

## ارزیابی چرخه سلولی سلولهای کارسینومای تخمدان انسانی ( 2008O2 )

### بدنبال استفاده از دوزهای مختلف داروی سیس پلاتین

بهرروز نیک نفس\* - فرشاد حسینی شیرازی\*\*

\*استادیار گروه آناتومی - دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\*\*استادیار گروه سم شناسی و داروشناسی - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

#### مقدمه

استفاده از داروهای سیتوتوکسیک باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2/M شده و موجب مرگ سلولی می شود. این پدیده میتواند وابسته به دوز داروی سیتوتوکسیک باشد (۱۶). در رده سلولی میلوئید، دوز بالای Okadaic Acid باعث توقف سلولها در فاز S و دوز پائین آن موجب توقف سلولها در G2/M می شود (۶).

همچنین بهم خوردن چرخه سلولی در سلول کارسینومای پروستات (PC-3) وابسته به نوع دارو است. بطوریکه سیس پلاتین باعث توقف در فاز S و داروی Taxol موجب توقف در فاز G2/M می شود (۱۸). فاز توقف چرخه سلولی در انواع کارسینومای تخمدان بدنبال استفاده از سیس پلاتین نیز متفاوت می باشد. همچنین بدنبال توقف چرخه سلولی، انواع مرگ سلولی کارسینومای تخمدان بصورت آپوپتوزیس در فاز S و نکروزیس در فاز G2/M بروز می کند (۱۷). مطالعات مورفولوژیک نشان داده که سیس پلاتین باعث مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس در سلول OV2008 می شود (۴).

چون مکانیسم اثر سیس پلاتین در تغییر سیکل سلولی و مرگ سلولی هنوز بطور کامل مشخص

تقسیم سلولی نتیجه انجام پیاپی مراحل چرخه سلولی است. عوامل گوناگونی در انتقال فازهای مختلف چرخه سلولی دخالت دارند. که انتقال این فازها تحت تاثیر Checkpoint ها می باشد. بیشتر سلولهای عادی و تمایز یافته که تقسیم سلولی در آنها متوقف شده است، در فاز G1 قرار دارند (۱).

در حال حاضر برای کنترل سلولهای در حال تقسیم سرطانی از پرتو درمانی و شیمی درمانی استفاده می شود. مطالعات اخیر بیانگر آنست که اولین پاسخ سلولهای در حال تقسیم به عوامل فوق، تاخیر در تقسیم سلولی و توقف در فازهای مختلف G1 و S و G2 میباشد. توقف در فازهای مختلف سلولی و عدم توانایی در ترمیم آسیب سلولهای سرطانی موجب مرگ این سلولها می شود (۱).

داروی سیس پلاتین یکی از داروهای شیمی درمانی است که به طور وسیعی در درمان سرطانها بخصوص سرطان تخمدان استفاده می شود. این دارو با اتصال به باندهای گوانین و سیتوزین مانع سنتز DNA و مرگ سلولی می شود (۲).

کامل جهت کامل شدن زمان انکوباسیون، در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. سلولهای انکوبه شده به مدت‌های ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت بعد از زمان اعمال دارو، جهت مطالعات بعدی، تریپسینه و جمع آوری شدند. در ضمن دوزهای  $3\ \mu\text{g/ml}$  و  $1\ \mu\text{g/ml}$  برابر با IC 50 و  $3\ \mu\text{g/ml}$  از سیس پلاتین برابر با I80 بود (۷).

جهت مقایسه اثرات دارویی در دوزهای فوق سلولهای آزاد شده به مدیوم توسط تریپان بلو رنگ آمیزی و شمارش شدند.

#### آنالیز چرخه سلولی:

سلولهای چسبیده بعد از تریپسینه کردن، در گروههای کنترل و آزمایشی ابتدا با PBS شستشو و سپس در الکل ۷۰٪ فیکس شدند و تا زمان آنالیز چرخه سلولی در یخچال نگه داری گردیدند. برای آماده سازی سلولها جهت آنالیز چرخه سلولی در فلوسیتومتری نخست سلولها توسط PBS شستشو و سپس توسط پریدیدوم پدید ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) و RNase ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) مخلوط شده و بمدت ۳۰ دقیقه در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. بعد از رنگ آمیزی، سلولها توسط فلوسیتومتری از نوع Elite بررسی و توسط برنامه Multi Cycle آنالیز شدند.

#### نتایج

##### آنالیز چرخه سلولی:

آنالیز چرخه سلولی سلولهای OV 2008 گروه کنترل نشان داده که  $G_1$  با ۵۵٪ نسبت به سایر فازها میزان بیشتری از حجم سلولها را تشکیل می‌داد. بعد از  $G_1$  فاز S با ۳۲٪ و فاز  $G_2$  با ۱۲٪ از سلولها را تشکیل می‌دادند. در ضمن گروه ساعت صفر با گروه کنترل تفاوتی را نشان نداد (شکل ۱).

نیست (۳). باتوجه به مطالب فوق که عوامل مختلفی از جمله نوع دارو، غلظت دارو و نوع سلول در توقف چرخه سلولی سلولهای سرطانی موثر است. لذا در این مطالعه اثر غلظت داروی سیس پلاتین در حد فارماکولوژیک بر چرخه سلولی سلول OV2008، یکی از سلولهای رده کارسینوما تخمدان، مقایسه و بررسی می‌شود.

#### مواد و روشها

**کشت سلولی:** سلولهای OV2008 (از آزمایشگاه فارماکولوژی Rocf، اتاوا، کانادا) به تعداد مساوی توسط محیط کشت کامل متشکل از RPMI (Gibco Co) + 10% FCS (Gibco Co) + آنتی بیوتیک (Sigma, Co) (-) استریتومایسین  $1\ \mu\text{g/ml}$  (۱۰۰ پنی سیلین  $100\ \text{I.U./ml}$ ) در فلاسکهای  $25\ \text{cm}^2$  کشت داده شدند. در ابتدا تعداد سلولهای ریخته شده به فلاسک برابر بود. وقتی سلولها وارد مرحله Sub confluency (Late exponential شدند)، فلاسکها به سه گروه تقسیم گردیدند: گروه کنترل، گروه تیمار شده با سیس پلاتین  $1\ \mu\text{g/ml}$  و گروه تیمار شده با سیس پلاتین  $3\ \mu\text{g/ml}$  (هر گروه به تعداد ۱۰ بار آزمایش شد). هر کدام از گروهها نیز مجدداً از نظر زمان انکوباسیون به زیر گروههای صفر، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت تقسیم شدند. برای تیمار و اعمال داروی سیس پلاتین، ابتدا سلولها توسط PBS شستشو و سپس با سیس پلاتین  $1\ \mu\text{g/ml}$  و  $3\ \mu\text{g/ml}$  رقیق شده در سالیان، همراه با محیط کشت RPMI بمدت یک ساعت تیمار شدند. در گروه کنترل بجای سیس پلاتین فقط سالیان، استفاده گردید. بعد از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$ ، سلولها با PBS شستشو و دوباره با محیط کشت

فاز S در دو گروه تیمار شده با Cisplatin بعد از ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل، افزایش شدیدی را نشان داد که میزان آن تا ۷۲ ساعت ثابت ماند. بطوریکه اختلاف فاز S در ۴۸ و ۷۲ ساعت در هر دو گروه نسبت به  $G_1$ ،  $G_2$  و گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری داشت، ولی بین دو گروه آزمایشی، تفاوتی مشاهده نشد. در فاصله زمانی ۹۶ تا ۷۲ ساعت نیز میزان فاز S دوباره کاهش یافت (شکل ۱ و ۲).

درصد

سیس‌پلاتین با ۲/۲۵٪ بود. فاز  $G_1$  در گروههای تیمار شده با نسبت به گروه کنترل کاهش شدیدی داشت که این تفاوت معنی‌دار بود. بعد از ۷۲ ساعت،  $G_1$  در هر دو گروه نسبت به ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون افزایش جزئی را نشان می‌داد که این افزایش کم بوده و تا ۹۶ ساعت ادامه یافت. بطوریکه اختلاف گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (شکل ۱ و ۲).

زمان (ساعت)

شکل ۱: درصد تغییرات فازهای مختلف در رده سلول OV 2008 تیمار شده با دوز سیس‌پلاتین 1  $\mu\text{g/ml}$  بعد از ساعاتی صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، مشاهده می‌شود. (انحراف معیار  $\pm$  میانگین)

درصد

زمان (ساعت)

شکل ۲: درصد تغییرات فازهای مختلف در رده سلول OV 2008 تیمار شده با Cisplatin 3µg/ml بعد از ساعت‌های صف، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، مشاهده می‌شود. (انحراف معیار ± میانگین).

میزان سلولهای آزاد شده از سطح چسبنده فلاسک در ساعت‌های صفر، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت برای گروه کنترل یکسان بود. برای گروه تیمار شده با Cisplatin 1µg/ml در ۴۸ ساعت بیشترین مقدار و برای ساعت‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت تقریباً یکسان بود.

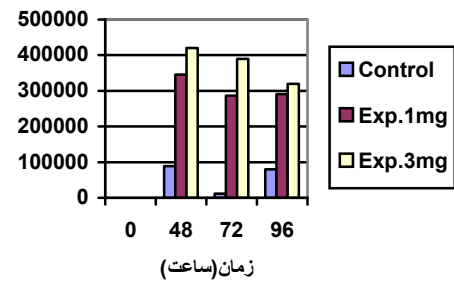
در هر سه نوبت زمانی، میزان سلولهای آزاد شده در گروه 1µg/ml نسبت به گروه کنترل، حدود سه برابر بود. همچنین در گروه Cisplatin 3µg/ml میزان سلولهای آزاد شده به مدیوم نسبت به گروه کنترل 1µg/ml و گروه بیشتر بود. بطوریکه اختلاف گروهها در ساعت‌های مختلف نسبت بهم دیگر معنی دار بود (شکل ۳).

فاز G<sub>2</sub>، در دو گروه تیمار شده با Cisplatin (1 µg/ml و 3µg/ml) بعد از ۴۸ ساعت تا دو برابر افزایش یافته بود. که این افزایش پایدار نبوده و میزان آن (G<sub>2</sub>) تا ۷۲ ساعت کاهش یافت. همین فاز بعد از ۷۲ ساعت دوباره تا ۹۶ ساعت افزایش نشان داد. که افزایش آن میتواند بدنبال کاهش شدید فاز S در فاصله ۷۲ تا ۹۶ ساعت باشد. درصد فاز G<sub>2</sub> در هر دو گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری داشت (شکل ۱ و ۲).

**شمارش سلولها توسط تریپان بلو:**

Cisplatin با Taxol اشاره ای نشده است (۱۱). این مطالعه نشان داد که Cisplatin باعث توقف سلولها در فازهای S و G2/M می شود. حساس بودن سلولهای OV 2008 به Cisplatin در فاز S و تجمع سلولها در فازهای S و G2/M بدین ترتیب توجیه می شود، که رشته های DNA در فازهای مختلف تقسیم سلولی از جمله S که برای سنتز از هم باز می شوند، Cisplatin به میزان بیشتری بصورت Interstrand و Intrastrand به بازهای DNA متصل می شود. سپس سلولها نمی توانند فازهای مختلف تقسیم سلولی را بصورت عادی ادامه بدهند (۲).

عدم تغییر فاز چرخه سلولی در دوزهای بالا در این مطالعه، نشان دهنده تاثیر یکسان Cisplatin بر OV 2008 در دوزهای مختلف می باشد. گرچه عدم تغییر فاز چرخه سلولی با تغییر دوز دارو، در همه سلولها مصداق ندارد. بطوریکه استفاده از دوزهای متفاوت Okadic Acid بر روی سلولهای میلوما موجب توقف چرخه سلولی در فازهای مختلف می شود. بطوریکه در دوز پائین موجب توقف در G2/M می شود و در دوز بالا باعث توقف سلولها در S می شود (۶). بررسی ارتباط توقف چرخه سلولی و فعالیت ژنها در سلولهای سرطانی نشان داده، سلولهای CHD/UV41 که توسط Cisplatin در فاز G2 متوقف می شوند. همزمان با توقف چرخه سلولی، آنزیم pcdc2 34 فعال می شود. بعد از توقف چرخه سلولی، این آنزیم دوباره دفسفوریل شده و سلولها بصورت غیر طبیعی تقسیم می شوند. با تقسیم غیر طبیعی، سلولها دچار مرگ می شوند (۸). در سلولهای سرطانی تخمدان (SK-OV-3) نیز، Cisplatin باعث فعال شدن آنزیم JNRI و عامل تنظیم کننده ERK 1/2 می شود، ولی P36 خاموش می ماند. فعال شدن عوامل فوق وابسته به



شکل ۳: نمودار ستونی، میانگین تعداد سلولهای آزاد شده به مدیوم، در سه گروه کنترل، تیمار شده Cisplatin  $1\mu\text{g/ml}$  و  $3\mu\text{g/ml}$  در ساعت های مختلف را نشان می دهد.

### بحث و نتیجه گیری

از آنجائیکه DNA سلولهای سرطانی حین تقسیم سلولی دو برابر می شود، می توان با آسیب به DNA مانع تقسیم سلولی از طریق رپکلیکاسیون شد. Cisplatin یکی از داروهای آسیب زننده به DNA است که بدنال استفاده از آن، چرخه سلولی متوقف شده و سلولها دچار مرگ سلولی می شوند (۳ و ۱). مطالعات نشان میدهد که نوع سلول، در تعیین فاز توقف چرخه سلولی موثر می باشد بطوریکه با استفاده از Cisplatin، سلولهای CHO/UV41 در مرحله early S آسیب دیده و سپس وارد G2 شده و متوقف می شوند (۸). سلولهای لنفوما ای نوع EL-4 نیز در G2 متوقف می شوند (۹). با سلولهای OV 2008 در این مطالعه عمدتاً در S و کمی از سلولها نیز در G2 متوقف می شوند. البته توقف یک نوع سلول در چندین فاز در سلولهای T-Cell hybridoma با داروی Camptothecin نیز مشاهده شده است (۱۰).

تاثیر انواع داروها بر سلول OV 2008 نتایج مختلفی دارد، بطوریکه Taxol ( $1\mu\text{M}$ ) بعنوان داروی Anti-microtubule فاز چرخه سلولی را تغییر نمی دهد. ولی استفاده همزمان این دارو با Cisplatin موجب مرگ سلولی بیشتری می شود. گرچه با تغییرات چرخه سلولی در ترکیب

- in Chinese Hamster Ovary Cells. Cell growth & Differentiation 1994: 51: 983-993.
9. Shinomiya N, Shinomiya M, Wakiyama H, Katsurax.y Rokutanda M. Enhancement of CDDP Cytotoxicity by Caffeine is Characterized by Apoptotic Cell Death. Exp Cell Res 1994: 210:236-242.
10. Cotter Th G, Glynn J M, Echeverr F, Green DR. The Induction of Apoptosis by Chemotherapeutic Agents Occurs in all Phases of the Cell Cycle. Anticancer Res 1992: 12:773- 780.
11. Jekunen AP, Christen RD, Shalinsky DR. Howell SB. Synergistic Interaction و اپوپتوزیس سلولهای (OV2008) آزاد شده به مدیوم در اثر Cisplatin ( ۴ ) و نتایج گرفته شده بدین ترتیب نتایج Delmastro (۱۵) تأیید می شود. با جمع بندی نتایج تحقیقات دیگران (۱۴ و ۱۵) از این تحقیق میتوان نتیجه گرفت که سلولهای OV2008 بعد از توقف چرخه سلولی در G<sub>2</sub> و S، سلولها به مدیوم آزاد شده و سلولهای (OV2008) آزاد شده، دچار مرگ سلولی از نوع اپوپتوزیس می شوند. از این تحقیق نتیجه می گیریم که افزایش تغییر غلظت Cisplatin موجب افزایش سلولهای آزاد شده به مدیوم می شود. عدم تغییر توقف چرخه سلولی S و G<sub>2</sub>، بدنبال تغییر غلظت Cisplatin، نشان دهنده حساس بودن مرحله S و G<sub>2</sub> چرخه سلولی در رده سلولی OV2008 به Cisplatin است. توقف چرخه سلولی در هر دو دوز تا ۹۶ ساعت پایدار می ماند.
- Dوز Cisplatin است (۱۲). همچنین ژن P53 در مقابل عوامل آسیب زننده فعال می شود. که در بعضی از موارد، میزان تجمع ژن P53 وابسته به دوز Cisplatin است (۱۳). البته در مورد فعال شدن ژن P53 در رده سلولی OV 2008 گزارشی وجود ندارد. بنابراین تغییرات دوز Cisplatin می تواند بر خاموش یا فعال شدن یک سری از روندهای ژنی موثر باشد. توقف چرخه سلولی در سلول OV 2008 دو نوع شرایط را برای این سلول فراهم می کند، فعال شدن روند مرگ سلولی یا ترمیم آسیب DNA . مطالعات نشان داده که سیستم ترمیم Nucleotide excision repair در سلولهای OV2008 بدنبال استفاده از Cisplatin فعال نمی شود بدین ترتیب عامل دوم یعنی ترمیم آسیب DNA بدنبال توقف چرخه سلولی تا حدی رد می شود (۱۴) .
- Delmastro نشان داد که بیان ژنهایی مثل Gadd 153 و Gadd 45 در رده سلولی OV2008 بدنبال استفاده از Cisplatin با دوز IC 90، نشان دهنده پاسخهای تاخیری از نوع اپوپتوزیس است تا ترمیم DNA و بیشترین پاسخها در فاصله زمانی ۲۴ تا ۴۸ می باشد (۱۵) .
- باتوجه به نتایج این تحقیق، افزایش دوز Cisplatin موجب افزایش تعداد سلولهای آزاد شده به مدیوم شده که بیشترین میزان آن در ۴۸ ساعت اول مشاهده می شود.

## منابع

1. Smith ML, Fornace AJ. Mammalian DNA Damage - Inducible Genes Associated with Growth Arrest and Apoptosis. Mutation Res 1996: 340: 109- 124.
2. Eastman A. Activation of Programmed Cell Death by Anticancer Agents: Cisplatin as a Model System. Cancer Cells 1990: 2:275-280.
3. Chu GC. Cellular Response to Cisplatin. J Biol Chem 1994: 269: 787-790.
- Arrest at Either G1/S or G2/M Depending on Dose. J Cell Physiol 1992: 150:484-492.
7. Shirazi FH, Molepo JM, Stewart DJ, NG Ch E, Raaphorst GP, Goel R. Cytotoxicity, Accumulation, and Efflux of Cisplatin and its Metabolites in Human Ovarian Carcinoma Cells. Toxicol Appl Pharmacol 1996: 140: 211-218.
8. Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman A. The Role of Cell Cycle Progression in Cisplatin Induced Apoptosis

- Injury – induced Expression of GADD 153. Br J Cancer 1996; 76(1 ): 18-23
6. Ishida Y, Furukawa Y, Decaprio JA, Saito M, Coriffin JD. Treatment of Myeloid Leukemic Cells with the Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid Induces Cell Cycle Arrest Between Cisplatin and Taxol in Human Ovarian Carcinoma Cells in Vitro. Br J Cancer 1994; 69:299-306.
12. Persons DL, Xazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC. Cisplatin- Induced Activation of Mitogen- Activated Protein Kinases in Ovarian Carcinoma Cells: Inhibition of Extracellular Signal- Regulated Kinase Activity Increases Sensivity to Cisplatin. Clin Cancer Res 1999; 5: 1007-14.
13. Merlin T, Brandner G, Hess RD. Cell Cycle Arrest in Ovarian Cancer Cell Lines Doesnot Depend on P53 Status Upon Treatment with Cytostatic Drugs. Int J Oncol 1998 : 13:1007 - 16.
14. Moorehead RA, Armstrong S G, Rainbow A J, Singh G. Nucleotide Excision Repair in the Human Ovarian Carcinoma Cell Line(2008) and its Cisplatin - Resistant Variant (C13). Cancer Chemother Pharmacol 1996; 38:245- 253.
4. Niknafs B, Shirazi FH, Yazdi MH, Gertler S, Molepo JM, Rippstein P, et al. Morphological Alterations in Human Ovarian Carcinoma (OV 2008) Cells Following the Induction of Cell Death by Cisplatin, Proc. Am Associa Can Res 1997: 312: 38.
5. Gately DP, Sharm A, Christeu RD, Howell SB. Cisplatin and Taxol Activate Different Pathways Regulating Cellular Death. Delmastro DA, Li J, Vaisman A, Solle M, Chaney SG. DNA Damage Inducible- Gene Expression Following Platinum Treatment in Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. Cancer Chemother Pharmacol 1997: 39: 245- 53.
16. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol- Induced Cell Death are Concentration Dependent. Cancer Res 1998; 58: 3620-3626.
17. Sekiguch I, Susuki M, Tamada T, Shinomiyo N, Tsura S, Murata M. Effects of Cisplatin on Cell Cycle Kinetics, Morphological Change , and Cleavage Pattern of DNA in two Human Carcinoma Cell Lines. Oncology 1996: 53: 19-26.
18. Mastbergen SC, Duivenvoorden I , Versteegh RT, Geldof A. A Cell Cycle Arrest and Clonogenic Tumor Cell Kill by Divergent Chemotherapeutic Drugs. Anticancer Res 2000: 20:1833-1838.