مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۳، پاییز ۹۷، صفحات ۲۰۷ تا ۲۱۱

Original Article

آلبندازول مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی کولورکتال انسان رده HT-29 القا می‌کند

الهام حویزی[۱،۲]، طیبه محمدی[۳]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] مرکز تحقیقات فناوری ترانسژنیک و سلول های بنیادی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] استادیار، گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه رازی کرمانشاه ، کرمانشاه ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *تلاش برای تولید داروهای ضد سرطان جدید به صورت بی وقفه ادامه دارد. گزارش شده است آلبندازول روی چندین رده سلول توموری اثرات ضد تکثیری دارد. هدف این مطالعه بررسی اثر کشندگی آلبندازول روی سلول‌های سرطانی کولورکتال انسان رده HT-29 بود.*

روش بررسی: *سلول‌های HT-29 کشت شده به مدت ۱، ۳ و ۵ روز، با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر آلبندازول تیمار شدند. در روزهای تعیین شده پس از تیمار، بقاء و تکثیر سلولی با آزمون‌های MTT و تریپان بلو ارزیابی شد.*

یافته‌ها: *مقایسه میانگین شمارش تعداد سلول ها و بقای سلولی در گروه کنترل و گروه های تیمار شده با غلظت های مختلف آلبندازول در روزهای ۱، ۳ و ۵ تفاوت های معنی داری را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *آلبندازول می‌تواند به صورت وابسته به دوز و زمان، مانع از تکثیر سلول‌های HT-29 و القاء مرگ سلولی شود.*

واژگان کلیدی: *آلبندازول، MTT، سرطان، کشندگی سلولی.*

مقدمه

سرطان یک مشکل بهداشت عمومی جهانی است و سالانه هزینه‌های هنگفتی صرف تحقیقات در زمینه پیشگیری و درمان این بیماری می‌شود. جراحی، اشعه درمانی، ایمنی درمانی و شیمی درمانی درمان‌های استاندارد برای سرطان هستند. از بین آنها، شیمی درمانی تاکنون یکی از مؤثرترین و قوی‌ترین روش‌ها برای درمان تومورهای بدخیم بوده است، اما مانع بزرگی که بر سر راه موفقیت درمان سرطان با شیمی درمانی وجود دارد، مسأله مقاومت دارویی است، یعنی مکانیسمی که سلول‌های سرطانی نسبت به داروی شیمی درمانی مقاوم می‌شوند (۱). آمار سرطان روز به روز افزایش می‌یابد و هنوز درمان ایده آلی برای سرطان وجود ندارد. از این رو، به جایگزین‌های درمانی جدیدی نیاز است و این مساله باعث شده که تلاش برای تولید داروهای ضد سرطان جدید بی وقفه ادامه داشته باشد.

آلبندازول مشتقی از بنزیمیدازول به عنوان یک داروی ضدانگل معرفی شده است. مکانیسم عمل اثر ضد انگلی آلبندازول از طریق مهار میکروتوبول‌ها و بلوکه کردن جذب گلوکز است که در مراحل لاروی و بلوغ انگل‌های حساس، ذخایر گلیکوژن را خالی می‌کند، و تشکیل ATP را کاهش می‌دهد و در مجموع باعث غیر متحرک شدن انگل می‌شود. آلبندازول همچنین با القاء استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA باعث تغییرات شبه آپوپتوزی در انگل می‌شود (۲، ۳). آلبندازول روی چندین رده سلول توموری نیز اثرات ضد تکثیری دارد و با افزایش تولید گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و استرس اکسیداتیو می‌تواند

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، الهام حویزی
(email: e.hoveizi@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۲/۱۷

Archive of SID
www.SID.ir

راهکاری در درمان سرطان در سلول‌های سرطانی که از سیگنالینگ آپوپتوزی فرار می‌کنند، باشد (۶- ۴).
سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع و چهارمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است (۹-۷). از این رو، هدف ما از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد تکثیری و کشندگی آلبندازول روی سلول‌های سرطانی کولورکتال انسان رده HT-29 با کمک آزمون MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو و بررسی مورفولوژیکی این سلول‌ها بود.

مواد و روشها

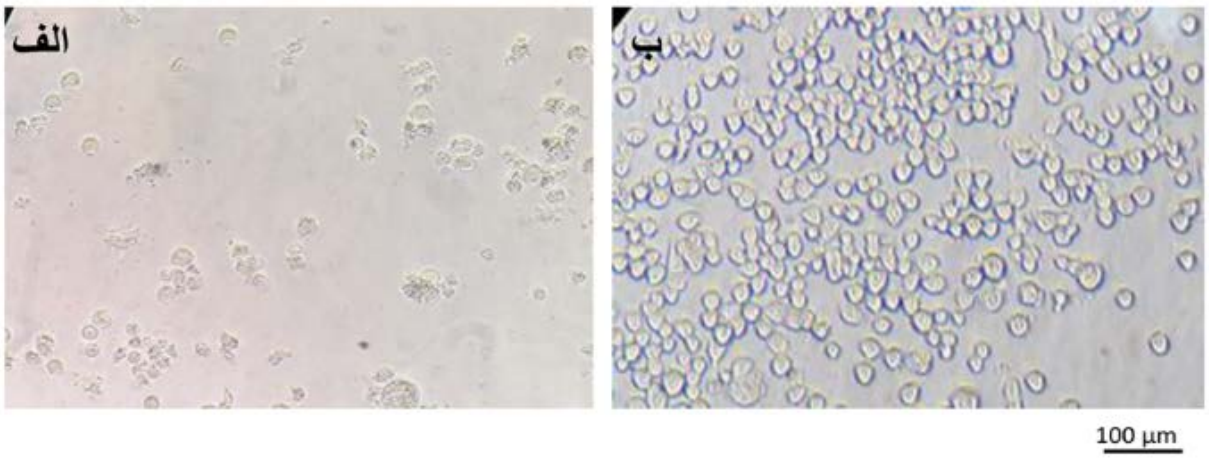
مطالعه حاضر از نوع تجربی است که بر روی سلول‌های سرطانی کولورکتال انسان رده HT29 در آزمایشگاه سلولی تکوینی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد. دوز آلبندازول و مدت زمان تیمار سلول‌ها متغیرهای مورد مطالعه بودند و بر اساس الگوی استاندارد، حداقل باید سه چاهک برای هر کدام از گروه‌های کنترل و آزمایش در هر روز تهیه و مورد ارزیابی قرار گیرد که در مطالعه حاضر از شش چاهک برای هر کدام از گروه‌ها استفاده شد. ابتدا برای تهیه غلظت‌های ۰/۱، ۱و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آلبندازول (CIPLA LTD,India) مقدار لازم از آن برای هر غلظت، در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل و سپس با محیط کشت به حجم مورد نظر رسانده شد و پس از فیلتر کردن، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رده سلولی HT29 از موسسه پاستور تهران خریداری و در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) کشت و در انکوباتور (ایران، شرکت سینا) با ۵٪ CO2، ۹۰٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. زمانی که حدود ۸۰٪ فلاسک با سلول پر شد، پاساژ سلولی انجام شد و سلول‌ها با تعداد تقریبی 1×10^4 cells/cm^2 در پلیت۹۶ چاهکی محتوی محیط معمول کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف آلبندازول تیمار و به‌مدت پنج روز در این شرایط نگهداری شدند. میزان بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف آلبندازول در این مطالعه، با استفاده از روش MTT (3-(4 , 5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltertrazolium Bromide) ارزیابی شد. برای انجام این آزمون از غلظت ۵ mg/ml MTT (Sigma, USA) به صورت زیر استفاده شد. دو گروه سلولی شامل سلول‌های سرطانی HT-29 و نمونه کنترل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آلبندازول قرار گرفتند و سلول‌های بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. ۱، ۳ و ۵ روز بعد از کشت سلولهای HT-29 در پلیت ۹۶ چاهکی تست MTT انجام شد، به این‌صورت که در زمان‌های مورد نظر، پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهکی، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰µl محیط تازه حاوی ۱۰ µl از محلول MTT اضافه شد و به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس محلول MTT خارج و به هر چاهک ۱۰۰ µl DMSO (Merck, USA, 100%)اضافه شد و در نهایت با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر(Biotek، آلمان) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای شمارش سلول ها محلول رنگ تریپان بلو ۰/۴ ٪ تهیه گردید. به این صورت که ۰/۴ گرم از رنگ تریپان بلو در ۱۰۰ میلی لیتر PBS حل شد و این محلول بصورت تازه تهیه و قبل از استفاده با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. دو گروه سلولی شامل سلول‌های سرطانی HT-29 و نمونه کنترل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آلبندازول قرار گرفتند و سلول‌های بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. ۱، ۳ و ۵ روز بعد از کشت سلول‌های HT-29 در پلیت ۹۶ چاهکی شمارش شدند. در هر روز خاص، سلول‌های ۲۰ منطقه (با ابعاد $1mm^2$) به‌صورت تصادفی انتخاب و شمارش شدند و میانگین صد سلول در هر روز برای هر غلظت محاسبه شد. مورفولوژی سلول‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده، با استفاده از نسخه ۱۸نرم افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و به کمک آزمون آماری ANOVA ارزیابی شدند. نمودارها با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) رسم و تفاوت‌ها در سطح $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی مشاهدات مورفولوژی سلول‌های سرطانی رده HT-29 با میکروسکوپ اینورت نشان داد غلظت‌های مختلف استفاده شده از آلبندازول تغییرات مورفولوژیکی محسوسی در سلولهای سرطانی ایجاد می‌کند. این تغییرات شامل کاهش حجم قابل توجه سلول‌ها همراه با گرد شدن و چروکیدگی آنها است که در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت‌ها کاملا مشخص بود و همچنین گرانوله شدن سلول‌ها همراه با سایر تغییرات مشهود بود (شکل ۱). همچنین مقایسه درصد زنده ماندن سلول‌ها با روش MTT نشان داد که سلول‌های سرطانی HT-29 پس از تیمار با غلظت‌های تعیین شده آلبندازول در روز اول نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). بقای سلول‌ها پس از در معرض قرار گرفتن با

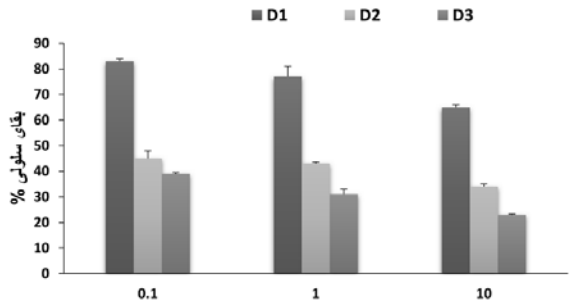
Archive of SID

www.SID.ir

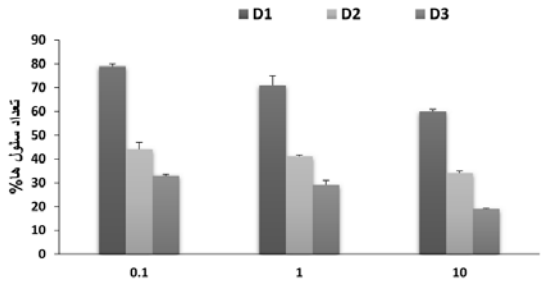


شکل ۱. بررسی مورفولوژی سلول‌های HT-29 تیمار شده با آلبندازول با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از میکروسکوپ معکوس، پنج روز بعد از تیمار. الف- سلول‌های در حال آپوپتوز در نمونه تیمار شده؛ ب- نمونه کنترل

همان غلظت‌ها در روز سوم نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به روز اول تیمار به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).



شکل ۲. اثرات غلظت‌های مختلف آلبندازول بر بقای سلول‌های HT-29. بررسی بقا با روش MTT در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از تیمار انجام گرفت.



شکل ۳. اثرات غلظت‌های مختلف آلبندازول بر تکثیر و تعداد سلول‌های HT-29. تعداد سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از تیمار انجام گرفت.

درصد زنده بودن سلول‌ها در گروه‌های مورد آزمایش در روز پنجم نسبت به گروه کنترل و سایر روزها به شدت کاهش یافت که نسبت به نمونه کنترل و نمونه های روز اول کاهش معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، اما در مقایسه با روز سوم کاهش معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) (شکل ۲). به منظور بررسی اثرات غلظت‌های مختلف آلبندازول بر رشد و تکثیر سلول‌های رده HT-29 از مشاهدات مورفولوژی و شمارش با تریپان بلو استفاده شد. تحلیل نتایج در این قسمت مطابق با نتایج درصد بقای سلولی بود و به طور کلی نتایج نشان داد که آلبندازول به صورت وابسته به دوز و زمان سبب کاهش چشم گیری در روند رشد و تکثیر سلول‌ها ی HT-29 می‌شود (شکل ۳).

بحث

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که آلبندازول به صورت وابسته به دوز و زمان، میزان بقاء و تکثیر سلول‌های سرطانی کولورکتال انسان رده HT-29 را کاهش داد؛ به عبارت دیگر، تیمار سلول‌های HT-29 با دوزهای مختلف آلبندازول، مرگ سلول‌ها را متناسب با دوز دارو و زمان تیمار افزایش داد. با بررسی اثرات آلبندازول روی سلول‌های سرطانی مختلف در مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر، مکانیسم‌های مختلفی برای اثر ضد تکثیری و ضد سرطانی این دارو بیان شده است که برخی از آنها در اینجا مورد بحث قرار می‌گیرد. اثر کشندگی آلبندازول می‌تواند ناشی از القاء استرس اکسیداتیو توسط این دارو در سلول‌های سرطانی باشد. کاسترو و همکارانش در مطالعه خود بیان کردند که آلبندازول،

Archive of SID

www.SID.ir

با تغییر در استرس اکسیداتیو و القاء آسیب DNA سلولی، اثر ضد توموری دارد، به طوری که بقای سلول‌های رده MCF-7 را کاهش داده و مانع از تشکیل کلونی این سلول‌ها شد. آنها همچنین افزایش مقادیر گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (Reactive oxygen species) داخل سلولی به دنبال تیمار با آلبندازول را گزارش کردند و از این رو نتیجه گیری کردند که آلبندازول استرس اکسیداتیو را القاء می‌کند، باعث تخریب DNA می‌شود، آپوپتوز را افزایش می‌دهد و مرگ سلولی را القا می‌کند (۱۰)؛ پس می‌تواند یک مولکول راهنمای امیدوارکننده برای تهیه داروهای ضد تومور جدید باشد (۱۲, ۱۱).

مکانیسم دیگری که آلبندازول می‌تواند اثر کشندگی خود را با آن اعمال کند، مهار پلیمریزاسیون توبولین و در نتیجه تکثیر سلولی است (۱۴, ۱۳)، در مطالعه‌ای، چو و همکارانش با بررسی اثر آلبندازول روی سلول‌های سرطانی تخمدان انسان رده 1A9PTX22 که مقاوم به داروی پکلیتاکسل بودند، اعلام کردند که آلبندازول با مهار قوی پلیمریزاسیون توبولین باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی تخمدان انسان می‌شود (۴).

آلبندازول می‌تواند تقسیم میتوز در سلول‌های سرطانی را متوقف کند، همان گونه که ژانگ و همکارانش با بررسی اثر آلبندازول روی سلولهای سرطان معده انسان اعلام کردند آلبندازول با بر هم زدن تشکیل میکروتوبول‌ها و توقف میتوز، اثر ضد سرطانی دارد که با تجمع سیکلین بتا ۱ نیز مرتبط است و در نتیجه باعث القاء آپوپتوز هم می‌شود. میکروتوبول‌ها نقشی حیاتی در چرخه سلولی دارند. سرطان شناسان مهارکننده‌های میکروتوبولی تولید کرده‌اند که می‌توانند از تقسیم سلولی کنترل نشده آنچنان که در سرطان دیده می‌شود جلوگیری کنند. آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی نیز یک مکانیسم طبیعی بدن برای حذف سلول‌های غیر طبیعی و ناخواسته است که به این وسیله از سرطانی شدن بافت‌ها جلوگیری می‌کند و به نظر می‌رسد داروهایی که بتوانند آپوپتوز را در بدن فعال کنند، گزینه‌هایی مناسب برای درمان سرطان باشند (۱۵).

پتل و همکارانش اثر آلبندازول را به تنهایی و در ترکیب با اشعه درمانی روی بقای سلول کلوژنیک رده سلولی MM و SCLC بررسی و مقایسه کردند و نشان دادند که آلبندازول این رده‌های سلولی را به اشعه حساس می‌کند و ترکیب این دارو با اشعه، درمانی بالقوه برای متاستاز MM و SCLC به مغز می‌تواند باشد (۱۶).

فلوبندازول و مبندازول دو داروی ضد انگل دیگر از خانواده بنزیمیدازول‌ها هستند که از طریق مهار عملکرد میکروتوبول‌ها اثرات ضد سرطانی وسیعی دارند. میکالیس و همکارانش در مطالعه‌ای اثر فلوبندازول روی رده‌های سلولی زیادی از سرطان نوروبلاستوما را بررسی کردند و آن را به عنوان یک ترکیب بالقوه ضد نوروبلاستوما معرفی کردند. آنها در مطالعه خود بیان کردند که فلوبندازول باعث آپوپتوز با واسطه پروتئین P53 می‌شود و در مقایسه با سایر داروهای ضد سرطان یک درمان بالقوه برای نوروبلاستوما از جمله سلول‌هایی که به درمان پاسخ نمی‌دهند، است (۱۷). در مجموع می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاهش تکثیر و بقاء سلولی وابسته به زمان و دوز سلول‌های HT-29 به دنبال تیمار با دوزهای مختلف آلبندازول در مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که آلبندازول دارای اثر کشندگی روی این سلول‌ها است و این مطالعه تأییدی بر یافته‌های قبلی سایر محققین است، مبنی بر اینکه با انجام مطالعات بیشتر احتمالا آلبندازول می‌تواند یک گزینه درمانی مناسب برای درمان سرطان باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این تحقیق از محل گرنت پژوهشی نویسندگان تامین شده است و نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن آوری دانشگاه شهید چمران اهواز اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Liang XJ, Chen C, Zhao Y, Wang PC. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. Methods Mol Biol 2010;596:467-88.

2. Martinez-Espinosa R, Arguello-Garcia R, Saavedra E, Ortega-Pierres G. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan Giardia duodenalis. Front Microbiol 2015;6:800.

3. Arguello-Garcia R, Cruz-Soto M, Gonzalez-Trejo R, Paz-Maldonado LM, Bazan-Tejeda ML, Mendoza-Hernandez G, et al. An antioxidant response is involved in resistance of Giardia duodenalis to albendazole. Front Microbiol 2015;6:286.

4. Chu SW, Badar S, Morris DL, Pourgholami MH. Potent inhibition of tubulin polymerisation and proliferation of paclitaxel-resistant 1A9PTX22 human ovarian cancer cells by albendazole. Anticancer Res 2009;29:3791-6.

Archive of SID

www.SID.ir

5. Holden-Dye L, Walker RJ. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in Caenorhabditis elegans. WormBook 2014:1-29.

6. Pourgholami MH, Woon L, Almajd R, Akhter J, Bowery P, Morris DL. In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. Cancer Lett 2001;165:43-9.

7. Baltruskeviciene E, Schveigert D, Stankevicius V, Mickys U, Zvirblis T, Bublevic J, et al. Down-regulation of miRNA-148a and miRNA-625-3p in colorectal cancer is associated with tumor budding. BMC Cancer 2017;17:607.

8. Matsuda T, Okuyama A. The estimates of 5-year colorectal cancer prevalence in adult population in 2012. Jpn J Clin Oncol 2017;47:669-70.

9. Cho YC, Nguyen TT, Park SY, Kim K, Kim HS, Jeong HG, et al. Bromopropane Compounds Increase the Stemness of Colorectal Cancer Cells. Int J Mol Sci 2017;18.pii: E1888.

10. Castro LS, Kviecinski MR, Ourique F, Parisotto EB, Grinevicius VM, Correia JF, et al. Albendazole as a promising molecule for tumor control. Redox Biol 2016;10:90-9.

11. Oxberry ME, Reynoldson JA, Thompson RC. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in Giardia duodenalis. J Vet Pharmacol Ther 2000;23:113-20.

12. Oxberry ME, Thompson RC, Reynoldson JA. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Spironucleus muris using transmission electron microscopy. Int J Parasitol 1994;24:695-703.

13. Tang Y, Liang J, Wu A, Chen Y, Zhao P, Lin T, et al. Co-Delivery of Trichosanthin and Albendazole by Nano-Self-Assembly for Overcoming Tumor Multidrug-Resistance and Metastasis. ACS Appl Mater Interfaces 2017;9:26648-64.

14. Krucken J, Fraundorfer K, Mugisha JC, Ramunke S, Sifft KC, Geus D, et al. Reduced efficacy of albendazole against Ascaris lumbricoides in Rwandan schoolchildren. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2017;7:262-71.

15. Zhang X, Zhao J, Gao X, Pei D, Gao C. Anthelmintic drug albendazole arrests human gastric cancer cells at the mitotic phase and induces apoptosis. Exp Ther Med 2017;13:595-603.

16. Patel K, Doudican NA, Schiff PB, Orlow SJ. Albendazole sensitizes cancer cells to ionizing radiation. Radiat Oncol 2011;6:160.

17. Michaelis M, Agha B, Rothweiler F, Loschmann N, Voges Y, Mittelbronn M, et al. Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. Sci Rep 2015;5:8202.

Archive of SID

www.SID.ir