دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم– شماره ۹۵
آبان ۱۳۹۰

وصول: ۱۳۹۰/۵/۱۸
آخرین اصلاحات: ۱۳۹۰/۸/۱۵
پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۶

بررسی اثرپکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) و دوکسوروبیسین برقدرت زیستایی، مورفولوژی و چرخه سلولی دردو دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی،DU-145 وLNCaP

نویسندگان: نجمه تهرانیان[۱]، حوری سپهری*[۲]، فیروزه بیرامی جمال[۳]، پروین مهدی‌پور[۴]، آرش حسین‌نژاد[۵]، عبدالفتاح صراف‌نژاد[۶]، ابراهیم حاجی‌زاده[۷]، لادن دلفی[۸]

۱- دانشجوی دکترا، گروه فیزیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران.
۲- استاد، گروه فیزیولوژی پردیس علوم دانشگاه تهران.
۳- دانشیار، گروه ژنتیک، پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
٤- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران.
۵- استادیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات غدد.
٦- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
۷- دانشیار، گروه آمارحیاتی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.
۸- دانشجوی دکترای گروه فیزیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران.
*نویسنده مسول:دکتر حوری سپهری **sepehri@khayam.ut.ac.ir E-mail:**

چکیده:

مقدمه و هدف: سرطان پروستات از شایعترین سرطانها در دنیا بشمار می رود بطوریکه در بین مردان دومین علت مرگ ناشی از سرطان می باشد. دراین پژوهش اثر *MCP(پکتازول) و دوکسوروبیسین (Dox)* بر کاهش میزان زیستایی و نیز تاثیر آن بر آپوپتوز و چرخه سلولی در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی یعنی DU-145 و LNCaP مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: سلولهای DU-145 وLNCaP باغلظتهای مختلف MCP و دوکسوروبیسین و یا ترکیبی از دو دارو مورد تیمار قرار گرفتند.زیستایی سلولها با استفاده‌از روش MTT،مورفولوژی سلولی با میکروسکوپ معکوس و رنگ آمیزی گیمسا و پیشرفت سیکل سلولی نیز از طریق روش فلوسایتومتری و با استفاده‌از نرم افزار فلوماکس بررسی شد.

نتایج : در سلولهای DU-145 و LNCaP تیمار بادوز IC50 دوکسوروبیسین،سبب چروکیده شدن سلولها و تیمار با دوز IC50 پکتازول موجب گرانوله و کوچک شدن سلولها شد درحالی‌که تیمار با ترکیب دو داروی پکتازول و دوکسوروبیسین باعث هم چروکیده شدن وهم گرانوله و کوچک شدن سلولها شد و در سلولهای DU-145 قدرت زیستایی سلولها از میزان ۴۷,۰۴٪ در تیمار با Dox به تنهایی تا میزان ۲۹,۳۶٪ در تیمار با ترکیب دو داروی MCP و Dox کاهش نشان داد . در سلولهای LNCaP قدرت زیستایی سلولها از میزان ۴۷,۰۴٪ در تیمار با Dox به تنهایی تا میزان ۲۹,۳۶٪ در تیمار با ترکیب دوکسوروبیسین گردد. در سلولهای DU-145 ترکیب دو دارو سبب توقف چرخه سلولی در مرحله Sub G1 وآپوپتوز و در سلولهای LNCaP موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G2M مهار شد.

نتیجه‌گیری : MCP سبب افزایش اثر دوکسوروبیسین در کاهش زیستایی سلولهای DU-145 از طریق آپوپتوز و در سلولهای LNCaP ازراه توقف چرخه سلولی می شود.

واژگان کلیدی: سرطان پروستات، دودمان سلولی سرطانی DU-145 و LNCaP، سیکل سلولی وآپوپتوز، MCP (پکتازول)، دوکسوروبیسین

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سرطان پروستات از شایعترین سرطانها در دنیا بشمار می‌رود بطوریکه در بین مردان دومین علت مرگ ناشی از سرطان می‌باشد (۱). سرطان پروستات در واقع توموری وابسته به آندروژن است که محرومیت از آندروژن اغلب بعنوان اولین درمان برای بیماران دارای سرطان پیشرفته بکار می‌رود اما در۲۰٪ موارد بیماران نسبت به درمان مقاوم می‌گردند به طوری که در مدت سه سال سرطان آنها تبدیل به کارسینومای غیروابسته به آندروژن می‌گردد که سریعامنجر به مرگ می‌شود (۲). چرا که سلولهای وابسته به آندروژن نظیرLNCaP و غیروابسته به آندروژن مانند DU-145 می‌توانند در ایجاد آن دخیل باشند (۳،٤،٥). MCP به نظر می‌رسد در پیشگیری و درمان سرطان متاستاتیک خصوصا تومورهای توپر نظیر ملانوما و سرطانهای پروستات,کولون و پستان مؤثر باشد.دانشمندان معتقدند که MCP با استفاده از مهار دو فرآیند کلیدی دخیل در پیشرفت سرطان، عمل می‌نماید، آنژیوژنز و متاستاز (٦،۷). پکتازول نوع خاصی از MCP است که تولید آن با استفاده ازشرایط خاصی تحت کنترل دقیق وزن مولکولی و درجه استریفیکیشن انجام پذیرفت و در حال حاضر تنها براند MCP است که برای مطالعات کلینیکی برروی انسان مورد تایید قرار گرفته است (۸). امروزه این ماده را بعنوان کاهش دهنده آنتی ژن پروستات[۲] (PSA) در بیماران مبتلا به سرطان پروستات می‌شناسند (۹،۱۰،۱۱). برای درمان سرطانها راههای مختلف درمانی وجود دارد از جمله شیمی‌درمانی که اغلب برای کنترل و درمان سرطان پروستات به کار می‌رود از جمله داروهای شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین[4] است که دارای طیف وسیع درمانی در انواع سرطانها از جمله سرطان پروستات می‌باشد. دوکسوروبیسین سبب تحریک آپوپتوز در سلولهای سرطانی پروستات می‌گردد (۱۲،۱۳). آپوپتوز یکی از انواع مرگ برنامه ریزی شده سلول می باشد (۹). درمان با دوز بالای دوکسوروبیسین سبب شکستن DNA در بیش از ٤۰٪ سلولهای LNCaP به شکل وابسته به دوز و در دوزهای پایین سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 از طریق مسیر P53 می‌شود (١٤). چرخه سلولی فرایندی است که عبور از یک مرحله چرخه سلولی به مرحله دیگر توسط پروتئنهای مختلف از جمله کینازهای وابسته به سیکلین (CDK) با حداقل ۹ نوع (CDK1-CDK) پروتئنهای تنظیمی‌چرخه سلولی و پروتئنهای مهارکننده‌های سیکلینی (CKI) به عنوان تنظیم کننده‌های منفی آن با دو زیر مجموعه خانواده INK4 و Cip/Kip شامل پروتئنهای p21,p27 و p57 به شمار می‌رود (۱۵). در استفاده از دوکسوروبیسین در بیماران مبتلا به سرطان پروستات به علت دارا بودن عوارض جانبی نظیر مهار سیستم ایمنی و کاردیومیوپاتی و اثر روی سلولهای طبیعی دارای محدودیت در دوز مصرفی می‌باشد (۱۳). در پژوهش‌های اخیر نیز تمایل بر این است که این دارو همراه با داروهای گیاهی و طبیعی مصرف گردد تا در صورت امکان مقدار دوز این دارو کاهش یابد (۱۳،١٤) که در این راستا درمان ترکیبی MCP با Dox مورد توجه قرار گرفته است (١٦). مکانیسم عمل دقیق MCP هنوز کاملا شناخته شده نیست اما آزمایش‌ها نشان می‌دهد که MCP می‌تواند موجب توقف چرخه سلولی و آپوپتوز سلول‌های سرطانی گردد (۹). طبق تحقیقات انجام شده پکتازولMCP می‌تواند سبب تحریک آپوپتوز و مهار پرولیفراسیون در سلولهای سرطانی پروستاتی وابسته و غیر وابسته به آندروژن در انسان و موش گردد.Jan Yan در سال ۲۰۱۰ گزارش نمود که MCP می‌تواند سبب مهار پرولیفراسیون و آپوپتوز در رده‌های سلولی LNCaP,PC3,CASP2.1,CASP1.1 و BPH-1 گردد که از طریق مهارفعالیت MAP Kinase، افزایش سطح بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bim و تحریک کاسپاز -۳ در سلولهای PC3 و CASP1.1 عمل می‌نماید (١٦).

هدف این پژوهش بررسی اثر MCP (پکتازول) و دوکسوروبیسین (Dox) بر کاهش میزان زیستایی و نیز تاثیر آن بر آپوپتوز و چرخه سلولی در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی یعنی DU-145 و LNCaP است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

دودمانهای سلولی و مواد:

دو دودمان سلولی DU-14 و،LNCaP سرطان پروستات انسانی از بانک سلولی ایران (NCBI) تهیه شدو در ۱٦٤۰–RPMI و سرم جنین گاو (FBS) ال–گلوتامین ۱درصد ،پنی سیلین IU/ml ۱۰۰، استرپتومایسین 100µg/ml در دمای oc ۳۷ و co۲ ۵درصد و رطوبت ۹۵–90درصد کشت دادهشدmg..۱۰ محلول استوک MCP،10mg/mh از Econugenies.cost.Loismo و دوکسوروبیسین از FBEWE pharma تهیه شد.

تعیین مورفولوژی و اندازه‌گیری مهار رشد سلولی با استفاده از روش MTT

سلول‌های DU-145 وLNCaP با تراکم 1X10۵ سلول در هر چاهک(well) در پلیت ۹٦ تایی کشت دادهشد.سلول‌ها در فاز رشد بعد از یک شبانه روز نگهداری با تعویض محیط در غلظت‌های مختلفMCP (mg/ml 5 -3-۱– (0.5 و دوکسوروبیسین با غلظت‌های (- nM 500 – 250 - 100 – 50 – ۱۰۲۵) یا ترکیبی از هر دو دارو در ٤۸،۲٤ و ۷۲ ساعت تحت تیمار قرار دادهشدند و در انتهای هر مرحله، در ابتدا با استفاده از میکروسکوپ معکوس از سلول‌ها عکسبرداری و سپس، زیستایی سلولی با استفاده از روش MTT در طول موجnM ۵۷۰ بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.غلظت مورد نیاز جهت مهار رشد ۵۰درصد سلول‌ها (IC50) با استفاده از منحنی Dose Response تعیین شد.

چرخه سلولی

سلول‌ها پس از کشت و تیمار با محیطهای مختلف (Dox،MCPوMCP/Dox) و با محلول متوقف کننده در دمای ٤oc برای دو ساعت در محیط بدون نور قرارگرفتند سپس ماده PIبه آنها اضافه شدو نیم ساعت در دمای oc ۳۷ قرارگرفتند و سپس چرخه سلولی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری و برنامه فلوماکس بررسی‌شد.

روشهای آماری

روش ANOVA یکطرفه با(P<0.05) انجام‌شد تکراربرای هر آزمایش حداقل سه بار انجام شده‌است.برای انجام تجزیه‌وتحلیل از نرم‌افزار SPSS 13 استفاده‌شد.

نتایج

مورفولوژی سلول‌های DU-145

سلول‌های DU145 بلافاصله پس از قرار گیری در محیط کشت و قبل از چسبیدن به کف منظره ای گرد و شناور نشان‌می‌دهند

این سلول‌ها پس از ۲٤ ساعت قرارگرفتن در محیط کشت در صورت مناسب‌بودن شرایط به کف فلاسک می‌چسبند و شروع به تقسیم شدن می‌کنند. (شکل ۱)

سلول‌های LNCaP بلافاصله پس از قرار گیری در محیط کشت و قبل از چسبیدن به کف ظرف گرد و شناور هستند.

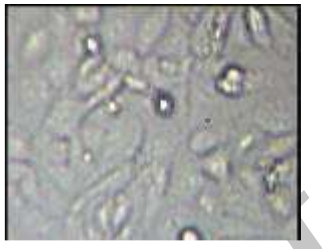
این سلول‌ها پس از ۲٤ ساعت قرارگرفتن در محیط کشت مناسب به کف فلاسک می‌چسبند و شروع به تقسیم شدن می‌کنند، از نظر مورفولوژی کشیده و دارای زواید می‌باشند. در این زمان اغلب سلول‌های در حال تقسیم شدن در بین آنها مشاهده می‌گردند (شکل٤).

Archive of SID

www.SID.ir

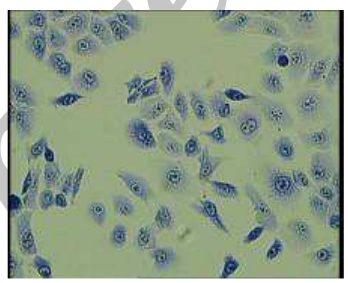
شکل۱- سلول‌های DU145 پس از ٢٤ ساعت قرار گیری در محیط کشت. سلول‌ها به کف ظرف چسبیده اند و در حال دست و پا بازکردن می‌باشند. سلول‌های در حال تقسیم گرد هستند. (بزرگ نمایی X ۲۵۰).

سلول‌ها پس از سپری شدن مدت ٤٨ ساعت کاملا" به کف فلاسک چسبیده و کشیده شده اند و سلول‌های در حال تقسیم به وفور در بین آنها یافت می‌شود. (شکل2)



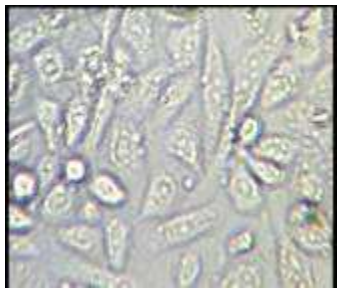
شکل ۲- سلول‌های DU145 پس از ٤٨ ساعت قرار گیری در محیط کشت(بزرگ نمایی X ۲۵۰).

سلول‌ها به‌طور کامل به کف ظرف چسبیده و کشیده شده اند..سلول‌ها ظاهری سنگفرشی را نشان‌می‌دهند.



شکل-۳- سلول‌های DU145 پس از رنگ آمیزی گیمسا. چند هستکی‌بودن این سلول‌ها پس از این رنگ آمیزی کاملا" مشخص است. (بزرگ نمایی X ۲۰)

مورفولوژی سلول‌های LNCaP



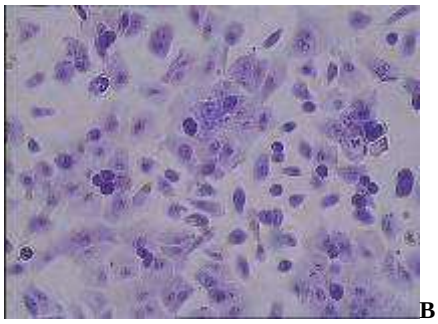
A

شکل 4-A – سلول‌هایLNCaP پس از ٢٤ ساعت قرار گیری در محیط کشت.

.سلول‌هایLNCaP به کف ظرف چسبیده اند و در حال دست و پا بازکردن می‌باشند. سلول‌های در حال تقسیم گرد هستند. (بزرگ نمایی X ۲۵۰).

Archive of SID

www.SID.ir



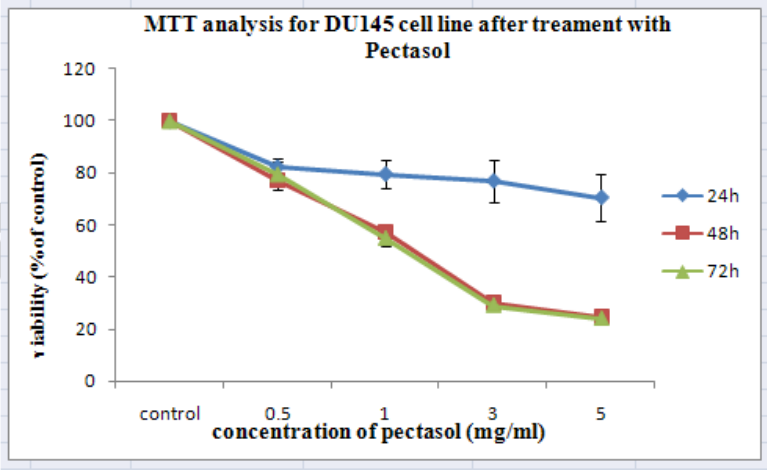
B

شکل4-B – در تصویر سمت راست، مورفولوژی طبیعی سلول‌های LNCaP، بوسیله رنگ آمیزی گیمسا، نشان‌داده‌شده‌اند

اثر(PectaSol)MCP بر درصد زیستایی سلول‌های DU145 بوسیله تست MTT

برای بررسی اثر MCP در غلظت‌های مختلف و زمانهای ۲٤، ٤٨ و ۷۲ساعت بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده‌شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۳ و ۵ mg/ml، زیستایی سلول‌ها خوانده شد.

همانطور که در شکل۵ مشاهده می‌شود MCP در ۲٤ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معنا داری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ٤٨ ساعت و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت mg/ml ۳و۵ ارتباط معناداری را نشان‌می‌دهد ($p<0.001$) که نشانه وابستگی به دوز است.درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲٤ ساعت با ٤٨ و ۷۲ ساعت معنادار است ($p<0.01$) ولی بین زمانهای ٤٨ و۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ٤٨ ساعت برای تیمارهای بعدی درنظرگرفته‌شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های DU145 تحت تأثیر MCP در یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد($p<0.001$).



شکل ۵- اثر غلظت‌های متفاوت MCP بر درصد زیستایی سلول‌های DU145 پس از ٤٨/۷۲، ۲٤ ساعت انکوباسیون با استفاده از تستMTT . غلظت‌های mg/ml ۳ و ۵، MCP باعث کاهش معنی دار بقای سلول‌های تحت تیمار نسبت‌به گروه کنترل شده‌است. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می‌باشند. ($p<0.001$ و $n=3$)

www.SID.ir

اثر Dox بر درصد زیستایی سلول‌های DU145 بوسیله تست MTT

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف Dox در زمانهای ۲٤، ٤۸ و ۷۲ساعت تیمار بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده‌شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۱۰، 250،100،50،25 و ۵۰۰ nM، از Dox خوانده شد.

Dox در ۲٤ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معنا داری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای 48 ساعت و 72 ساعت زیستایی سلول در غلظت‌های Dox، 500 nM،250،100 ارتباط معناداری را نشان‌می‌دهد (p<0.001)که نشانه وابستگی به دوز است.درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲٤ ساعت با ٤۸ و ۷۲ ساعت معنادار است (p<0.02) ولی بین زمانهای ٤۸ و۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ٤۸ ساعت برای تیمارهای بعدی درنظرگرفته‌شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های DU145 تحت تأثیر Doxدر یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد(p<0.001).

اثرMCP وDox بر مهار رشد سلول‌های DU-145 با استفاده از تست MTTپس از ٤۸ ساعت تیمار

تیمار سلول‌های DU-145 به مدت ٤۸ ساعت با دوزهای مختلفMCP (0.5-5 mg/ml) و دوکسوروبیسین (500 nM - ۱۰) موجب کاهش چشمگیری در قدرت تکثیر و زیستایی این رده سلولی به میزان ۷۵/۳درصد۲۳ با (P<0.001) و 76.3 -درصد ۲٤ با (P<0.001) می‌شود (جدول ۱).

میزان IC50 پس از ٤۸ ساعت تیمار(بهترین زمان پاسخگویی) ۳mg/ml برای MCP وnM ۲۵۰ برای دوکسوروبیسین به‌دست‌آمد(جدول۳).

اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین بر مهار رشد سلول‌های DU-145 با استفاده از تست MTTپس از ٤۸ ساعت تیمار

بررسی اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین با استفاده از دوزهای فزاینده این دو دارو در مدت ٤۸ ساعت تیمار انجام گرفت. در ازمایش اولnM ۲۵ و ۲۵۰ از داروی دوکسوروبیسین در ۲٤ ساعت اول و سپس به آن mg/ml ۳ داروی MCP در ۲٤ ساعت دوم اضافه شد.نتیجه این مطالعه نشان‌می‌دهد که قدرت زیستایی سلول‌ها از میزان ٤۷,۰٤درصد در تیمار با DOX به تنهایی تا میزان درصد۲۹,۳٦ در تیمار با ترکیب دو داروی MCP و DOX کاهش نشان‌داد (شکل ٦ و جدول ۲).

میزان IC50 ۱/۵ برابر کاهش نشان‌داد (جدول ۲). در آزمایش دوم nM ۲۵۰ دوکسوروبیسین و ۳ MCP mg/ml هم‌زمان برای ٤۸ ساعت بکار گرفته‌شد که سبب کاهش قدرت زیستایی سلول به میزان ۳۸/٦درصد شد (جدول ۲).

جدول ۱. اثر دوکسوروبیسین وMCP برزیستایی دو رده سلولی DU-145 و LNCaP بعداز٤۸ساعت تیمار

رده سلولی	ماده درمانی	دوز دارویی	میزان کاهش زیستاییدرصد	IC50	P.value
DU-145	Dox	10-500Nm	24-76.3	250Nm	0.001
	PectaSol	0.5-5mg.ml	23-75.3	3mg/ml	0.001
LNCaP	Dox	10-500nM	15-67	290nM	0.001
	PectaSol	1-10mg.ml	22-65	4mg/ml	0.001

Archive of SID

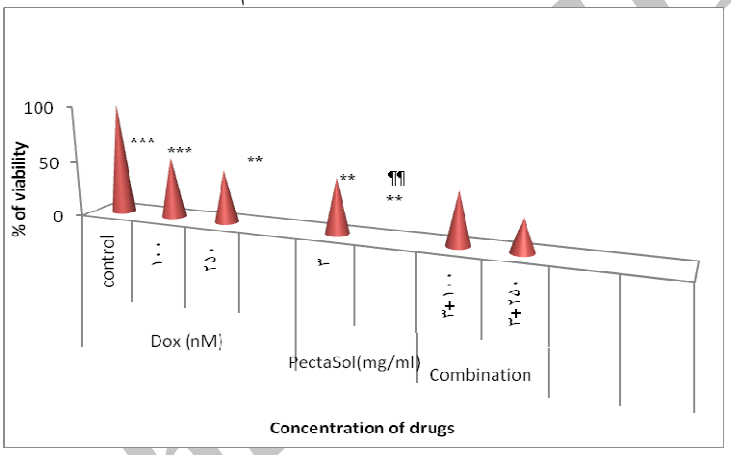
www.SID.ir

جدول ۲. اثر ترکیبی دو داروی دوکسوروبیسین وMCPبرزیستایی دو رده سلولی DU-145وLNCaPبعداز۴۸ساعت تیمار

دودمان سلولی	ماده درمانی	دوز دارویی	میزان زیستاییدرصد	میزان کاهش IC50	P.val
DU-145	Dox	100Nm	55.02		0.001
		250 nM	47.04		0.001
	Pectasol	3mg/ml	49.08		0.001
	Dox+Pectasol	100nM+3mg/ml	47.24		0.001
		250nM+3mg/ml	29.36	1.5 fold	0.001
	Dox/Pectasol	250nM/3mg/ml	28.6		0.001
LNCaP	Dox	100 Nm	62		0.001
		290 nM	52.25		0.001
	Pectasol	4mg/ml	53.21		0.001
	Dox+Pectasol	100nM+4mg/ml	52.50		0.001
		290nM+4mg/ml	32.50	1.3 fold	0.001
	Dox/Pectasol	290nM/4mg/ml	31.6		0.001

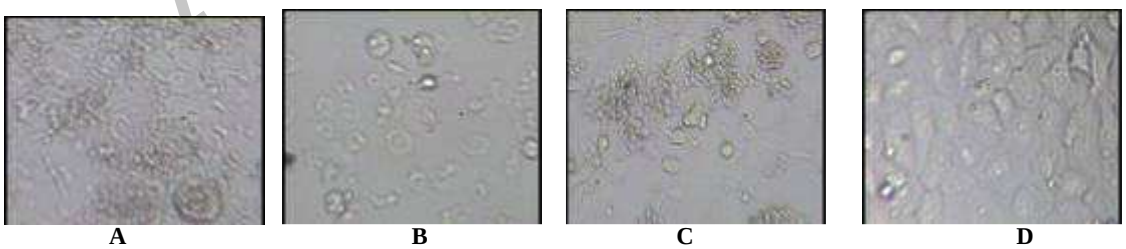
Dox+Pectasol = تیمار با داروی دوکسوروبیسین برای ۲۴ ساعت اول وسپس افزودن MCP برای ۲۴ ساعت دوم

Dox/Pectasol = تیمار با دو داروی دوکسوروبیسین و به‌طور Dox همزمان



شکل ۶- درصدزیستایی سلول‌های DU-145پس از۴۸ساعت تیماربا‌غلظت‌های مختلفMCP ودوکسوروبیسین یاترکیبی ازدودارو.- زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT. -ترکیب هر دو ماده باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلول‌های تحت تیمار نسبت‌به گروه کنترل شده‌است. - مقادیر ارائه شده نتیجه حداقل سه بار آزمایش مستقل و به‌صورت mean±S.E.M می‌باشند.

*P<0.05 vs control
¶P<0.05vs 250nMDoxorubicin+3mg/mlPectaSol.



A B C D

شکل ۷- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های DU-145 پس از تیمار بامحیطهای مختلف

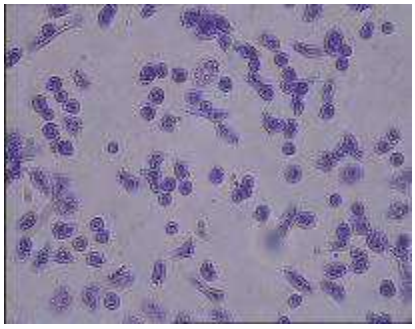
A- PectaSol 3 mg/ml + 250nM Dox چروکیده،گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها.

B- Doxorubicin 250nM چروکیده شدن سلول‌ها.

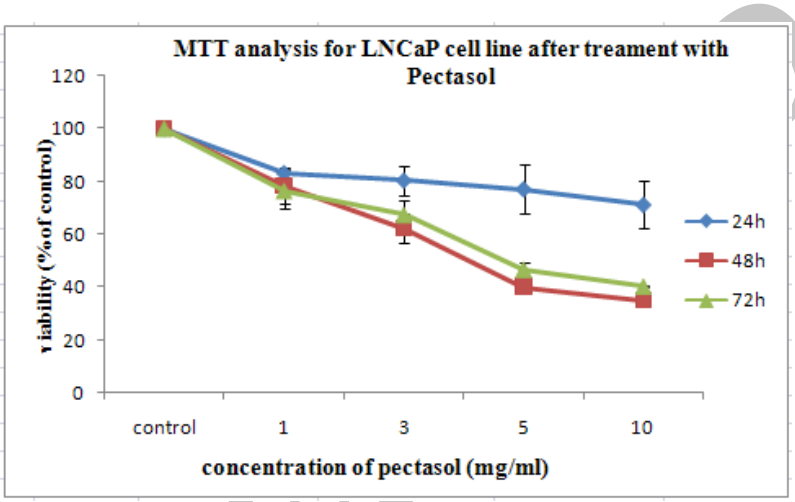
C- 3mg/ml PectaSol گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها

D- گروه کنترل

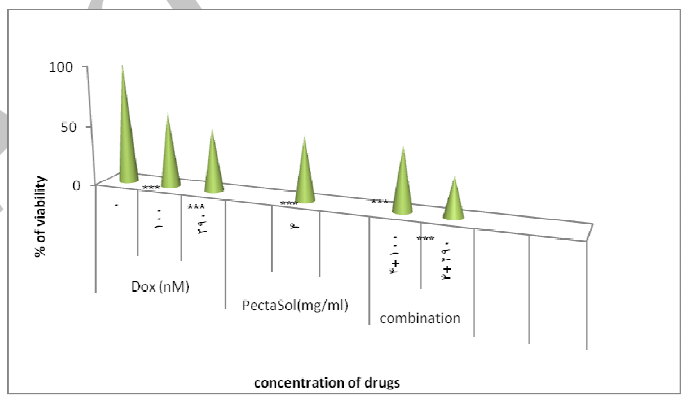
www.SID.ir



شکل ۸- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با Dox 250 nM/ MCP ۳ mg/ml کاهش حجم سلول، گرانوله شده سلول‌ها و چروکیده شدن غشای سلولی در این تصاویر با رنگ آمیزی گیمسا، قابل مشاهده است.

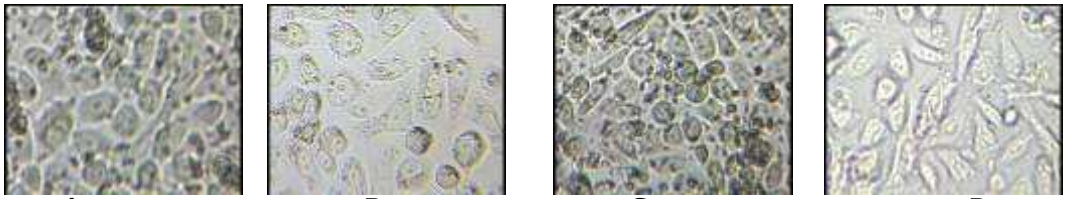


شکل ۹- اثر غلظت‌های متفاوت MCP بر درصد زیستایی سلول‌های LNCaP پس از ۲۴،48،72 ساعت انکوباسیون با استفاده از تست MTT. غلظت‌های ۳ mg/ml و ۵، MCP باعث کاهش معنی دار بقای سلول‌های تحت تیمار نسبت‌به گروه کنترل شده‌است. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می‌باشند. (p<0.001 و n=3)



شکل ۱۰- کرداردرصدزیستایی سلول‌های LNCaP پس از ۴۸ساعت تیماربا غلظت‌های مختلف MCP ودوکسوروبیسین یاترکیبی ازدودارو.زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرارگرفت. ترکیب هر دو ماده باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلول‌های تحت تیمار نسبت‌به گروه کنترل شده‌است. مقادیر ارائه شده نتیجه حداقل سه بار آزمایش مستقل و به‌صورت mean±S.E.M می‌باشند. .*P<0.05 vs untreated cells(control)

www.SID.ir



A B C D

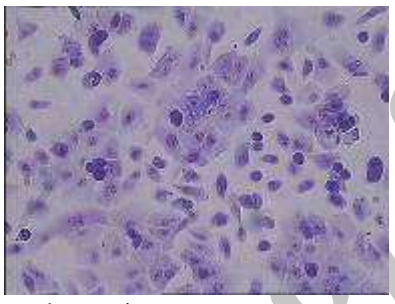
شکل- ۱۱ A،B،C،D- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌هایLNCaP پس از تیمار بامحیطهای مختلف

A- PectaSol 4 mg/ml + 290nM Dox چروکیده،گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها.

B- Doxorubicin 290nM چروکیده شدن سلول‌ها.

C- 4mg/ml PectaSol گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها

D. گروه کنترل



شکل ۱۲- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با MCP ٤mg/ml/Dox290nM کاهش حجم سلول، گرانوله شده سلول‌ها و چروکیده شدن غشای سلولی در این تصاویر با رنگ آمیزی گیمسا، قابل مشاهده است.

جدول ۳. اثر MCP و دوکسوروبیسین برپیشرفت چرخه سلولی در رده سلولی DU-145وLNCaPبا روش فلوسایتومتری

رده سلولی	ماده درمانی	دوز دارویی	SubG1در صد	G1در صد	Sدر صد	G2M درصد
DU-145	Cont (کنترل)	250nM	۱۷/۲	۴۳/۲	۳۰/۵	۸/۷
	Dox	3mg/ml	۱۲/۲	۲۳/۵	۵۴/۵	۲۰/۵
	PectaSol	250nM+3mg/ml	۴۶/۹	۱۹/۹	۱۵	۸/۲
	Dox+Pectasol	3mg/ml+250nM	۴۵/۳	۱۸/۶	۲۲/۱	۲/۳
	Pectasol+Dox	250nM/3mg/ml	۵۴/۶	۲۴/۵	۱۵/۷	۱۲/۶
	Doxo/Pectasol		۶۲/۲	۳۵/۵	۳۳	۲/۵
LNCaP	Cont (کنترل)	290nM	۷/۷	۶/۱	۱۰/۸	۳۰
	Dox	4mg/ml	۱۳/۸	۸/۳	۶/۴	۵۳/۵
	Pectasol	290nM+4mg/ml	۳/۶	۲/۱	۷/۱	۴۶/۲
	Doxo+Pectasol	4mg/ml+290nM	۲/۱	۱۸/۲	۲۱/۷	۴۲/۹
	Pectasol+Dox	290nM/4mg/ml	۱۶/۲	۶/۹	۳/۲	۶۱/۶
	Doxo/Pectasol		۳/۵	۴/۴	۲۴/۱	۵۲/۵

اثر(PectaSol)MCP بر درصد زیستایی سلول‌های LNCaPبوسیله تست MTT

برای بررسی اثر MCP در غلظت‌های مختلف و زمانهای ٢٤، ٤٨ و ٧٢ساعت بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده‌شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۱، ۵،۳ و ۱۰ mg/ml از MCP،زیستایی سلول‌ها بررسی‌شد.

همانطور که در شکل 9 مشاهده می‌شود MCP در ٢٤ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معنا داری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای 48 ساعت و 72 ساعت زیستایی سلول در غلظت mg/ml ۳و۵ ارتباط معناداری

Archive of SID
www.SID.ir

را نشان‌می‌دهد (p<0.001) که نشانه وابستگی به دوز است.درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲٤ ساعت با ٤۸ و ۷۲ ساعت معنادار است (p<0.02) ولی بین زمانهای ٤۸ و۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ٤۸ ساعت برای تیمارهای بعدی درنظرگرفته‌شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های DU145 تحت تأثیر MCP در یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد(p<0.001).

عکسبرداری از سلول‌های DU145 پس از تیمار با MCP و رنگ آمیزی گیمسا

به‌منظور بررسی دقیقتر تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های DU-145 پس از تیمار، تعداد ۱۰۵×۵ سلول را روی کاور اسلیپ کشت داده و سپس توسط غلظت‌های۳،۱،۰,۵ mg/ml از مشتقات پکتینی تیمارکردیم. پس از گذشت ٤۸ ساعت از تیمار سلول‌ها، آنها را رنگ آمیزی گیمساکرده و با میکروسکوپ نوری بررسی‌کردیم. از این سلول‌ها عکسبرداری شد که مؤید تغییرات مورفولوژیکی مشاهده‌شده با میکروسکوپ اینورت در بخش قبل است. (شکل ۸)

اثر MCP و Dox بر مورفولوژی سلول‌های DU-145 پس از ٤۸ ساعت تیمار

از نظر مورفولوژی نیز همان‌طورکه در شکل 7 مشاهده می‌شود تیمار با دوز 250 nM دوکسوروبیسین سبب چروکیده شدن سلول‌ها و تیمار با دوز ۳ mg/ml پکتازول موجب گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها شد درحالی‌که تیمار با ترکیب دو داروی پکتازول و دوکسوروبیسین باعث هم چروکیده شدن وهم گرانوله و کوچک شدن سلول‌های DU-145 شد.

اثر Dox بر درصد زیستایی سلول‌های LNCaP بوسیله تست MTT

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف Dox در زمانهای ۲٤، ٤۸ و ۷۲ساعت تیمار بر روی بقای سلول‌های LNCaP از تست MTT استفاده‌شد.. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های 10، 25،50،100،250 و ۵۰۰ nM، از Dox، سلول‌ها توسط رنگ MTT انکوبه شدند و جذب آنها در طول موج ۵۷۰ nm توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد.(جدول ۳)

Dox در ۲٤ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معنا داری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ٤۸ ساعت و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت‌های Dox، 100،250 nM،500 ارتباط معناداری را نشان‌می‌دهد (p<0.001)که نشانه وابستگی به دوز است.درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲٤ ساعت با ٤۸ و ۷۲ ساعت معنادار است (p<0.02) ولی بین زمانهای ٤۸ و۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ٤۸ ساعت برای تیمارهای بعدی درنظرگرفته‌شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های LNCaP تحت تأثیر Doxدر یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد(p<0.001).

آثار MCP و دوکسوروبیسین بر مهار رشد رده سلولی LNCaP پس از ٤۸ ساعت تیمار با استفاده از MTT

تیمار سلول‌های LNCaP به مدت ٤۸ ساعت با دوزهای مختلف MCP (mg/ml ۱۰-۱) و دوکسوروبیسین (nM۵۰۰- nM۱۰) موجب کاهش چشمگیری در قدرت تکثیر و زیستایی سلول‌ها به میزان ٦۵درصد -22 با (P<0.001) و ٦۵درصد - ۱۵(P<0.001) شد (جدول ۱).

میزان IC50 برای سلول‌های LNCaP عبارت است از ۲۹۰ nM برای دوکسوروبیسین و ٤mg/mlبرای MCP.(جدول ۱)

اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین بر مهار رشد سلول‌های LNCaP با استفاده از تست MTTپس از ٤۸ ساعت تیمار

بررسی اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین با استفاده از دوزهای فزاینده این دو دارو در مدت ٤۸ ساعت تیمار انجام گرفت. در ازمایش اولnM ۱۰۰ و ۲۹۰ از داروی دوکسوروبیسین در ۲٤ ساعت اول و

Archive of SID

www.SID.ir

سپس به آن mg/ml ٤ داروی MCP در ٢٤ ساعت دوم اضافه شد.نتیجه این مطالعه نشان‌می‌دهد که قدرت زیستایی سلول‌ها از میزان ٥٢,٢٥درصد در تیمار با DOX به تنهایی تا میزان ٣٢,٥٥درصد در تیمار با ترکیب دو داروی MCP و DOX کاهش نشان‌داد(شکل 10 و جدول2) .

میزان IC50 در سلول‌های LNCaP ١/٣ برابر کاهش نشان‌داد (جدول2). در ازمایش دوم ٢٩٠nmدوکسوروبیسین وmg/ml ٤ MCP هم‌زمان برای ٤٨ ساعت بکار گرفته‌شد که سبب کاهش قدرت زیستایی سلول به میزان ١٦/٦درصد شد (جدول ٢)

از نظر مورفولوژی نیز همان‌طورکه در شکل -11 A،B،C،D مشاهده می‌شود تیمار با دوز 290 nM دوکسوروبیسین سبب چروکیده شدن سلول‌ها و تیمار با دوز 4 mg/ml پکتازول موجب گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها شد درحالی‌که تیمار با ترکیب دو داروی پکتازول و دوکسوروبیسین باعث هم چروکیده شدن وهم گرانوله و کوچک شدن سلول‌های LNCaP شد.

عکسبرداری از سلول‌های LNCaP پس از تیمار با MCP و رنگ آمیزی گیمسا

به‌منظور بررسی دقیقتر تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های LNCaP پس از تیمار، تعداد ١٠٥×٥ سلول را روی کاور اسلیپ کشت داده و سپس توسط غلظت‌های ١، 4 mg/ml از مشتقات پکتینی تیمارکردیم. پس از گذشت ٤٨ ساعت از تیمار سلول‌ها، آنها را رنگ آمیزی گیمساکرده و با میکروسکوپ نوری بررسی‌کردیم. از این سلول‌ها عکسبرداری شد که مؤید تغییرات مورفولوژیکی مشاهده‌شده با میکروسکوپ اینورت در بخش قبل است. (شکل12)

آثار MCP و دوکسوروبیسین برپیشرفت چرخه سلولی در رده سلولی DU-145

در سلول‌های DU-145 تیمار با MCP پس از ٤٨ ساعت سبب توقف چرخه سلولی در مرحله SubG1 (٤٦,٩٧درصد در مقابل ١٧,٢٩درصد در مقایسه با گروه کنترل) شد. درحالی‌که تیمار با دوکسوروبیسین سبب توقف چرخه سلولی در مرحلهS(٥٤,٥درصد در مقابل٣٠,٥درصددر مقایسه با گروه کنترل) شد.نکته جالب توجه اینکه تیمار با MCP پس از تیمار با دوکسوروبیسین سبب توقف چشمگیر سیکل سلولی در مرحله SubG1شد (٤٥,٣درصد در مقایسه با دوکسوروبیسین به تنهایی ١٢,٢درصد) تیمار با دوکسوروبیسین پس از تیمار با MCP منجر به افزایش توقف چرخه سلولی در مرحله SubG1 (٥٤,٦درصد در مقایسه با دوکسوروبیسین به تنهایی ١٢,٢درصد) شد. تیمار سلول‌ها با هر دو داروی دوکسوروبیسین و MCP هم‌زمان برای ٤٨ ساعت، سبب توقف قویتر چرخه سلولی در مرحله S/G1 (٣٥,٥درصدو٣٣درصد) شد (جدول-٣).

آثار MCP و دوکسوروبیسین برپیشرفت چرخه سلولی در رده سلولی LNCaP

در سلول‌های LNCaP تیمار با MCP ودوکسوروبیسین وترکیب دو دارو به هر سه صورت ٢٤ ساعت اول MCP سپس برای ٢٤ ساعت دوم دوکسوروبیسین و برعکس و یا به‌طور هم‌زمان پس از ٤٨ ساعت سبب مهار چرخه سلولی در مرحلهG2M شد. (جدول ٣).

به‌رغم بیلیونها دلار هزینه تحقیقات درسال،هنوز سرطان دومین عامل مرگ در جهان بشمار می‌رود.یکی از علل کشنده‌بودن کانسر تمایل آن برای متاستاز به سایر ارگانهای بدن است.متاسفانه تاکنون امکانات کمی‌برای جلوگیری از متاستاز سرطان در اختیار است. یک پلی ساکارید میوه ای مخصوص تحت عنوان پکتین تغییر شکل یافته مرکبات یک موقعیت استثنایی برای جلوگیری از تجمع،چسبندگی و متاستاز سلول‌های سرطانی رافراهم‌کرده است.١ تحقیقات بالینی نشان‌می‌دهد که پکتین سبب محدود کردن پیشرفت بیماری در مردان دچار سرطان پیشرفته پروستات می‌شود.MCP بنظر می‌رسد در پیشگیری و درمان سرطان متاستاتیک به‌خصوص، تومورهای توپر نظیر ملانوما و سرطانهای پروستات،کولون و پستان مؤثر

Archive of SID

www.SID.ir

باشد.دانشمندان معتقدند که MCP با استفاده از مهار دو فرآیند کلیدی دخیل در پیشرفت سرطان، آنژیوژنز و متاستازعمل می‌کند۲. طبق تحقیقات انجام‌شده MCP می‌تواند سبب تحریک آپوپتوز و مهار پرولیفراسیون در سلول‌های سرطانی پروستاتی وابسته و غیر وابسته به آندروژن در انسان و موش گردد.Jan Yan در سال ۲۰۱۰ گزارش کرد که MCP می‌تواند سبب مهار پرولیفراسیون و آپوپتوز در رده‌های سلولی LNCaP،PC3،CASP2.1،CASP1.1 و BPH-1 گردد که از طریق مهارفعالیت MAP Kinase، افزایش سطح بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bim و تحریک کاسپاز -۳ در سلول‌های PC3 و CASP1.1 عمل می‌کند. در سال ۲۰۰۰هایاشی۲ و همکارانش به این نتیجه رسیدند که، اندازه تومور کولون کاشته شده در موش‌ها، با مصرف خوراکی MCP، کاهش نشان می‌دهد.[17] در ضمن طبق بررسی مادار۳ و همکارانش در سال ۲۰۰۱ رژیم غذایی غنی از پکتین موجود در پوست پرتقال (۱۵درصد) بر روی موش‌هایی که مورد تزریق دی متیل هیدرازین قرارگرفته‌بودند، کاهش تعداد endophytic tumors و فعال شدن کاسپاز ۳ و همچنین افزایش فعالیت T cell killers در تومورها، را نشان‌دادکه همه این خصوصیات بیانگر اثر ضد توموری پکتین‌ها می‌باشند. (۱۸) علاوه بر اینها در همین سال تحقیقات نشان‌داد که apoptotic index کولون، در موش‌هایی که ۱۵درصد پکتین مرکبات در رژیم غذایی خود مصرف کنند، میزان بالاتری دارد. این حالت به علت کاهش بیان پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 و هم‌زمان فعال شدن کاسپاز ۱ و آنزیم PARP۴ به‌عنوان سوبسترای کاسپازها، تشخیص داده‌شد. در ضمن پکتین‌ها فعالیت ضد موتاژنی را بر علیه ترکیبات نیترو آروماتیک نشان‌دادند. [19و20و21و22] در این تحقیق به بررسی آثار MCP روی پرولیفراسیون سلول‌های سرطانی پروستات DU-145 مستقل از آندروژن و LNCaP وابسته به آندروژن پرداختیم.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان‌می‌دهد که MCP به‌طور موجب افزایش اثر درمانی دوکسوروبیسین بردودمانهای سلول‌های سرطان پروستات انسانی از طریق کاهش قدرت زیستایی و تکثیر سلول‌ها می‌شود. در این ترکیب دو ماده MCP و دوکسوروبیسین با هم کاهشی ۱,۵ برابری در سلول‌های DU-145 و ۱,۳ برابری در میزان IC50 در سلول‌های LNCaPایجاد کرد همینطور دوز IC50 ترکیب این دو دارو سبب هم گرانوله و کوچک شدن وهم چروکیده شدن هر دو دودمان سلولی شد..نظر به اینکه داروی شیمیایی دوکسوروبیسین دارای عوارض جانبی نظیر مهار سیستم ایمنی و کاردیومیوپاتی است کاهش مقدار این دارو موجب کم شدن عوارض جانبی ذکر شده در بیمار می‌شود و محدودیت بکار بردن این دارو را در شیمی‌درمانی کمتر می‌کند.[13]در همین راستا شیمی‌درمانی ترکیبی مورد توجه بیشتری قرارگرفته است تا بتوان به ترکیباتی دست یافت که با مکانیسم شناخته شده سبب افزایش اثر درمانی و کاهش دوز موثر داروهای ضد سرطانی کلینیکی گردد[13].سایر مطالعات نشان‌داده که MCP می‌تواند از طریق افزایش حساسیت سلول‌ها به این داروها و کاهش IC50 دوکسوروبیسین تا ۱۰,۷ برابر در سلول‌های آنژیوسارکومای انسانی و همانژیوسارکوما عمل‌کند .[14]

یافته‌های مطالعه حاضر نشان‌می‌دهد که MCP به‌طور سینرژیستی اثر درمانی دوکسوروبیسین را در سرطان پروستات انسانی افزایش‌می‌دهد که این عمل در سلول‌های DU-145 از طریق تحریک آپوپتوز (توقف در مرحلهSubG1) و در سلول‌های LNCaP از طریق تحریک مهارچرخه سلولی (توقف در مرحلهG2M) انجام می‌شود. Tyagi AK و همکارانش در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که دوکسوروبیسین به تنهایی سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G2M در سلول‌های DU-145 میشود[12].Bar-on و همکارانش در سال ۲۰۰۷

1. Hayashi, A.
2. Madar, Z.
3. poly(ADP)ribose polymerase

Archive of SID

www.SID.ir

نشان‌دادند که دوکسوروبیسین سبب تحریک مهار در مرحله G2M در سلول‌های MDA-MB-BT و G1/S و G2M در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان می‌شود [23]،MCP. [24]نیز می‌تواند سبب افزایش پاسخ آپوپتوتیک سلول‌های توموری به شیمی‌درمانی شود.[14]نتیجه‌گیری:براساس یافته‌های ما MCP می‌تواند سبب تقویت اثر سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین روی رده‌های سلولی سرطانی

DU-145 و LNCap سرطان پروستات گردد که این امر در ارتباط با افزایش اثر سایتوتوکسیسیتی پیشرونده دوکسوروبیسین و MCP به‌صورت همراه با هم در تحریک مرگ سلولی از طریق آپوپتوز(Sub-G1) در رده سلولی DU-145 و توقف چرخه سلولی در رده سلولی LNCaP (G2-M) است که می‌تواند با دوز پایین و عوارض جانبی کم قابل دسترسی باشد.

تقدیر و تشکر

حمایت مالی این پروژه توسط معاونت محترم پژوهشی پردیس علوم دانشگاه تهران انجام گرفت.نویسندگان از خانمها زیبا مقبولی و مریم مبینی بدلیل همکاری در کارهای آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌کند.

منابع

1. Kaighn ME. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). Invest. Urol. (1979); 17: 16-23
2. Charrier JP. Two-dimensional antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. Electrophoresis. (1999); 20:1075-81
2. Joanne Nicholas, Modified Citrus Pectin, Life Extension Site. March; 2009.
3. Glinsky V.V and Raz A: Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. Carbohydr Res. 2009; 344(14):1788-1791.
5. Elsadek B, Graeser R, N Esser N, Schäfer-Obodozie C, Tsurumi C and Abu Ajaj K: In vivo evaluation of a novel albumin-binding prodrug of doxorubicin in an orthotopic mouse model of prostate cancer (LNCaP). Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 2011 ; 14: 14-21.
6. Sanches C, Mendoza P, Contreras HR, and Vergara J: Expression of Resistance Proteins in Prostate Cancer Is Related With Cell Sensivity to Chemotherapeutic Drugs. The Prostate. 2009; 69: 1448-1459.
7. Nehme A, Varadarajan P, and Sellakumar G: Modulation docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-transe retinoic acid in prostate cancer cells. British Journal of Cancer. 2001 ;84(11): 1571-1576.
8. Kang J, Bu J, Hao Y, and Chen F: Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 2005; 8: 274–279.
9. Stone KR. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). Int. J. cancer. (1978) ; 21:274-81.
10. Charrier JP. Two-dimensional antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. Electrophoresis. (1999) ; 20:1075-81.
11 .Horoszewicz JS. LNCaP moder of human prostatic carcinoma. Cancer Res. (1983) ; 43: 1809-18.
12. Tyagi AK, Singh RP, Agrawal C, Chan DCF and Agrawal R: Silibinin induced Growth Inhibition. G2-M Arrest. and Apoptosis. Clinical Cancer Research. 2002 ;8: 3512-3519.
13. Collins L, Zhu T, GUO J, Xiao ZJ and Chen C-Y: Phellinus Linteus Sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer.British Journal of Cancer. 2006;95: 282-288.
14. Johnson KD.Glinskii OV. Mossin VV and Turk JR: Galactin-3 as apotential therapeutic target in tumors Arising from Malignant. Neoplasia . 2007;9(8): 662-670.
15. Lodish s, Alberts F, Second Edition, Cellular & Molecular Biology, 348-362.
16. Yan J and Katz A16. PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and- independent prostate cancer cells. Integr Cancer Ther, 2010 ;9(2): 197-203.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Hayashi. A. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin. Altern. Med. Rev. (2000); 5. 546–552.

18. Kossoy G. Effects of a 15% orange-pulp diet on tumorigenesis and immune response in rats with colon tumors. Oncol Rep. (2001); 8:1387-1391.

19. Avivi-Green C. Dietary regulation and localization of apoptosis cascade proteins in the colonic crypt. J Cell Biochem.(2000); 77:18-29

20. Avivi-Green C. Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. Oncol Res. (2000) ; 12:83-95.

21. Avivi-Green, C. Pectin-enriched diet affects distribution and expression of apoptosis cascade proteins in colonic crypts of dimethylhydrazine-treated rats. Int. J. Mol. Med.(2000); 6. 689–698.

22. Hensel. A. and Meier, K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. Planta Med. (1999); 65. 395–399.

23. Bar-On O, Shapira M, and Hershko DD: Differential effect of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and SKP2 expression in breast Cancer cells. Anticancer Drugs, 2007;18(10): 1113-1121.

24. Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL and Eid M:Pectin induces apoptosis in human prostatic cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. Glycobiology, 2007;17(8): 805-819Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU-145 Cells to Doxorubicin-.

Archive of SID

www.SID.ir