 و Q_2 نیز اشاره شده است که این مورد (مورد دوم) در برخی از منابع به‌عنوان درصد کل وقوع نکروز مورد استناد قرار گرفته است (۲۴). بدیهی است که در چنین حالتی ناحیه Q_4 به تنهایی نشان‌دهنده درصد کل سلول‌های آپاپتوزی می‌باشد. اشاره به هر ۲ روش محاسبه‌ای فوق (Q_2+Q_4 و Q_1+Q_2) از آنجا صورت گرفته است؛ تا مشخص گردد که در صورت محاسبه وقوع آپاپتوزیس و

www.SID.ir

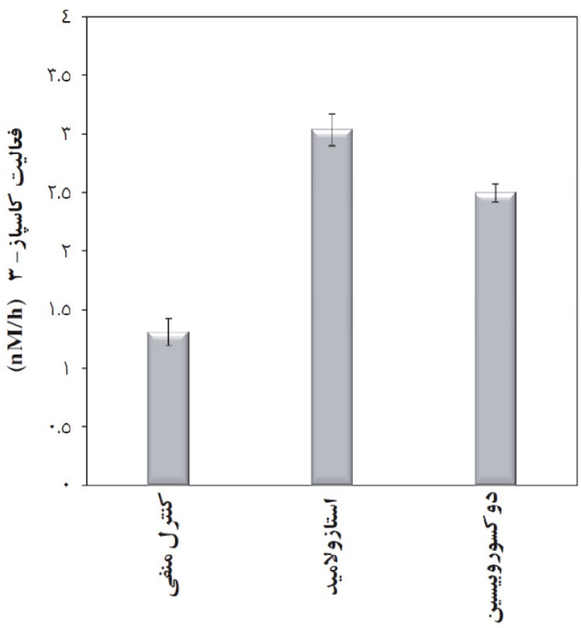
Archive of SID

نکروزیس با توجه به هرکدام از ۲ روش فوق، در حصول این نتیجه که درصد کل وقوع آپاپتوزیس و نکروزیس در زمان تیمار دارویی بسیار کم بوده است، تأثیری را نخواهد داشت. از طرف دیگر، روش فلوسایتومتری علاوه بر اینکه توانایی تعیین نسبت درصد سلول‌های آپوپتوزشده، نکروزشده و سالم را دارد، قادر است به‌عنوان روشی مناسب برای تعیین جمعیت‌های سلولی درگیر در مراحل G_1/G.، S و G_2/M نیز استفاده شود. بدین‌منظور معمولاً از نشانگرهای نشرزایی چون PI و یا DAPI که توانایی ورود به محیط هسته و اتصال به DNA را دارند، استفاده می‌شود. در ادامه کار مشخص گردید که در نتیجه تیمار با داروی سدیم استازولامید پراکنش سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی به نسبت نمونه شاهد تغییرات محسوسی را نداشته (اندکی جابجایی از G_1 به G_2/M)، ولی برای دوکسوروبیسین بروز این تغییرات با جابجایی مشخص سلول‌ها از مرحله G_1 به مرحله S (و به میزان کمتر به مرحله G_2/M) همراه بوده است که این تغییرات قاعدتاً زمانی می‌تواند ایجاد شود که مکانیسم‌های گذار سلولی از مرحله S (و به میزان کمتر، مکانیسم‌های گذار از مرحله G_2/M) در زمان مجاورت با دوکسوروبیسین به‌نحوی دچار اختلال شده باشند (شکل شماره ۸، جدول). از این یافته‌ها مشخص می‌گردد که در زمان تیمار سلول‌ها با سدیم استازولامید، جابجایی ناچیز سلول‌ها از G_1 به G_2/M نمی‌تواند کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلولی را در زمان تیمار با این دارو توجیه نماید، ولی توقف چرخه سلولی در مرحله S در سلول‌های تیمارشده با دوکسوروبیسن می‌تواند دلیل محکمی در رابطه با مکانسیم اثر این دارو در ممانعت از تکثیر سلولی ارائه دهد.



شکل شماره ۳: آشکارسازی الگوی شکست نردبانی DNA

ستون‌ها مشتمل بر کنترل مثبت فراهم‌شده توسط کیت (۱)، نمونه DNA شاهد منفی (۲)، نمونه DNA سلول‌های تیمارشده با سدیم استازولامید (۳)، نمونه DNA سلول‌های تیمارشده با دوکسوروبیسین (٤) و شاخص اندازه مولکولی (۵) می‌باشد. DNA از تعداد $2x10^6$ سلول استخراج و مقدار 1-3µg آن به روی آگاروز ۱٪ بارگذاری شده است. به‌منظور بالا بردن حساسیت و ایجاد بهترین شرایط جهت رؤیت باندهای DNA قطعه‌قطعه‌شده در کمترین غلظت، بارگذاری DNA نمونه‌ها با حداکثر غلظت انجام شده است که این موضوع در کنار هیپوتریپلوئید بودن سلول‌های T-47D باعث پهن شدن باند DNA ژنومی شده است، ولی همان‌گونه که مشاهده می‌شود حدود باند اصلی در هر مسیر حرکتی قابل تشخیص می‌باشد که با علامت نشان داده شده است.

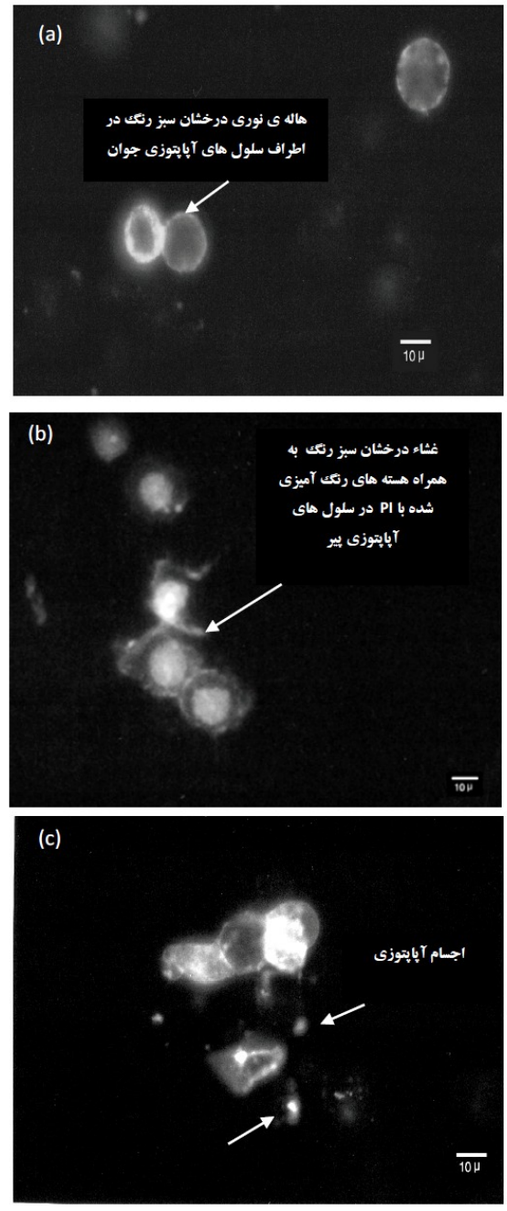


شکل شماره ٤: بافت‌نگار مربوط به فعالیت کاسپاز-۳

فعالیت آنزیمی در دمای ۲۷°C در عصاره سلولی استخراج‌شده از تعداد 2×10^6 سلول و براساس دستورالعمل کیت انجام شده و میزان نشر AFC آزادشده توسط طیف نورسنج فلوئورسانس در طول موج تحریکی ٤۰۰nm، طول موج نشری ۵۰۵nm اندازه‌گیری شده است. فعالیت آنزیمی در نمونه کنترل منفی ۱/۳۰۸±۰/۱۱۵nM/h در نمونه تیمارشده با سدیم استازولامید ۳/۰۳۵±۰/۱۳٦nM/h و در نمونه تیمارشده با دوکسوروبیسین برابر با ۲/٤۹٦±۰/۰۸nM/h می‌باشد.

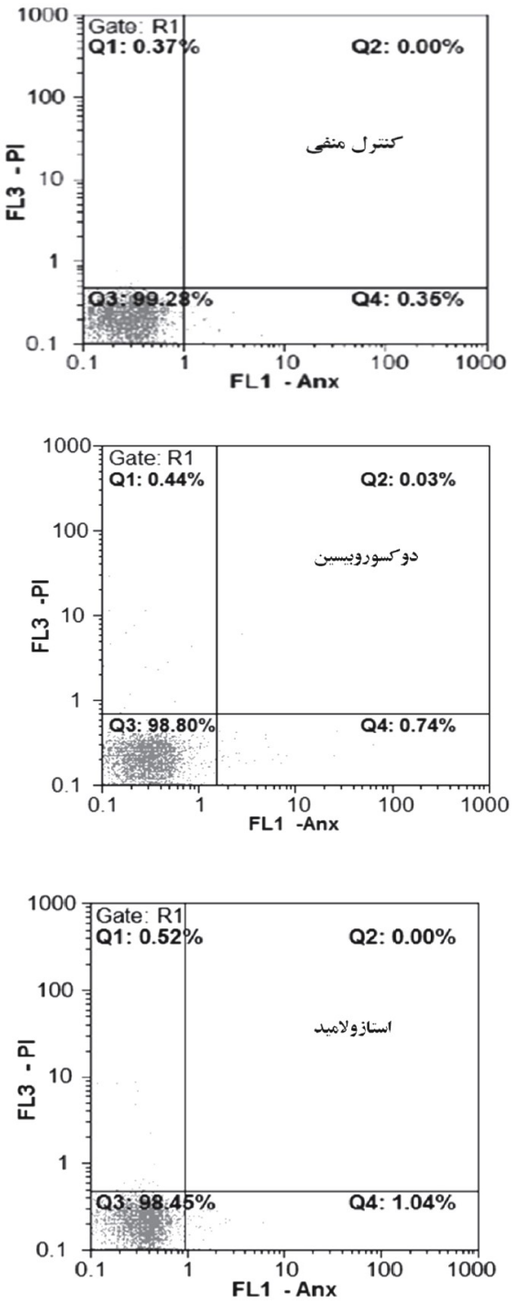
www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ٥: مشاهده ریخت‌شناسی ویژه سلول‌های آپاپتوتیک و نکروتیک توسط میکروسکوپ فلوئورسانس پس از رنگ‌آمیزی همزمان سلول‌ها با Annexin-PI

(a) سلول‌های گردشده با غشای درخشان نشان دهنده القای آپاپتوزیس درسلول‌های T-47D در نتیجه اثر داروی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین می‌باشد. هاله سفید رنگ نشان داده شده در شکل معرف درخشندگی رنگ سبز است. (b) سلول‌های آپاپتوزی پیر با غشای درخشان حاصل از اتصال مولکول‌های نشان‌دار Annexin-FITC به غشا و به دلیل نفوذپذیر شدن غشا و تجمع PI در هسته، با هسته قرمز پر رنگ مشاهده می‌شوند. (c) نشانه‌هایی از جوانه‌زنی غشا و تشکیل اجسام آپاپتوزی به‌عنوان یکی از علائم ریخت‌شناسی ویژه آپاپتوزیس دیده می‌شود. بزرگنمایی همه تصاویر X ۲۵۰ می‌باشد.

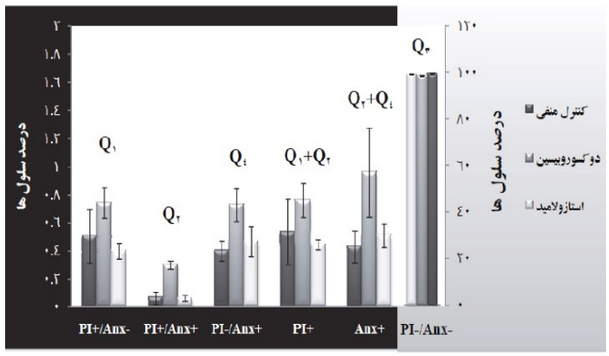


شکل شماره ٦: بافت‌نگار دوبعدی Annexin-FITC علیه PI مربوط به یکی از تکرارهای آزمون فلوسایتومتری

در شکل، نمودارهای رسم‌شده مربوط به یکی از تکرارهای شاهد منفی، تیمارشده با داروهای دوکسوروبیسین و سدیم استازولامید به‌عنوان نمونه آورده شده است. محدوده اندازه سلول‌های مورد بررسی، روی نمودار FSC/SSC در نمونه سلول‌های سالم فاقد رنگ و براساس اندازه طبیعی سلول‌ها تعیین گردیده است. همچنین تعیین محدوده ٤ ناحیه ذکرشده براساس قرارگیری بیش از ۹۰٪ سلول‌های نمونه کنترل منفی در ناحیه Q_3 صورت پذیرفته است. نمودارهای دوبعدی حاصل از مطالعات فلوسایتومتری نشان داد درصد سلول‌های آپاپتوزی و نکروزی تفاوت فاحشی را با نمونه کنترل منفی (سلول‌های تیمارنشده) ندارد.

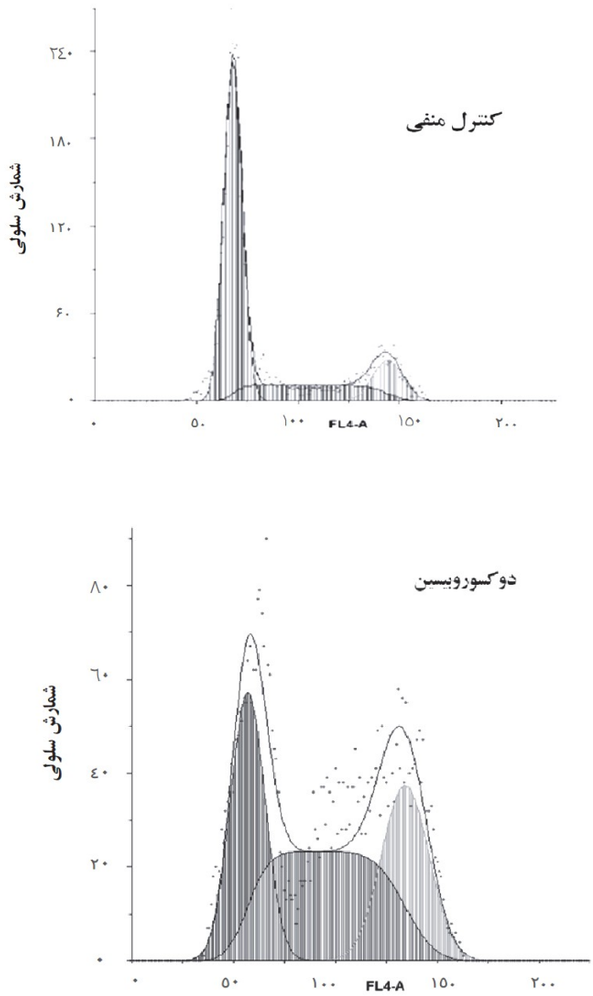
www.SID.ir

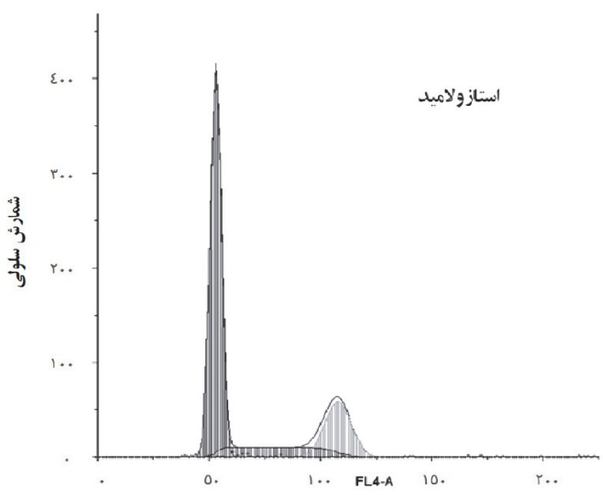
Archive of SID



شکل شماره ۷: بافت‌نگار ستونی درصد سلول‌ها علیه Annexin-PI حاصل از آزمون فلوسایتومتری

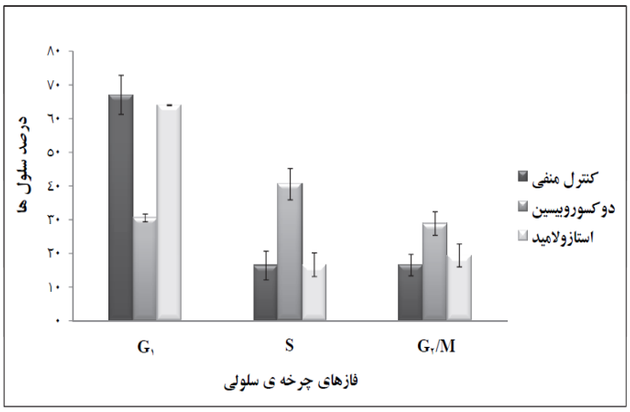
در این نمودار درصد سلول‌های دارای مشخصه مشابه در رنگ‌های PI و Annexin نشان داده شده است. همان‌طورکه با رنگ مشخص است نمودار عمودی (محور y) سمت راست مربوط به ناحیه Q_3 (PI-/Anx-) و نمودار عمودی سمت چپ مربوط به سایر نواحی (Q_1، Q_2، Q_4، Q_1+Q_2، Q_2+Q_4 و Q_1+Q_4) می‌باشد. خطای معیار نمونه‌های ذکرشده در جدول و نیز در روی شکل مشخص شده است.





شکل شماره ۸: بررسی اثر استازولامید و دوکسوروبیسین بر چرخه سلولی در سلول‌های T-47D با بهره‌گیری از روش فلوسایتومتری

در این نمودار FL4-A نمایانگر سطح زیر منحنی علائم ثبت‌شده برای هر سلول رنگ‌شده با DAPI، در زمان عبور از مقابل پرتو لیزر می‌باشد. نواحی زنگوله مشخص‌شده در شکل، از چپ به راست معرف درصد سلول‌های موجود در فاز G_1، S و G_2/M است. سلول‌های شاهد منفی، سلول‌های تیمارشده با دوکسوروبیسین و سلول‌های تیمارشده با سدیم استازولامید در شکل نشان داده شده است.



شکل شماره ۹: بافت‌نگار ستونی درصد سلول‌ها علیه فازهای چرخه سلولی حاصل از آزمون فلوسایتومتری

در این نمودار درصد سلول‌های موجود ۳ فاز چرخه سلولی G_1، S، G_2/M در ۳ نمونه کنترل منفی، دوکسوروبیسین و سدیم سولفابنزامید مشاهده می‌شود. خطای معیار نمونه‌های ذکرشده در جدول و نیز در روی شکل مشخص شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تلاش برای دستیابی به دارویی مؤثر، که با عملکردی ویژه باعث نابودی سلول‌های سرطانی گردد؛ پژوهشگران را بر آن داشته است تا نظر خود را بر مسیرها و مولکول‌های ویژه‌ای معطوف کنند که نقش مهمی را از خود در بروز بیماری سرطان به ظهور می‌رسانند. استراتژی‌های عمده در این مبارزه هدفمند با بیماری سرطان شامل مهار رگ‌زایی، القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپاپتوزیس) و تنظیم مسیرهای حیاتی سلول مانند چرخه تقسیم سلولی می‌باشد. سولفونامیدها، از سال‌ها پیش با کاربردهای متعددی در درمان بیماری‌ها مورد استفاده بوده‌اند. طیف وسیع اثرات دارویی این خانواده، نویسندگان مطالعه حاضر را بر آن داشت تا با تکیه بر توانایی اثرگذاری آنها بر مسیرها و ترکیبات مختلف سلولی، به بررسی قابلیت مهارکنندگی عضوی از اعضای این خانواده دارویی بر روی یک رده خاص سلولی (T-47D) بپردازند. در این پژوهش از میان سولفونامیدها، داروی استازولامید به دلیل استفاده‌های درمانی متداول در مواردی چون گلوکوم و صرع، به‌عنوان گزینه‌ای مناسب جهت بررسی اثرات ضد سرطانی انتخاب گردید (۱۳-۱۰). به همین منظور، نمک سدیم‌دار این دارو در شرایط استاندارد کشت سلول بر روی یک رده از سلول‌های سرطان سینه (T-47D) اثر داده شد. همان‌گونه که در بخش نتایج عنوان گردید، نمک سدیم‌دار استازولامید به‌صورت وابسته به غلظت و زمان بر روی میزان تکثیر سلول‌های T-47D دارای اثرات بازدارندگی است که پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در غلظت‌های ۲۶mM و ۱۴mM توان حیاتی سلول‌ها را (به نسبت نمونه شاهد فاقد دارو) به میزان ۵۰٪ کاهش می‌دهد. در مراحل بعدی کار به‌منظور توجیه مکانیسم اثر دارو، مطالعه اثرات القایی آن بر روی فرآیند آپاپتوزیس و یا سایر پدیده‌های سلولی که می‌توانست به‌نحوی در رشد و تکثیر سلولی مؤثر باشد (مانند چرخه سلولی) در حضور غلظت۲۶mM سدیم استازولامید در مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت صورت گرفت. به‌علاوه، تیمار سلول‌ها با داروی دوکسوروبیسین در غلظت ۰/۳۳۷μM و مدت زمان ۴۸ ساعت برای بررسی نحوه اثرگذاری این دارو بر روی سلول‌ها مورد توجه قرار گرفت که علت آن نیز وجود گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر این دارو در راه‌اندازی آپاپتوزیس و توقف چرخه سلولی در زمان مجاورت با سلول‌ها بوده است (۲۶،۲۵). در واقع، این دارو می‌توانست به‌عنوان شاهد مثبت در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این نکته که مطالعه مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌ها و بررسی فرآیندهای تنظیمی مؤثر در چرخه سلولی معمولاً به‌عنوان ۲ شاخص مهم در نحوه اثرگذاری داروهای ضد سرطان بررسی می‌شود، لذا در این پژوهش اثرات داروی سدیم استازولامید بر القای این دو فرآیند سلولی مورد توجه قرار گرفت. در این پژوهش به‌عنوان اولین گام، تغییر ویژگی‌های ظاهری سلول‌ها به سمت یک سلول آپاپتوزشده در حضور ۲ داروی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین بررسی شد. همان‌گونه که در شکل شماره ۵ مشاهده می‌گردد تیمار سلول‌ها با داروها سبب شکل‌گیری سلول‌هایی گردشده با غشای سبز درخشان شده است (هاله سفید رنگ نشان داده شده در شکل معرف درخشندگی رنگ سبز می‌باشد). اما تعداد این سلول‌ها در قیاس با تعداد کل سلول‌ها (که در زمینه سیاه میکروسکوپ فلوئورسانس قابل مشاهده نیستند، ولی در میدان دید فاز کنتراست مشاهده می‌گردند) بسیار اندک است. در پژوهش حاضر، وقوع کم آپاپتوزیس در ارتباط با داروی دوکسوروبیسین نیز برخلاف آنچه در مقالات به آن اشاره شده بود، مشاهده گردید (شکل شماره ۵). جهت حصول اطمینان از وقوع کم آپاپتوزیس در زمان تیمار سلول‌ها با سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین، وضعیت سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر و رنگ‌آمیزی همزمان با ۲ ردیاب نشرزای Annexin-FITC و PI به‌طور کمّی مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌های واردشده به دستگاه فلوسایتومتر براساس اختلاف میزان نشر رنگ‌های فلوئورسنت Fluorescin و PI متصل به سلول تفکیک گردید و نتایج حاصل با توجه به توضیحات بخش روش بررسی در جدول طبقه‌بندی شد. همان‌طورکه در این جدول مشاهده می‌شود درصد کل سلول‌های آپاپتوزشده (ستون $Q_۴$ یا $Q_۲+Q_۴$) و یا نکروزشده (ستون $Q_۱$ یا $Q_۱+Q_۲$) به‌همان صورت که در بررسی‌های میکروسکوپ فلوئورسانس مشخص است، بسیار اندک می‌باشد (شکل شماره ۶، ۷ و جدول). پایین بودن میزان وقوع آپاپتوزیس در حضور داروهای سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین به‌وسیله مطالعه الگوی شکست نردبانی DNA نیز به اثبات رسید (شکل شماره ۳). بنابراین با توجه

www.SID.ir

Archive of SID

به یافته‌های سه‌گانه فوق (میکروسکوپ فلوئورسانس، فلوسایتومتری، الگوی شکست نردبانی DNA) می‌توان استنتاج نمود که اثرات ضد رشد و تکثیر سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین در سلول‌های T-47D بدون شک از طریق القای فرآیند آپاپتوزیس اعمال نمی‌شود. در این راستا، افزایش مشاهده‌شده فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ را می‌توان با توجه به‌وجود نقص در فرآیندهای مولکولی پایین‌دست کاسپاز-۳ از جمله عدم کارکرد درست DFF_{40} توضیح داد (شکل شماره ۴). این بدان معناست که با وجود ثبت فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ در شرایط آزمایشگاهی (که در زمان مجاورت با سوبسترای مصنوعی و نه DFF_{40} ثبت شده است)، در شرایط طبیعی سلول که این آنزیم می‌بایست به روی سوبستراهای طبیعی خود (مانند DFF_{40}) اثر داشته باشد، این اثرگذاری احتمالاً با توجه به وجود نقص در ساختار سوبستراهای طبیعی (مانند DFF_{40}) در سلول مشاهده نمی‌گردد و لذا به‌واسطه عدم فعال‌سازی DFF_{40} تجزیه DNA و ظهور الگوی شکست نردبانی نیز قابل رؤیت نیست. روش فلوسایتومتری علاوه بر اینکه توانایی تعیین نسبت درصد سلول‌های آپاپتوزشده، نکروزشده و سالم را دارد قادر است به‌عنوان روشی مناسب برای تعیین جمعیت‌های سلولی درگیر در مراحل مختلف چرخه سلولی استفاده شود (شکل شماره ۸). از روی نمودارهای فلوسایتومتری و محاسبات صورت گرفته در محدوده R_1 (محدوده اصلی سلول‌ها) مشخص شده است که در نتیجه تیمار با سدیم استازولامید پراکنش سلول‌ها در مرحله G_2/M به میزان ۲/۸۴٪ و در مرحله S به میزان ۰/۲۳٪ به نسبت نمونه شاهد منفی افزایش یافته است. این در حالی است که تحت تأثیر داروی دوکسوروبیسین شاهد، افزایش درصد سلول‌های قرار گرفته در مرحله S به میزان ۲۴/۱۶٪ و در مرحله G_2/M به میزان ۱۲/۳۲٪ می‌باشد. مقایسه اعداد محاسبه‌شده مؤید آن است که کاهش ۵۰ درصدی تعداد سلول‌ها در زمان انکوباسیون با داروی سدیم استازولامید نمی‌تواند با اثرگذاری به روی چرخه سلولی و توقف سلول‌ها در مرحله‌ای خاص از چرخه تقسم سلولی صورت گرفته باشد، در حالی‌که در مورد داروی دوکسوروبیسین توقف سلول‌ها در مراحل S و G_2/M (مجموعاً ۳۶/۴۸٪) دلیلی قانع‌کننده را در مورد ساز و کار اثرگذاری این دارو به روی سلول‌های T-47D ارائه می‌کند. غیرفعال‌سازی Cdc25 به‌عنوان فسفاتاز فعال‌کننده Cdk2 می‌تواند توضیح‌دهنده مدت زمان طولانی‌تر توقف سلول‌ها در مراحل S و G_2 و در نهایت طولانی‌ترشدن مدت زمان مضاعف شدن سلول‌های تیمارشده با دوکسوروبیسین باشد (۲۷). گزارش‌هایی مبنی بر وقوع فرآیند کاتاستروف میتوزی (MC) در پی فعال‌سازی کمپلکس سایکلین Cdc2/ B1، در زمانی‌که سلول‌ها در مراحل S و G_2 متوقف شده‌اند، وجود دارد (۲۹،۲۸). این موضوع نشان می‌دهد که وقوع پدیده MC به‌واسطه تحت تأثیر قرار گرفتن ساز و کارهای کنترل چرخه سلولی به‌ویژه در مرحله G_2 می‌باشد (۳۲-۳۰). در واقع کاتاستروف میتوزی در پی از کار افتادن فعالیت Cdc25 و توقف چرخه سلولی در مراحل S و G_2 روی می‌دهد که در نهایت می‌تواند با افزایش بی‌رویه سایکلین B1 و Cdc2 و القای بی‌موقع میتوز، مرگ سلولی را باعث گردد (۳۶-۳۳). با توجه به این توضیحات، در اینجا نیز کاتاستروف میتوزی به‌عنوان محتمل‌ترین دلیل وقوع مرگ سلولی در زمان انکوباسیون سلول‌ها با دوکسوروبیسین پیشنهاد می‌شود که اثبات نهایی آن هم‌اکنون در دستور کار آزمایشگاه قرار دارد.

نتیجه‌گیری

در کل، براساس یافته‌های فوق می‌توان گفت که نحوه اثرگذاری سدیم استازولامید می‌بایست از طریق راه‌اندازی مسیرهای سلولی به غیر از آپاپتوزیس و توقف چرخه سلولی اعمال گردد. فرآیندهایی که می‌توان در مورد آنها پیشنهادهایی را جهت انجام فعالیت‌های پژوهشی بعدی مطرح نمود. از جمله این پیشنهادها می‌توان به بررسی کمّی میزان نسخه‌برداری از ژن‌های دخیل در بروز فرآیند کاتاستروف میتوزی اشاره نمود که اثبات آن همانند بررسی ساز و کار اثرگذاری دوکسوروبیسین در دست بررسی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

اعتبارات این کار توسط صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) و حوزه پژوهشی دانشگاه تهران فراهم شده است که بدین‌وسیله مراتب تشکر مؤلفین از این دو نهاد اعلام می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. Javidannjad S, Hadjibabaei M. Medical Drugs Information: Generic Drugs of Iran. Tehran: University of Tehran Publication; 2001. p. 648-655. [Text in Persian]

2. Seydel JK. Sulfonamides, Structure-Activity Relationship, and Mode of Action. Structural Problems of the Antibacterial Action of 4-Aminobenzoic Acid (PABA) Antagonists. J Pharm Sci 1968;57(9):1455-1478.

3. Gennaro AR. Remigton's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. Pennsylvania; Mach Publishing Co, Eston; 1990. p. 1174-1180.

4. Mohan R, Banerjee M, Ray A, Manna T, Wilson L, Owa T, Bhattacharyya B, Panda D. Antimitotic Sulfonamides Inhibit Microtubule Assembly Dynamics and Cancer Cell Proliferation. Biochemistry 2006;45(17):5440-5449.

5. Fukuoka K, Usuda J, Iwamoto Y, Fukumoto H, Nakamura T, Yoneda T, Narita N, Saijo N, Nishio K. Mechanisms of Action of the Novel Sulfonamide Anticancer AgentsE7070 on Cell Cycle Progression in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Investigational New Drugs 2001;19(3):219-227.

6. Ozawa Y, Sugi NH, Nagasu T, Owa T, Watanabe T, Koyanagi N, Yoshino H, Kitoh K, Yoshimatsu K. E7070, a Novel Sulphonamide Agent with Potent Antitumour Activity in Vitro and in Vivo. European Journal of Cancer 2001;37(17):2275-2282.

7. Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Protease Inhibitors of the Sulfonamide Type: Anticancer, Antiin£ammatory, and Antiviral Agents. Medicinal Research Reviews 2003;23(5):535-558.

8. Owa T, Yoshino H, Okauchi T, Yoshimatsu K, Ozawa Y, Sugi NH, Nagasu T, Koyanagi N, Kitoh K. Discovery of Novel Antitumor Sulfonamides Targeting G_1 Phase of the Cell Cycle. J Med Chem 1999;42(19):3789-3799.

9. Yokoi A, Kuromitsu J, Kawai T, Nagasu T, Sugi NH, Yoshimatsu K, Yoshino H, Owa T. Profiling Novel Sulfonamide Antitumor Agents with Cell-Based Phenotypic Screens and Array-Based GeneE Analysis. Molecular Cancer Therapeutics 2002;1(4):275-286.

10. Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: Future Perspective in Topical Glaucoma Therapeutics. Int J Pharm 2002;248 (1-2):1-14.

11. Scozzafava A, Menabuoni L, Mincione F, Briganti F, Mincione G, Supuran CT. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Synthesis of Water-Soluble, Topically Effective, Intraocular Pressure-Lowering Aromatic/Heterocyclic Sulfonamides Containing Cationic or Anionic Moieties: Is the Tail More Important than the Ring? J Med Chem 1999;42(14):2641-2650.

12. Reiss WG, Oles KS. Acetazolamide in the Treatment of Seizures. Ann Pharmacother 1996;30(5):514-519.

13. Hauge A, Nicolaysen G, Thorensen M. Acute Effects of Acetazolamide on Cerebral Blood Flow in Man. Acta Physiol Scand 1983;117(2):233-239.

14. Schrier RW: Renal and Electrolyte Disorders. Boston: Little Brown and Co; 1976. p. 11-14.

15. Safarian Sh, Bagheri F, Moosavi-Movahedi AA, Amanlou M, Sheibani N. Competitive Inhibitory Effects of Acetazolamide Upon Interactions with Bovine Carbonic Anhydrase II. The Protein Journal 2007;26(6):371-385.

16. Chegwidden WR, Spencer IM. Sulfonamide Imhibitors of Carbonic Anhydrase Inhibit the Growth of Human Lymphoma Cells in Culture. Inflammopharmacology 1995;3:231-239.

17. Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008. Atlanta: American Cancer Society, Inc; 2007.

18. Nagata S. Apoptotic DNA Fragmentation. Exp Cell Res 2000;256(1):12-18.

19. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer Proteases. TIBS 1997;(22):299-306.

20. LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi E, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin Confers Resistance Against Cisplatin in Breast Cancer Cells by Activating Glutathione-S-Transferase. Carcinogenesis 2009;30(8):1298-1304.

21. Hsu CL, Yen GC. Induction of Cell Apoptosis in 3T3-L1 Pre-Adipocytes by Flavonoids Is Associated with Their Antioxidant Activity. Mol Nutr Food Res 2006;50(11):1072-1079.

22. Dowejko A, Bauer RJ, Muller-Richter UDA, Reichert TE. The Human Homolog of the Drosophila Headcase Protein Slows Down Cell Division of Head and Neck Cancer Cells. Carcinogenesis 2009;30(10):1678-1685.

23. Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin Activates p53-Caspase 2 Pathway and Causes Caspase-Mediated Cleavage of Cip1/p21 in Apoptosis Induction in Bladder Transitional-Cell Papilloma RT4 Cells: Evidence for a Regulatory Loop between p53 and Caspase 2. Carcinogenesis 2006;27(11):2269-2280.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Davis JW, Melendez K, Salas VM, Lauer FT, Burchiel SW. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Inhibits Growth Factor Withdrawal-Induced Apoptosis in the Human Mammary Epithelial Cell Line, MCF-10A. Carcinogenesis 2000;21(5):881-886.

25. Ling YH, el-Naggar AK, Priebe W, Perez–Soler R. Cell Cycle Dependent Cytotoxity, G2/M Phase Arrest and Distribuation of P34cdc2/cyclin B1 Activity induced by Doxorubicin in Synchoronized p388 Cells. Mol Pharmacol 1996;49(5):832-841.

26. Poter AJ, Gollahon KA, Palanca BJA, Harbert MJ, Choi YM, Moskovitz AH, Potter JD, Rabinovitch PS. Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle Phas Specifity of DNA Damage Induced by Radiation, Hydrogen Peroxide and Doxorubicin. Carcinogenesis 2002;23(3):389-401.

27. Park SS, Eom YW , Choi KS. Cdc2 and Cdk2 Play Critical Roles in Low Dose Doxorubicin-Induced Cell Death Through Mitot. Biochem Biophys Res Commun 2005;334:1014-21.

28. Ianzini F, Mackey MA. Spontaneous Premature Chromosome Condensation and Mitotic Catastrophe Following Irradiation of HeLa S3 Cells. Int J Radiat Biol 1997;72:409-421.

29. Mackey MA, Zhang XF, Hunt C, Sullivan S, Blum J, Laszlo A, Roti Roti JL. Uncoupling of M-Phase Kinase Activation from the Completion of S Phase by Heat Shock. Cancer Res 1996;56:1770-1774.

30. Heald R, McLoughlin M, McKeon F. Human Wee1 Maintains Mitotic Timing by Protecting the Nucleus from Cytoplasmically Activated cdc2 Kinase. Cell 1993;74:463-474.

31. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 Is Required to Prevent Mitotic Catastrophe after DAN Damage. Nature 1999;401:616-620.

32. Canman CE. Replication Checkpoint: Preventing Mitotic Catastrophe. Curr Biol 2001;11:R121-124.

33. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards Against Radioresistant DNA Synthesis. Nature 2001;410:842-847.

34. Ianzini F, Cherubini R, Mackey MA. Mitotic Catastrophe Induced by Exposure of V79 Chinese Hamster Cells to Low Energy Protons. Int J Radiat Biol 1999;75:717-723.

35. Ianzini F, Bertoldo A, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Lack of p53 Function Promotes Radiation-Induced Mitotic Catastrophe in Mouse Embryonic Fibroblast Cells. Cancer Cell Int 2006;6:11-18.

36. Ianzini FF, Domann FE, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Human Glioblastoma U87MG Cells Transduced with a Dominant Negative p53 Adenovirus Construct Undergo Radiation-Induced Mitotic Catastrophe. Rad Res 2007;168:183-192.

www.SID.ir