

The Effect of Diclofenac on Caspase-8 and Caspase-9 Activity in Cervical Cancer Cells (HeLa) in Cell Culture

Minoo Erfani¹, Masoud Ghorbani^{2*}, Rahim Ahmadi³

¹Department of Biochemistry, Faculty of Advanced Science & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Pasteur Institute of Iran the Production & Research Complex, Department of Research & Development, Tehran, Iran.

³Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran.

*Corresponding Author: Masoud Ghorbani; Pasteur Institute of Iran the Production & Research Complex, Department of Research & Development, Tehran, Iran.

Email: mghorbani2000@yahoo.com

Received: 7 Dec, 2017

Accepted: 30 Dec, 2017

Abstract

Background and Objectives: Studies have shown that drugs can affect on proliferation of cancer cells. The main aim of this study was to determine the effects of diclofenac on caspase-8 and caspase-9 activity in cervical cancer cells (HeLa) in cell culture.

Methods: In this experimental-laboratory study, HeLa cancer cells were purchased from Iran Cell Bank (Pasteur Institute, Tehran, Iran). HeLa cancer cells were cultured in DMEM culture media enriched with 10% FBS, stored in 6 well plate, and incubated for 24 hour. Then, cells were exposed to different concentrations of diclofenac and the viability of cells was evaluated by MTT assay, and the IC50 dose was calculated. The activity of Caspase-8 and caspase-9 on heLa cells, was assayed by ELISA method. The data were analyzed using one-way analysis of variance, Kolmogorov-Smirnov, and Tukey tests.

Results: Findings showed that 0.1, 1, and 10mg/ml doses of diclofenac decrease the viability of HeLa cancer cells compared to the control group ($p < 0.05$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively). The percentage of caspase-9 activity was significantly higher than the control group ($p < 0.05$). The caspase-8 activity had no significant change compared to the control group ($p > 0.05$).

Conclusion: The results of this study revealed that diclofenac has cytotoxic effects on HeLa cancer cells. Although this effect is different based on the dose used.

Keywords: Diclofenac; Caspase-8; Caspase-9.

تأثیر دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ و ۹ سلول‌های سرطانی دهانه رحم در محیط کشت سلولی

مینو عرفانی^۱، مسعود قربانی^{۲*}، رحیم احمدی^۳

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات نشان می‌دهند داروها بر تکثیر سلول‌های سرطانی تأثیر گذارند. در این مطالعه تأثیر دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) در محیط کشت سلولی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، سلول‌های HeLa از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور تهران، ایران) خریداری شدند، سپس در محیط DMEM غنی‌شده با 10% FBS کشت داده شده و در پلیت ۶ خانه‌ای در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در ادامه، سلول‌ها در مواجهه با غلظت‌های مختلف دیکلوفناک قرار گرفتند و میزان زنده‌مانی سلول‌ها با تست MTT بررسی و دوز IC50 محاسبه گردید. فعالیت کاسپاز-۸ و ۹ بر روی سلول‌های HeLa به روش ELISA ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه، کلموگروف-اسمیرنوف و آزمون تست توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: دوزهای ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دیکلوفناک (به ترتیب با $p < 0/05$ ، $p < 0/001$ ، $p < 0/001$) در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های HeLa گردید. درصد فعالیت کاسپاز-۹ نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). در مقابل، درصد فعالیت کاسپاز-۸ نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد دیکلوفناک دارای اثرات توکسیک بر رده سلولی سرطانی HeLa می‌باشد؛ اگرچه این اثرگذاری با توجه به دوز مورد استفاده متفاوت است.

کلید واژه‌ها: دیکلوفناک؛ کاسپاز-۸؛ کاسپاز-۹.

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیق و توسعه، کرج، تهران، ایران.

گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مسعود قربانی؛ مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیق و توسعه، کرج، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
mghorbani2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۹

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Erfani M, Ghorbani M, Ahmadi R. The effect of diclofenac on Caspase-8 and Caspase-9 activity in cervical cancer cells (HeLa) in cell culture. Qom Univ Med Sci J 2018;12(6):1-9. [Full Text in Persian]

دو ایزوفرم (ایزوفرم نوع ۱ و ۲) از اسیدآراشیدونیک کاتالیز می‌کند. (۱۰-۱۲). در همین راستا، مطالعات نشان داده‌اند بین برخی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی مانند سلکوکسیب و مهار آنزیم سیکلواکسیژناز-۲، ارتباطات قابل توجهی وجود دارد (۱۳-۱۵). برخی از پژوهش‌ها نیز نشان داده‌اند از داروی سلکوکسیب می‌توان جهت درمان در سرطان‌هایی از قبیل سرطان دهانه رحم، مری و پستان استفاده کرد (۱۶). درمقابل، در برخی مطالعات مشخص شده است مصرف طولانی‌مدت ایبوپروفن سبب بروز سرطان پستان می‌گردد (۱۷). بعضی تحقیقات دیگر نیز نشان داده‌اند مصرف آسپرین ممکن است منجر به بروز برخی از سرطان‌ها، از جمله سرطان پانکراس در زنان شود (۱۸). همچنین براساس نتایج برخی پژوهش‌ها، بین بعضی از داروها و آپوپتوز، ارتباطات معنی‌داری وجود دارد. در این راستا، برخی تحقیقات نشان داده‌اند دیکلوفناک ممکن است هم بر روی کاسپاز - ۸ و هم ۹ در سلول‌های سرطانی خون اثرگذار باشد (۱۹). در یک بررسی صورت‌گرفته بر روی سلول‌های کبدی نشان داده شد دیکلوفناک باعث القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی شده و بر روی مسیر خارج سلولی تأثیری ندارد (۲۰). از نظر مکانیسم احتمالی می‌توان به‌اختصار توضیح داد آنزیم سیکلواکسیژناز باعث تبدیل اسیدآراشیدونیک به پروستاگلاندین H₂ شده که پیش‌ساز سایر پروستاگلاندین‌ها است. فعال‌سازی سیکلواکسیژناز، پروستاگلاندین و فاکتور هسته‌ای مسیره‌ای کاپا (NFκB) می‌تواند باعث رشد و ترویج تومورهای سرطانی، از جمله تومورهای پستان، همچنین ایجاد مقاومت دارویی و متاستاز گردد. در این راستا، در بررسی برخی از داروها مانند دیکلوفناک و آسپرین (به‌عنوان عوامل ضدسرطان) مشاهده شده است دیکلوفناک و آسپرین با مهار سیکلواکسیژنازها، کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها، همچنین مهار NFκB در دوزهای خاص می‌تواند در درمان برخی از سرطان‌ها مؤثر باشند (۲۱). با گسترش روند شهرنشینی و عوامل شیمیایی و محیطی مضر در جامعه، ابتلا به سرطان گسترش وسیعی یافته است. از آنجایی که امروزه سرطان دهانه رحم از جمله سرطان‌های رایج در بین زنان است (۲۲)، و در ایران نیز این سرطان پس از سرطان پستان، شایع‌ترین بوده (۲۳)، همچنین به دلیل محدودیت مطالعات انجام‌گرفته

سرطان از جمله بیماری‌هایی است که نقش مهمی در مرگ‌ومیر انسان‌ها دارد. تومورها توده‌هایی از سلول‌ها هستند که در آنها تقسیم سلولی به‌صورت افزایشی و غیرقابل کنترل انجام می‌شود و می‌تواند به دیگر اعضای بدن نیز تهاجم کنند. از عوارض سرطان می‌توان به دردهای مداوم، تضعیف قوای جسمانی و روحی، تب دائمی و عفونت‌های مکرر و غیره اشاره کرد (۱). علت دقیق این پدیده کاملاً مشخص نیست، ولی احتمال دارد عوامل ژنتیکی یا مواردی که موجب اختلال در فعالیت سلول‌ها می‌شوند، در هسته سلول اشکال ایجاد کنند (۲). سرطان دهانه رحم، نوعی از سرطان بوده که از گردن رحم آغاز و بیشتر به شکل کارسینوم سلول سنگ‌فرشی مشاهده می‌شود. این سرطان در ابتدا معمولاً نشانه‌ای ندارد، ولی علائم بعدی آن می‌تواند به‌صورت خونریزی واژنی، درد لگن و یا فعالیت زناشویی دردناک بروز کند (۳). این سرطان از رشد فزاینده و نامنظم سلول‌های اپی‌تلیالی دهانه رحم و ریزش مداوم سلول‌ها ایجاد می‌شود و مهم‌ترین عامل آن، ویروس پاپیلومای انسانی است. همچنین سلول‌های سرطانی HeLa یکی از رده‌های سلولی مناسب برای تکثیر بوده که از ویژگی آنها، تکثیر نامحدود و تحمل پاساژهای طولانی می‌باشد (۴). دیکلوفناک سدیم یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی است که معمولاً از آن به‌عنوان کاهنده درد و التهاب در بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود (۵). پروستاگلاندین‌ها نیز از مهم‌ترین واسطه‌های التهاب هستند و مهار آنها توسط داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی صورت می‌گیرد (۶). همچنین آپوپتوز، روشی حفاظت‌شده و تحت کنترل ژن‌ها بوده که به‌منظور حذف سلول‌های ناخواسته در موجودات زنده به‌کار می‌رود و در بسیاری از مکانیسم‌های سیستم ایمنی نیز مداخله می‌کند (۷). کاسپازها به‌عنوان مهم‌ترین عضو آپوپتوز و هماهنگ‌کننده مسیر مرگ (در دو دسته آغازگر و اجرایی) باعث تخریب پروتئین‌ها یا فعال‌سازی کاسپازهای دیگر می‌شوند (۸). میتوکندری نیز از اصلی‌ترین اندامک‌های فعال در مرگ سلولی شناخته شده که با آزادسازی مولکول‌های فعال‌کننده خودکشی سلولی، در این فرآیند شرکت می‌کند (۹). همچنین آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) به‌عنوان یک آنزیم القایی در موارد التهاب و سرطان، سنتز پروستاگلاندین‌ها را به‌صورت

برای گروه کنترل منفی (عدم مواجهه با دارو) نیز به‌طور مجزا یک ردیف از چاهک‌ها در نظر گرفته شد، سپس مجدداً پلیت به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور گذاشته شد تا در مرحله نهایی و در روز سوم تحت رنگ‌سنجی MTT قرار گیرد. در روز سوم پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت رویی و دارو دور ریخته شد و ۱۰۰ μ l رنگ MTT در تاریکی به پلیت‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. در ادامه، محیط رویی چاهک‌ها خارج و ۱۰۰ μ l ماده DMSO به چاهک‌ها اضافه گردید تا فورمازان حاصل شود، سپس به مدت ۲۰ دقیقه، پلیت بر روی شیکر قرار داده شد (به‌علت واکنش DMSO با نور، در این مرحله بایستی به شکلی پلیت پوشانده شود تا تحت تأثیر نور قرار نگیرد). و در پایان، میزان شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه میکروپلیت Rider (مدل ELX 808) قرائت گردید. داده‌های حاصل از دستگاه میکروپلیت Rider با استفاده از نرم‌افزار تحلیل آماری SPSS نسخه ۲۰ و Excel، تست کلموگروف-اسمیرنوف (برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها)، آزمون واریانس یک‌طرفه (با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها) و تست توکی (برای مقایسه بین گروهی داده‌ها) آنالیز شدند و سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد (این تست ۸ بار تکرار گردید). جهت بررسی فعالیت کاسپاز-۸ و ۹ با استفاده از روش‌ها و مواد مشروحه در کیت استاندارد اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز، پس از افزودن دوز IC50، دیکلوفناک در سلول‌های سرطانی HeLa به روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام تست MTT و مقایسه نتایج، دوز IC50 محاسبه گردید. دوز IC50، بیانگر غلظتی از دارو بوده که در آن غلظت ۵۰٪ از فعالیت بیولوژیکی سلول سرطانی دهانه رحم در مقایسه با گروه کنترل مهار می‌شود. بررسی اثر دوز ۵۰ IC دیکلوفناک بر کاسپاز-۸ و ۹ در روز اول پاساژ سلولی صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا محیط کشت رویی دور ریخته شد، سپس سلول‌ها با ۲ میلی‌لیتر بافر PBS شست‌و‌شو داده شدند. در ادامه، ۱ میلی‌لیتر محلول آنزیم تریپسین به فلاسک اضافه گردید و فلاسک به مدت ۲-۳ در داخل انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت تا سلول‌ها از هم جدا شوند. پس از آن در زیر میکروسکوپ اینورت، فعالیت سلول‌ها بررسی شد.

در این زمینه و با توجه به اینکه نتایج پژوهش‌ها درخصوص موضوع این تحقیق در مواردی ضد و نقیض می‌باشد (۱۷، ۱۸)؛ در این مطالعه به بررسی اثرات دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) در محیط کشت سلولی پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، سلول‌های HeLa از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور تهران، ایران) خریداری شدند، سپس در محیط DMEM غنی‌شده با ۱۰٪ FBS کشت داده شده و در پلیت ۶ خانه‌ای در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. ابتدا برای پاساژ سلولی، محیط کشت رویی خارج و سلول‌ها با ۲ میلی‌لیتر PBS به آرامی شست‌و‌شو داده شدند. سپس بافر PBS از فلاسک خارج گردید. در ادامه، ۰/۵ میلی‌لیتر تریپسین ۲۵٪ به فلاسک افزوده شد و فلاسک در داخل انکوباتور CO₂ به مدت ۲-۳ دقیقه قرار گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل تریپسین شوند و از سطح فلاسک جدا گردند. برای خارج کردن تریپسین، به میزان ۳ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM تازه به فلاسک اضافه و چندین بار پیپتاژ شد، سپس محتویات فلاسک وارد یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری شد و داخل دستگاه سانتریفوژ (با دور ۱۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. پس از خروج مایع رویی حاوی تریپسین، ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM داخل لوله فالکون ریخته شد و چندین بار پیپتاژ گردید تا تجمعات سلولی تشکیل شده باز شوند. در این مرحله، سوسپانسیون سلولی آماده با استفاده از تریبان‌بلو رنگ‌آمیزی و شمارش سلولی انجام شد. برای انجام تست MTT، از پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۲۰۰ μ l سوسپانسیون سلولی حاوی تقریباً ۵۰۰۰ سلول ریخته شد، سپس پلیت ۹۶ خانه‌ای در داخل انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل در هر چاهک رشد کنند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و دور ریختن محیط رویی، رقت‌های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی دیکلوفناک که قبلاً ساخته شده بود، به سلول‌ها اضافه گردید (۱۰۰ μ l از هر رقت از دارو به یک ردیف از چاهک‌ها اضافه شد و برای هر رقت ۸ چاهک در نظر گرفته شد).

درون هر میکروتیوپ ریخته شد، سپس هر دو میکروتیوپ در داخل دستگاه میکروسانتریفوژ (به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰) قرار گرفتند. مایع رویی حاوی تریپسین خارج و به هر کدام از میکروتیوپ‌ها، ۵۰۷ بافر لیزکننده افزوده شد و هر دو میکروتیوپ به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا انکوباسیون صورت گیرد. بعد از گذشت این مدت زمان، برای هر کدام از میکروتیوپ‌ها (به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰) میکروسانتریفوژ انجام گرفت، سپس عصاره‌های سیتوزولی به دو میکروتیوپ جدید دیگر انتقال داده شدند و مجدداً روی یخ قرار گرفتند. در ادامه، یک میکروتیوپ شیشه‌ای دیگر برداشته و به‌ازای هر میکروتیوپ، ۵۰۷ بافر واکنش اضافه شد (۱۰۰ ل بافر واکنش به‌ازای هر دو میکروتیوپ) و به‌ازای هر ۵۰۷ بافر واکنش، ۰/۵۸ DTT اضافه گردید (به‌علت وجود دو میکروتیوپ، ۱۸ DTT افزوده شد)، سپس نیمی از محتویات میکروتیوپ شیشه‌ای به میکروتیوپ کنترل و نیمی دیگر به میکروتیوپ گروه تیمار اضافه گردید. در مرحله بعد، به هر کدام از میکروتیوپ‌ها ۰/۵۸ سوبسترای مربوط به کاسپاز-8 افزوده شد و در ادامه، میکروتیوپ‌ها در داخل انکوباتور (به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند تا انکوباسیون به‌طور کامل انجام شود. بعد از گذشت این مدت، محتوی هر یک از میکروتیوپ‌ها به دو ستون مجزا از پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شدند و OD (Optical Density) مربوط به هر دو گروه در طول موج ۴۰۰ نانومتر قرائت گردید. برای بررسی اثر دوز IC₅₀ دیکلوفناک بر روی کاسپاز-9، تمامی مراحل مانند کاسپاز-8 انجام شد و تنها تفاوت مربوط به مرحله آخر و اضافه کردن سوبسترای مورد نظر بود. در مرحله پایانی، به هر کدام از میکروتیوپ‌ها، ۰/۵۸ سوبسترای مربوط به کاسپاز-9 اضافه و بعد از گذشت مراحل ذکر شده، OD مربوط به کاسپاز-9 قرائت گردید. داده‌های حاصل از دستگاه Eliser rider و دستگاه میکروپلیت Rider با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و Excel، تست کلموگروف - اسمیرنوف (برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها)، آزمون واریانس یک‌طرفه (با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها)، تست توکی (برای مقایسه بین گروهی داده‌ها) و آزمون تی مستقل آنالیز شدند.

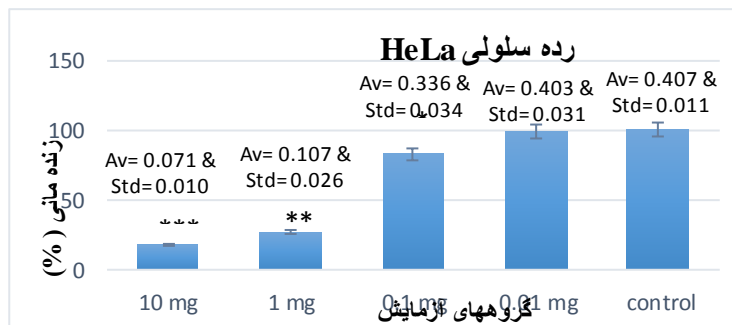
در مرحله بعد، ۳ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM تازه درون فلاسک ریخته شد و چندین بار پیپتاژ صورت گرفت. سپس محتویات فلاسک درون لوله فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و داخل دستگاه سانتریفوژ (با دور ۱۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. در ادامه، مایع رویی فالكون (حاوی تریپسین و سلول‌های مرده)، خارج و ۶ میلی‌لیتر محیط DMEM درون لوله فالكون ریخته شد و چندین بار پیپتاژ گردید تا تجمعات سلولی تشکیل شده بازگردد. پس از آن، محتویات درون لوله فالكون وارد پلیت ۶ خانه‌ای گردید. از محتویات درون لوله فالكون، در هر چاهک ۹۰۰۷ ریخته شد، سپس ۱۰۰۷ محلول FBS به هر چاهک اضافه گردید. با شمارش سلولی با استفاده از تریپان‌بلو، حدود ۵×۱۰^۵ سلول در هر چاهک کشت داده شد. بعد از کشت سلول‌ها، پلیت ۶ خانه‌ای در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا ۵۰٪ سطح چاهک‌ها پر شوند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و دو برابر شدن سلول‌ها در چاهک‌ها، ابتدا پیش از انجام هر کاری، پلیت ۶ خانه‌ای در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی گردید، سپس محیط قبلی از روی هر خانه خارج و ۴۰۰۷ محیط کشت تازه و FBS 100۷ به تمام خانه‌ها افزوده شد و در مجموع، حجم هر چاهک به ۵۰۰۷ رسانده شد. در ادامه، سه خانه برای گروه کنترل (عدم مواجهه با دارو) و سه خانه برای گروه تیمار در نظر گرفته شد. در گروه تیمار به هر خانه، ۵۰۰۷ از داروی دیکلوفناکی که قبلاً تهیه شده بود و در فریزر ۲۰- درجه نگهداری می‌شد، و برای سه خانه کنترل نیز ۵۰۰۷ محیط کشت اضافه گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت مجدداً پلیت در داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت این زمان و خروج سلول‌ها از انکوباتور، پلیت ۶ خانه‌ای در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی گردید. در مرحله بعدی، محیط رویی هر ۶ خانه خارج شد، سپس به هر خانه ۱ میلی‌لیتر بافر PBS اضافه و سلول‌ها شست‌و‌شو داده شدند. در ادامه، محلول تریپسین (به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۲-۱ دقیقه، پلیت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل تریپسینه شوند. برای گروه کنترل و تیمار، دو میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری به‌صورت مجزا در نظر گرفته شد و محتویات گروه کنترل و تیمار به‌طور جداگانه

غلظت‌های ۱۰، ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی دیکلوفناک به ترتیب دارای اثرات سمی به میزان ۷۱، ۹۰ و ۱۸٪ بودند که این اختلاف‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود (به ترتیب با $p < 0/001$ ، $p < 0/001$ و $p < 0/05$)، اما این دارو در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای اثرات سمی به میزان ۳٪ بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود؛ به عبارتی دیگر، تنها غلظت‌های ۱۰، ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثرات توکسیک بر رده سلولی HeLa داشتند (نمودار شماره ۱).

سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد (در تست فعالیت کاسپاز ۳ $n=3$ در نظر گرفته شد).

یافته‌ها

در این مطالعه نمودار شماره ۱، نشان‌دهنده نتایج به‌دست‌آمده از اثرات غلظت‌های مختلف داروی دیکلوفناک بر رده سلولی HeLa می‌باشد.

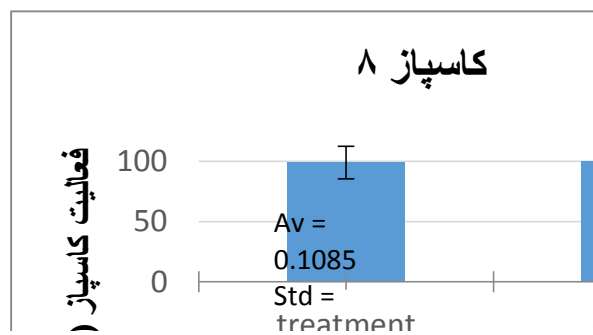


نمودار شماره ۱: تأثیر سمیت غلظت‌های مختلف داروی دیکلوفناک بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر رده سلولی HeLa در مقایسه با گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین درصد زنده‌مانی \pm درصد انحراف معیار بیان شده‌اند.

***، **، * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (به ترتیب با $p < 0/05$ ، $p < 0/001$ و $p < 0/001$) می‌باشد.

همچنین درصد فعالیت کاسپاز-۸ در مقایسه با گروه کنترل دچار تغییر معنی‌داری نبود (نمودار شماره ۲).

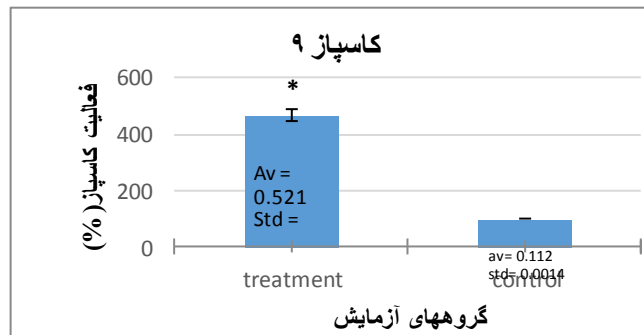
در نمودار شماره ۲، نتایج به‌دست‌آمده از اثر دوز IC_{50} دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ در رده سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲: اثر دوز IC_{50} دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ در مقایسه با گروه کنترل.

درصد فعالیت کاسپاز-۹ در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشته است ($p < 0/05$) (نمودار شماره ۳).

در نمودار شماره ۳ نتایج مربوط به تأثیر دوز IC_{50} دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۹ در رده سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) نشان داده شده است.



نمودار شماره ۳: اثر دوز ۰.۳ IC دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۹. * نشانگر تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است ($p < 0.05$).

بحث

و هم بر روی کاسپاز اولیه-۹ در سلول سرطانی خون تأثیرگذار باشد و از این طریق سبب القای آپوپتوز گردد (۱۹). درمقابل، برخی تحقیقات صورت گرفته بر روی سرطان پستان نشان می‌دهند داروی سلکوکسیب باعث القای آپوپتوز از طریق مسیر خارج سلولی می‌شود، اما بر روی مسیر میتوکندریایی، تأثیر خاصی ندارد (۲۴). در یک بررسی صورت گرفته بر روی سلول‌های کبدی نشان داده شد دیکلوفناک باعث القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی شده و بر روی مسیر خارج سلولی نیز تأثیر خاصی ندارد (۲۰). از این رو در مطالعه حاضر به بررسی اثرات دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ و ۹ بر روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم در محیط کشت سلولی در حیطه سلولی و از دیدگاه سیتوتوکسیسیته پرداخته شد و با توجه به کمبود امکانات مالی و تجهیزات آزمایشگاهی، امکان پژوهش در حوزه مولکولی فراهم نشد؛ بنابراین امید است در آینده انجام مطالعه در این زمینه و در سطح مولکولی برای محققین فراهم گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد داروی دیکلوفناک دارای اثر توکسیک بر روی سلول‌های سرطانی HeLa در محیط کشت سلولی می‌باشد؛ اگرچه این اثرگذاری با توجه به دوز مورد استفاده متفاوت است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌فناوری جاوید و دکتر وحید عسگری که در اجرای این پژوهش همکاری صادقانه‌ای داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد داروی دیکلوفناک با غلظت‌های ۱۰، ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل، دارای اثر توکسیک بر روی سلول‌های سرطانی HeLa در محیط کشت سلولی می‌باشد. درمقابل، این دارو با دوز ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر سمی (به میزان ۳٪) دارد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. همچنین با بررسی دوز IC50 دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۸ بر روی سلول‌های سرطانی HeLa ملاحظه گردید درصد فعالیت کاسپاز-۸ نسبت به گروه کنترل، دچار تغییر معنی‌داری نشده است؛ درحالی‌که با بررسی دوز IC50 دیکلوفناک بر فعالیت کاسپاز-۹ مشاهده گردید درصد فعالیت کاسپاز-۹ نسبت به گروه کنترل، دچار افزایش معنی‌داری شده است. در راستای این نتایج، برخی تحقیقات نشان داده‌اند بین برخی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی مانند سلکوکسیب و مهار انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲، ارتباطات قابل توجهی وجود دارد (۱۵-۱۳). همچنین در بعضی دیگر از پژوهش‌ها مشخص شده است داروی سلکوکسیب جهت افزایش پاسخ به درمان در سرطان‌هایی از قبیل سرطان دهانه رحم، مری و پستان به کار می‌رود (۱۶). درمقابل، برخی مطالعات نشان داده‌اند مصرف طولانی‌مدت برخی از داروها مانند ایبوپروفن سبب بروز برخی از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان می‌شود (۱۷). طبق نتایج بعضی تحقیقات مصرف آسپرین نیز ممکن است منجر به بروز برخی از سرطان‌ها مانند سرطان لوزالمعده در زنان گردد (۱۸)؛ لذا در مورد اثرات داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی و درمان سرطان، نتایج ضد و نقیضی وجود دارد. همچنین مطالعات نشان می‌دهند دیکلوفناک ممکن است هم بر روی کاسپاز اولیه-۸

References:

1. Steven G, Silvere B. Principle's and practice of surgical pathology. NewYork: Chorchill Livingstone Inc; 1990.
2. Hanahan D1, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100(1):57-70. PubMed
3. Roberts CC1, Tadesse AS, Sands J, Halvorsen T, Schofield TL, Dalen A, et al. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. J Clin Virol 2006;36(4):277-82. PubMed
4. Moore MR1. Opposed to the being of Henrietta: Bioslavery, pop culture and the third life of HeLa cells. Med Humanit 2017;43(1):55-61. PubMed
5. Lee J1, Burke DT. Lower gastrointestinal bleeding associated with diclofenac topical patch in a patient with colonic mass and on antiplatelet therapy for atrial fibrillation. Am J Phys Med Rehabil 2014;93(11):1014-7. PubMed
6. Erdinc AM, Dincer B. Perception of pain during orthodontic treatment with fixed appliances. Eur J Orthod 2004;26(1):79-85. PubMed
7. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: Programmed cell death. J Qazvin Univ Med Sci 2013;17(3):48-57.[Full Text in Persian] Link
8. Steller H. Artificial death switches: Induction of apoptosis by chemically induced caspase multimerization. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(10):5421-2. PubMed
9. Hengartner MQ. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000;407(6805):770-6. PubMed
10. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner B, Khan KN, Masferrer J, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer 2000;89(12):2637-45. PubMed
11. O'banion M. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. Crit Rev Neurobiol 1999;13(1):45-82. PubMed
12. Fu J-Y, Masferrer J, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. J Biol Chem 1990;265(28):16737-40. PubMed
13. Soo RA, Wu J, Aggarwal A, Tao Q, Hsieh W, Putti T, et al. Celecoxib reduces microvessel density in patients treated with nasopharyngeal carcinoma and induces changes in gene expression. Ann Oncol 2006;17(11):1625-30. PubMed
14. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE. Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. Oncol Rep 2000;7(6):1377-81. PubMed
15. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 2000;342(26):1946-52. PubMed
16. Govindan R, McLeod H, Mantravadi P, Fineberg N, Helft P, Kesler K, et al. Cisplatin, fluorouracil, celecoxib, and RT in resectable esophageal cancer: Preliminary results. Oncology (Williston Park, NY) 2004;18(14 Suppl 14):18-21. PubMed
17. Marshall SF, Bernstein L, Anton-Culver H, Deapen D, Horn-Ross PL, Mohrenweiser H, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk by stage and hormone receptor status. J Natl Cancer Inst 2005;97(11):805-12. PubMed
18. Schernhammer ES, Kang JH, Chan AT, Michaud DS, Skinner HG, Giovannucci E, et al. A prospective study of aspirin use and the risk of pancreatic cancer in women. J Natl Cancer Inst 2004;96(1):22-8. PubMed
19. Inoue A, Muranaka S, Fujita H, Kanno T, Tamai H, Utsumi K. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: Dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome and caspase pathway. Free Radic Biol Med 2004;37(8):1290-9. PubMed

20. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol* 2003;66(11):2155-67. PubMed
21. Kastrati I, Litosh VA, Zhao S, Alvarez M, Thatcher GR, Frasor J. A novel aspirin prodrug inhibits NFκB activity and breast cancer stem cell properties. *BMC Cancer* 2015;15:845. PubMed
22. Ramondetta L. What is the appropriate approach to treating women with incurable cervical cancer? *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(3):348-55. PubMed
23. Karimi Zarchi M, Akhavan. A, Fallahzadeh H, Gholami H, Dehghani A, Teimoori S. Outcome of cervical cancer in Iranian patients according to tumor histology, stage of disease and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11(5):1289-91. PubMed
24. Ju RJ, Li XT, Shi JF, Li XY, Sun MG, Zeng F, et al. Liposomes, modified with PTD (HIV-1) peptide, containing epirubicin and celecoxib, to target vasculogenic mimicry channels in invasive breast cancer. *Biomaterials* 2014;35(26):7610-21. PubMed