

ارزیابی اثرات داروی سلوکسیب بر یاخته‌های تومور لنفوم موش (EL4)

لیلا امامی^۱، شهاب‌الدین صافی^{۲*}، فرهاد ذاکر^۳

چکیده

لنفوم یکی از شایع‌ترین تومورها در اکثر گونه‌های موش می‌باشد. از طرفی خصوصیات بیولوژیک، هیستوپاتولوژیک و اپیدمیولوژیک لنفوم موش تشابه زیادی با سرطان‌های لنفوم در انسان دارد. از این رو تومورهای لنفوم موش می‌توانند مدل مناسبی برای مطالعه بیولوژیک سرطان‌های انسانی باشند. هدف مطالعه حاضر ارزیابی اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک سلوکسیب بر روی یاخته‌های توموری لنفوم موش (EL4) با استفاده از آزمون‌های Annexin/PI و MTT می‌باشد. نتایج آزمون MTT، مهار وابسته به دوز و زمان یاخته‌های EL4 توسط سلوکسیب و مهار ۵۰ درصدی بقای یاخته‌ها را در غلظت ۲۰ میکرومولار سلوکسیب، نشان داد. به علاوه درصد یاخته‌های دچار آپوپتوز پس از تماس ۴۸ ساعته یاخته‌ها با غلظت IC₅₀ (مهار ۵۰ درصدی بقای یاخته‌ها) سلوکسیب (۲۰ میکرومولار) افزایش یافت. براساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد، سلوکسیب می‌تواند به عنوان یک درمان کمکی مناسب، همراه با سایر ترکیبات مورد استفاده در درمان سرطان لنفوم موش، استفاده گردد.

واژگان کلیدی: سلوکسیب، آپوپتوز، رده EL4، لنفوم، موش

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲

مقدمه

از جمله نئوپلاسم‌های شایع در انسان و حیوان، انواع لنفوم‌ها می‌باشند که براساس طبقه‌بندی‌های پاتولوژیک دارای انواع مختلفی هستند. سیستم لنفوی در موش، پنجمین یا ششمین محل هدف مواد رایج سرطان زاست. شیوع لنفوم با افزایش سن در موش‌ها به میزان ۵۰-۱۰ درصد افزایش می‌یابد. خصوصیات بیولوژیک، هیستوپاتولوژیک و اپیدمیولوژیک سرطان لنفوم موش تشابه زیادی با سرطان‌های لنفوم در انسان دارد. از این رو تومورهای لنفوم موش می‌توانند مدل مناسبی برای مطالعه بیولوژیک سرطان‌های انسانی باشند (۱۶). یکی از رده‌های سلولی تومور لنفوم موش، رده EL4 می‌باشد.

از مشخصات این رده می‌توان به غیرچسبنده بودن آن اشاره کرد. برای نوآوری سعی شد از رده‌ای استفاده شود که نزدیک به لنفوم‌های انسانی و همچنین، در دسترس باشد و کمتر بر روی آن پژوهش انجام گرفته باشد. هزینه زیاد، فقدان درمان‌های مؤثر، ایجاد مقاومت دارویی و عوارض جانبی گاه‌آ شدید درمان‌های ضد توموری رایج، از جمله عواملی هستند که لزوم انجام مطالعات گسترده جهت شناسایی عوامل دارویی مؤثرتر و امن را ایجاد می‌کنند. داروهای ضدالتهاپی غیر استروئیدی از جمله ترکیبات پرکاربرد در درمان سرطان‌های مختلف هستند (۷). این داروها شامل طیف گسترده‌ای از ترکیبات با خواص فارماکولوژیک متفاوت می‌باشند. یکی از انواع پرکاربرد این داروها، سلوکسیب می‌باشد. این دارو یکی از مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ بوده که فعالیت ضدالتهاپی خود را بدون اثرات منفی بر دستگاه گوارش اعمال می‌کند. مطالعات اپیدمیولوژیک و تجربی نشان داده‌اند که مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز-۲ عوامل ضدسرطانی مؤثری بوده و خطر ابتلا به تعدادی از تومورها مثل سرطان‌های کولون، ریه، پروستات و معده را به شدت کاهش می‌دهند (۱۸ و ۹، ۷، ۴، ۲، ۱). مطالعات مختلف وجود دو مدل اثرات ضد توموری را برای سلوکسیب نشان داده‌اند. یکی از این مدل‌ها اثرات وابسته به آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ و دیگری مستقل از آن می‌باشد. مکانیسم‌های مطرح شده برای مدل اول شامل مهار رشد یاخته‌ها و القای آپوپتوز سلولی به دنبال افزایش IGFBP-3، مهار سنتز PGE2، مهار فعال‌سازی MAP-Kinase، کاهش بیان Bcl2 و مهار فعال‌سازی Cytochrome C می‌باشند (۱۸ و ۱۴).

۱- دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲- گروه پاتولوژی و کلبیکال پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. safishahab@gmail.com

۳- گروه هماتولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

داده و در انکوباتور با دمای 37°C و غلظت ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. جهت حفظ رشد تصاعدی یاخته‌ها، محیط کشت هر دو روز یکبار تعویض گردید و پس از رسیدن تراکم یاخته‌ها به ۸۰ تا ۹۰٪، سلول‌ها پاساژ داده شد. با توجه به تعداد اولیه یاخته‌های کشت داده شده (Countess TM automated cell counter, Invitrogen)، روند رشد یاخته‌ها، مساحت فلاسک مورد استفاده، شمارش متوالی یاخته‌ها و رنگ محیط کشت درون فلاسک، تراکم سلولی تعیین می‌گردید. جهت پاساژ سلولی، پس از خارج کردن فلاسک از انکوباتور، سوسپانسیون سلولی را به لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری انتقال داده و به مدت ۵ دقیقه با دور 1200 RPM سانتریفوژ کردیم. سپس محیط کشت رویی در لوله فالكون حذف و یک میلی لیتر محیط کشت جدید به پلت سلولی اضافه گردید و در نهایت سوسپانسیون سلولی حاصل به فلاسک‌های جدید انتقال یافت.

تیمار یاخته‌ها

محللول استوک سلوکوسیب با غلظت ۱۰ میلی مولار تهیه گردید که در آن از DMSO و محیط کشت RPMI 1640 به عنوان حلال استفاده شد. در ادامه با استفاده از محیط کشت، غلظت‌های مورد نیاز سلوکوسیب (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار) بدست آمد و گروه کنترل حاوی سلول‌ها در محیط کشت نیز قرار داده شد. در ابتدا تیمار یاخته‌ها در سه زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد و با توجه به نتایج آزمون MTT حاصل از آنها، ۴۸ ساعت بهترین مدت زمان انکوباسیون بدست آمد. پس از تعیین غلظت ۲۰ میکرومولار سلوکوسیب به عنوان غلظت IC_{50} با مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، تیمار مجدد یاخته‌ها با غلظت‌هایی در محدوده غلظت IC_{50} برای آزمون فلوسایتومتری انجام شد.

شمارش یاخته‌ها

با قرار دادن فلاسک حاوی سوسپانسیون سلولی در زیر میکروسکوپ معکوس، حرکت یاخته‌های شناور رده EL4 در محیط کشت درون فلاسک مشاهده گردید. در

این در حالی است که مهار سیگنالینگ NF-KB از طریق مهار JKB Kinase B، تجمع سرامید در یاخته‌ها و القای آپوپتوز، افزایش فعال‌سازی پروتئین Bax، افزایش کاسپازها، کند کردن چرخه سلولی و کاهش بیان پروتئین‌های بقا مثل Mcl-1 می‌تواند سبب ایجاد اثرات مستقل از آنزیم سیکلوآکسیژناز-۲ شوند (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۵ و ۱۹).

طبق مطالعات انجام شده مشخص شده است که اثرات ضد توموری سلوکوسیب بسته به نوع سلول‌های مورد مطالعه متفاوت است. از آنجایی که تا به امروز مطالعه‌ای روی اثرات این ترکیب علیه سرطان‌های موش انجام نشده است، در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوزی سلوکوسیب را بر روی یاخته‌های توموری لنفوم موش (رده EL4) بررسی نماییم.

مواد و روش کار

- مواد

رده سلولی EL4 (ATCC:TIB-39) حاوی سلول‌های توموری لنفوم موش (سویه C57BL/6N)، بصورت فلاسک سلولی حاوی لنفوسیت‌های T با مورفولوژی لنفوبلاست از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران و پودر سلوکوسیب (حاوی ماده مؤثره) از شرکت داروسازی عبیدی تهیه شد. محیط کشت Rosvelt Park Maschuset Institute 1640 (RPMI 1640) از شرکت Bio idea (ایران)، سرم جنینی گاو (FBS: Tetal) (Vovine Serum) سرم شست و شو دهنده (PBS: Phosphate Buffered Saline)، محللول DMSO (Dimethyl Sulfoxide)، کیت Annexin-V-FLUOS/PI و محللول (3-(4,5-MTT Dimethyl -2- thiazolyl)-2,5 diphenyl -2H - tetrazolium bromide) از شرکت SIGMA (آمریکا) تهیه گردید.

- روش کار

کشت یاخته‌ها

یاخته‌های EL4 در محیط RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS) و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین G (100 IU mL^{-1}) به همراه استرپتومایسین ($1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) کشت

انحلال فورمازان در خود باعث پخش شدن رنگ ارغوانی در چاهک‌ها می‌شود). سپس جهت پخش بیشتر رنگ ارغوانی در چاهک‌ها پلیت را به مدت ۵ دقیقه در شیکر قرار دادیم. در آخر جذب نوری چاهک‌ها به وسیله دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. متعاقب محاسبه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف سلوکسیب، این مقادیر را بر میانگین جذب نوری گروه کنترل تقسیم کرده و اعداد حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب شد. اعداد بدست آمده در واقع درصد زنده مانده یاخته‌ها پس از تجویز غلظت‌های مختلف سلوکسیب می‌باشند. با استفاده از درصد‌های بدست آمده منحنی دوز - پاسخ رسم گردید و غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصدی بقای یاخته‌ها (IC₅₀) از روی نمودار بدست آمد.

سنجش میزان آپوپتوز یاخته‌ها

ارزیابی کمی میزان فسفاتیدیل سرین منتقل شده به سطح یاخته‌های در حال آپوپتوز به وسیله کیت Annexin-V-FLUOS انجام شد. اساس کار این کیت بر اتصال Annexin V به فسفاتیدیل سرینی می‌باشد که از لایه داخلی به لایه خارجی غشای یاخته‌های در حال آپوپتوز منتقل شده است. پس از شمارش یاخته‌ها بوسیله لام نئوبار، یاخته‌ها با چگالی Cells/۲cc $10^3 \times 10^3$ در چاهک‌های پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. پس از آن تیمار یاخته‌ها با غلظت‌های ۱۵، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار سلوکسیب انجام شد. گروه کنترل حاوی محیط کشت نیز قرار داده شد. پس از طی شدن مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون یاخته‌ها، محتویات چاهک‌ها پس از پیتاژ به داخل میکروتیوپ‌ها منتقل شدند و میکروتیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور RPM ۱۲۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از حذف مایع رویی در میکروتیوپ‌ها، بر روی پلت یاخته‌ها ۱۰۰ میکرولیتر

ابتدا با استفاده از رنگ آمیزی یاخته‌ها به روش تریپان بلو بوسیله لام نئوبار، تعداد یاخته‌های زنده موجود در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

حجم نمونه $\times 10^4 \times$ تعداد سلول‌های زنده شمارش شده در مربع بزرگ وسط لام نئوبار = تعداد سلول‌های زنده در حجم نمونه در فرمول بالا میتوان به جای شمارش تعداد سلول‌های زنده در مربع بزرگ وسط لام نئوبار، میانگین تعداد سلول‌های زنده در ۴ مربع بزرگ اطرافی لام را قرار داد. در نهایت با تقسیم عدد بدست آمده بر حجم نمونه، تعداد سلول‌های زنده در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی بدست آمد.

سپس با توجه به تعداد یاخته‌های زنده، یاخته‌ها با چگالی Cells/۱۰۰ μ l 20×10^3 در محیط کشت RPMI بدون فنل رد درون پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از آن غلظت‌های مورد مطالعه سلوکسیب به چاهک‌ها اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل گردید.

تعیین درصد بقای یاخته‌ها با استفاده از آزمون MTT

اساس این آزمون بر احیای آنزیمی تترازولیوم زرد رنگ به فورمازان ارغوانی رنگ بوسیله میتوکندری یاخته‌های زنده می‌باشد. بدین منظور پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون یاخته‌ها در مجاورت غلظت‌های مورد مطالعه سلوکسیب، پلیت ۹۶ خانه را از انکوباتور خارج کرده و به هر چاهک آن ۱۰ml محلول MTT افزودیم. سپس برای جلوگیری از تابش نور به یاخته‌ها، دور پلیت را فویل آلومینیومی کشیده و آن را به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار دادیم. پس از طی مدت انکوباسیون ذکر شده، پلیت به مدت ۵ دقیقه با دور RPM ۱۲۰۰ سانتریفوژ و سپس مایع رویی تخلیه شد و مقدار ۱۰۰ml دی متیل سولفوکساید به چاهک‌ها اضافه گردید (DMSO با نفوذ پذیر کردن غشای سلولی و

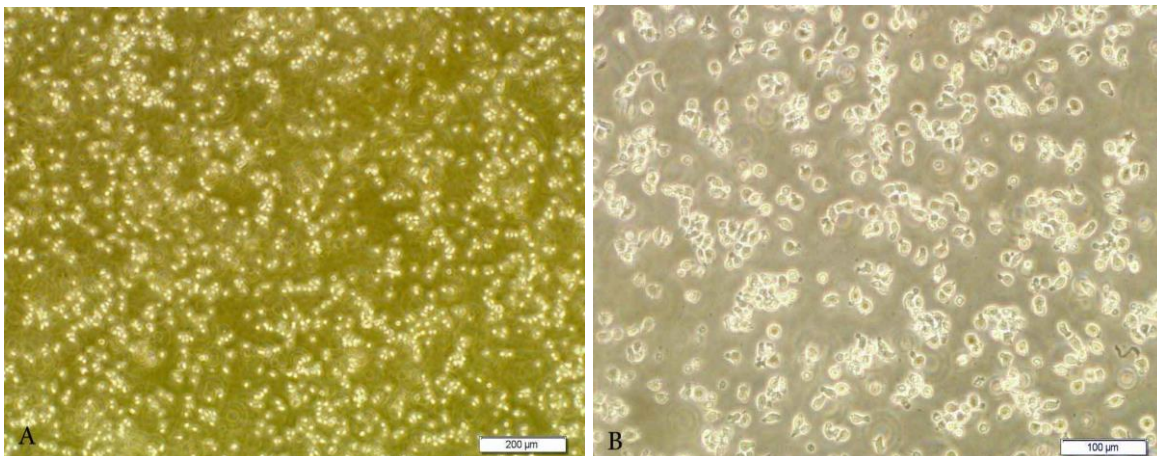
تجزیه و تحلیل آماری

تمامی داده‌های گردآوری شده در بانک اطلاعاتی نرم‌افزار STATA 13 ذخیره و سپس تحلیل آماری روی آنها انجام گردید. با محاسبه میانگین، انحراف معیار، حداقل و حداکثر درصد زنده مانده سلول‌ها در سطح غلظت‌های مختلف برای گروه‌های دریافت کننده سلوکوکسیب توصیف شدند. برای مقایسه معنی‌دار بودن تفاوت سطح زنده مانده یاخته‌ها در بین غلظت‌های مختلف، ابتدا توزیع داده‌ها از لحاظ پیروی کردن از توزیع نرمال با استفاده از تست shapiro-wilk test و نمودارهای مرتبط بررسی شد. با توجه به اینکه داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نمی‌کردند از تست‌های غیرپارامتری kruskalwallis استفاده گردید. در تمام تحلیل‌های آماری، سطح معنی‌داری زیر ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. همچنین برای مقایسه‌های دوگانه از Dunn's Pairwise Comparison استفاده گردید.

محلول Binding buffer افزوده و پیپتاژ کردیم. سپس به هر میکروتویوپ ۲ میکرولیتر Annexin V و ۲ میکرولیتر یدید پروپییدیوم (PI) افزودیم. این سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. پس از طی زمان مذکور، به منظور شست و شو به هر میکروتویوپ ۱ میلی‌لیتر PBS افزوده و میکروتویوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ RPM سانتریفوژ شدند. پس از آن محلول رویی حذف و مجدداً به هر پلت یاخته‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر Binding buffer اضافه گردید. در نهایت محتویات میکروتویوپ‌ها به لوله‌های مخصوص دستگاه فلوسایتومتری Becton Dickinson مدل Facs caliber ساخت کشور آمریکا منتقل شده و نتایج آزمون، توسط دستگاه مورد بررسی قرار گرفت.

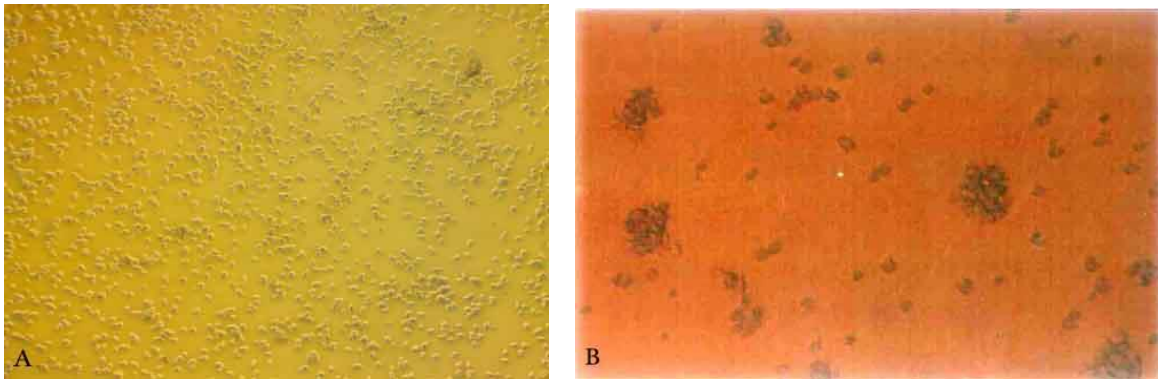
نتایج

ریخت‌شناسی یاخته‌ها



نگاره ۱- ریخت‌شناسی یاخته‌های EL4 در بزرگنمایی‌های مختلف با میکروسکوپ Invert (A=۱۰×, B=۲۰×)

در نگاره ۱، ریخت‌شناسی طبیعی یاخته‌های رده EL4 که همان ریخت‌شناسی یاخته‌های لمفوبلاست را دارند، مشاهده می‌شود.



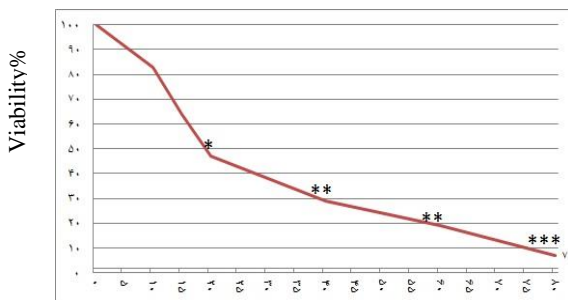
نگاره ۲- ریخت شناسی باخته‌های EL4 در گروه‌های کنترل (A) و تیمار در غلظت IC₅₀ سلوکسیب (B)

آمد. با توجه به نمودار ۱ و ۲ سلوکسیب به صورت وابسته به دوز، سبب مهار تکثیر باخته‌های EL4 گردید. غلظت ۲۰ میکرومولار سلوکسیب به عنوان غلظت IC₅₀ تعیین شد.

در نگاره ۲، نیز تغییرات ریخت‌شناسی باخته‌های مورد مطالعه پس از اضافه کردن سلوکسیب (گروه تیمار) و گروه کنترل ارائه شده است. از مهمترین تغییرات سلول‌ها پس از تجویز غلظت IC₅₀ سلوکسیب می‌توان به از دست رفتن ریخت شناسی طبیعی سلول‌ها و ایجاد سلول‌هایی کروی با سیتوپلاسم چروکیده اشاره کرد.

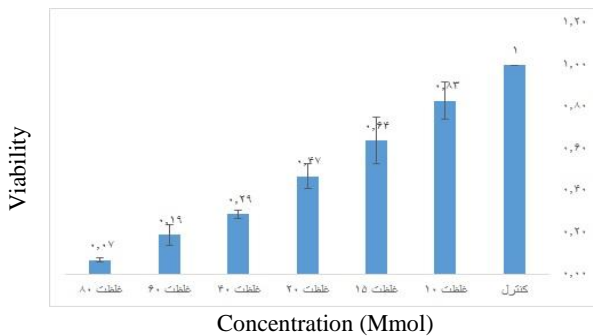
اثرات ضد تکثیری سلوکسیب روی باخته‌های EL4

آزمون MTT با غلظت‌های مورد مطالعه در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های دارویی انجام شد. در بازه زمانی ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در مجاورت دارو، بیشتر از ۶۰٪ سلول‌ها زنده ماندند و همچنین در بازه زمانی ۷۲ ساعت انکوباسیون نیز کمتر از ۴۰٪ سلول‌ها زنده ماندند. تنها در مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، غلظت IC₅₀ سلوکسیب بدست آمد. در نتیجه ۴۸ ساعت به عنوان بهترین مدت زمان انکوباسیون سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های دارویی تعیین گردید و تجزیه و تحلیل آماری آزمون MTT با انکوباسیون ۴۸ ساعت سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های دارویی مورد مطالعه انجام شد و نهایتاً با همین مدت زمان انکوباسیون سلول‌ها در مجاورت دارو، آزمون فلوسایتومتری انجام گرفت. متعاقب تماس ۴۸ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار سلوکسیب، میانگین درصد بقای باخته‌ها ± انحراف معیار آنها به ترتیب ۸۳±۹، ۶۴±۱۱، ۴۷±۶، ۲۹±۲، ۱۹±۵ و ۷±۱ بدست



نمودار ۱- منحنی دوز - پاسخ مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف سلوکسیب بر بقای باخته‌های EL4

نمودار ۲- میانگین ± انحراف معیار Viability باخته‌ها در گروه‌های سلوکسیب و گروه کنترل



نمودار ۲- میانگین ± انحراف معیار Viability باخته‌ها در گروه‌های سلوکسیب و گروه کنترل

* ۰/۰۱ < P value < ۰/۰۵

** ۰/۰۰۱ < P value < ۰/۰۱

*** P value < ۰/۰۰۱

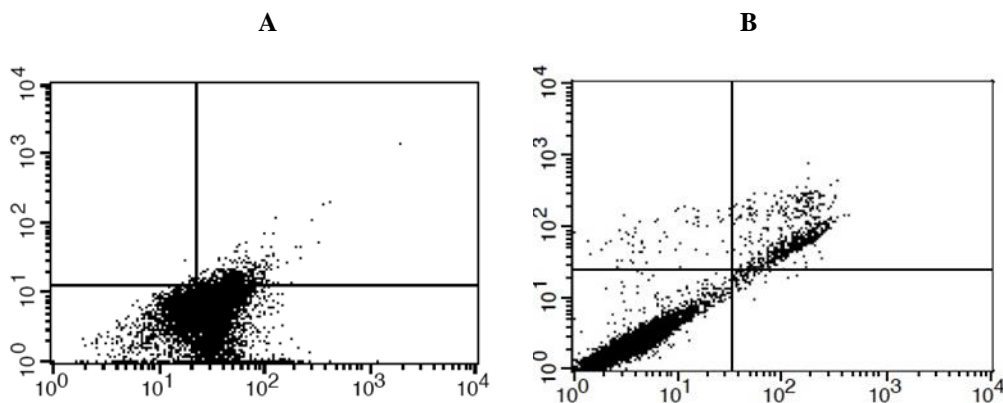
نواحی Q₂-Q₄ به عنوان درصد کل وقوع آپوپتوزیس (سلول‌های آپوپتوز شده ی زودرس و دیررس) در نظر گرفته شد. در این حالت سلول‌های قرار گرفته در نواحی Q₁ و Q₃ به ترتیب، معرف سلول‌های نکروزی و سالم می باشد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دو بعدی به ۴ ناحیه Q₁(upper left)-Q₄(lower left) صورت گرفت: به نحوی که ناحیه ی Q₁ نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی PI⁺، ناحیه Q₂(upper right) نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده ی دیررس با ویژگی Annexin-PI⁺: ناحیه ی Q₃(lower right) نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی Annexin-PI⁻ و ناحیه ی Q₄ نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده ی زود رس با ویژگی Annexin⁺ می باشد.

نتایج حاصل از تست MTT، بیان‌گر تأثیرات سایتوتوکسیک وایسته به دوز و زمان سلوکسیب بر رده سلولی مورد مطالعه بودند.

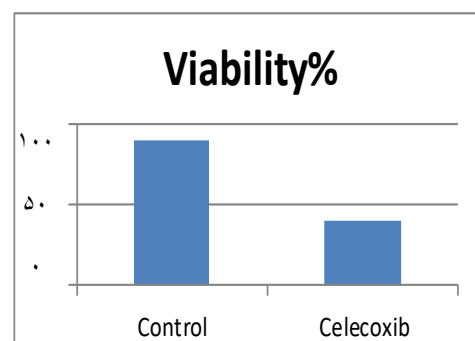
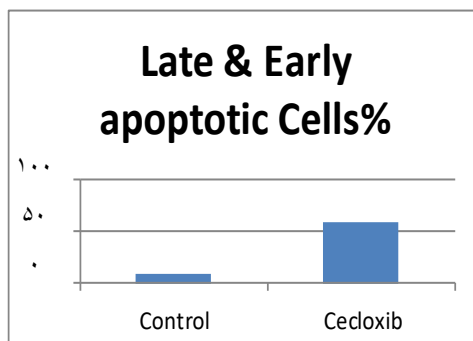
القای آپوپتوز در یاخته‌های EL4 به دنبال تجویز غلظت IC₅₀ سلوکسیب

۴۸ ساعت پس از تجویز غلظت ۲۰ میکرومولار سلوکسیب به یاخته‌های توموری لنفوم موش، درصد یاخته‌های دچار آپوپتوز با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری و روش Annexin V/PI تعیین گردید.

در نمودار دو بعدی Annexin در برابر PI محاسبات با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی به روی ۴ ناحیه ی اصلی Q₁ تا Q₄ انجام پذیرفت. مجموع درصد سلول‌های واقع شده در



نگاره ۳- نمودارهای فلوسایتومتری گروه‌های کنترل (A) و تیمار در غلظت IC₅₀ سلوکسیب (B)



نمودار ۳- نمودارهای تأثیر سلوکسیب (غلظت IC₅₀) در مقایسه با گروه کنترل بر وضعیت یاخته‌ها

های مولکولی دقیق اثرات ضد توموری مهار کننده‌های این آنزیم به طور کامل مشخص نیست. چنانچه این ترکیبات تنها از طریق تعدیل بیان آنزیم سیکلوآکسیژناز-۲ اثرات خود را اعمال کنند استفاده از آنها تنها به تومورهایی با بیان قابل توجه این آنزیم محدود می‌گردد. این در حالی است که برخی محققین اثرات مستقل از آنزیم سیکلوآکسیژناز-۲ این داروها را گزارش کرده‌اند (۱۹ و ۱۷، ۱۵، ۱۱، ۹). در اینجا به برخی از مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضدسرطانی داروی سلوکسیب می‌پردازیم.

Nakamura و همکارانش در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه‌ای، استراتژی جدیدی با استفاده از آنتی بادی‌های گیرنده VEGF و سلوکسیب برای درمان دارویی لنفومای MALT معده پیشنهاد کردند. آنها با استفاده از *Helicobacter heilmannii* موفق به القای این لنفوم در موش شدند. به دنبال تجویز آنتی بادی‌های گیرنده VEGF یا سلوکسیب اندازه تومور کاهش یافته و تغییرات آپوپتوتیک در یاخته‌های اندوتلیال شبکه مویرگی تومور ایجاد گردید (۱۳).

Gallouet و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ به مطالعه‌ای در رابطه با اثرات غیر وابسته به Cox-2 در یاخته‌های B لنفوم‌های حساس به سلوکسیب به آپوپتوز ایجاد شده توسط TRAIL پرداختند. در این مطالعه یاخته‌های استرومال مشتق شده از مغز استخوان یا گره‌های لنفاوی و یاخته‌های B از لنفومای فولیکولار در کشت توامان و یا کشت به تنهایی تحت درمان یا سکوسیپ، یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی و یا TRAIL، یک مولکول سایتوتوکسیک امیدوار کننده برای درمان سرطان قرار گرفتند. در این تحقیق نشان داده شد که یاخته‌های استرومال لنفومای فولیکولار تولید مقادیر زیادی از PGE2 را می‌کنند که این ماده تولید شده پس از درمان با

همانگونه که در نگاره ۳ و نمودار ۳ مشخص است، غلظت IC50 سلوکسیب می‌تواند علاوه بر کاهش درصد یاخته‌های زنده، سبب افزایش درصد یاخته‌های دچار آپوپتوز (مجموع آپوپتوز زودرس و دیررس) نیز شود. بررسی‌های ریخت شناختی یاخته‌ها نیز القای آپوپتوز در یاخته‌های مورد مطالعه را نشان می‌دادند.

بحث

لنفوم یکی از شایع‌ترین تومورها در اکثر گونه‌های موش می‌باشد. به ویژه آنهایی که در ارزیابی ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از رده‌های سلولی سرطان لنفوم در موش که چندان مورد بررسی قرار نگرفته، رده سلولی EL4 می‌باشد.

داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی از جمله ترکیبات پرکاربرد در درمان سرطان‌های مختلف هستند (۷). این داروها شامل طیف گسترده‌ای از ترکیبات با خواص فارماکولوژیک متفاوت می‌باشند. برخی از این داروها سبب مهار آنزیم COX-1 می‌شوند که عوارض شدید گوارشی ایجاد می‌کنند و به همین دلیل امروزه کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی دیگر مهار کننده‌های اختصاصی آنزیم COX-2 هستند که برخلاف دسته اول عوارض گوارشی برجای نمی‌گذارند. یکی از انواع پرکاربرد این داروها سلوکسیب می‌باشد که جهت درمان درد و التهاب ناشی از استئوآرتریت و جراحی‌های ارتوپدیک بکار می‌رود. برخلاف آنزیم سیکلوآکسیژناز-۱ که به طور مداوم در اکثر بافت‌های بدن بیان شده و تعداد زیادی از فرایندهای فیزیولوژیک را کنترل می‌کند، آنزیم سیکلوآکسیژناز-۲ بوسیله فاکتورهای پیش التهابی یا میتوزینیک القا شده و در انواع مختلفی از سرطان‌ها مثل تومورهای پستان و مثانه به شدت بیان می‌شود (۶). افزایش بیان این آنزیم سبب مهار آپوپتوز، افزایش تکثیر سلولی، افزایش آنژیوژنز و متاستاز می‌گردد (۷). مکانیسم

از آزمون فلوسایتومتری نیز غلظت IC_{50} سلوکوکسیب ۲۰ میکرومولار بدست آمد که در این غلظت درصد یاخته های آپوپتوتیک ۵۹/۳۰٪ تعیین گردید (نمودار ۳).

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، با نتایج حاصل از مطالعه Gallouet و همکاران در سال ۲۰۱۴ که البته بر روی لنفوم یاخته‌های B انجام شده بود، همخوانی دارد. نامبردگان نیز تاثیر معنادار غلظت ۳۰ میلی مول در لیتر سلوکوکسیب را بر القای مرگ سلولی در رده های سلولی لنفومای یاخته‌های B در موش نشان دادند و تاکید کردند که این تاثیر مستقل از محور COX-2/PGE2 صورت می‌پذیرد.

در مطالعه حاضر نتایج بدست آمده به حساسیت یاخته‌های T لنفوم موش نسبت به سلوکوکسیب اشاره دارد. نحوه مکانیسم اثر این دارو با توجه به مطالعات قبلی احتمالاً از طریق مسیره‌های مستقل از COX-2 از جمله کاهش سرعت چرخه سلولی و کاهش بیان پروتئین‌های بقا نظیر Mcl-1 صورت می‌گیرد. گرچه برای اطمینان از مکانیسم اثر آن در لنفوم یاخته‌های T باید مطالعات بیشتری انجام شود.

فهرست منابع

1. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB., et al. (2003): Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhance the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 21(14): 2645-2650.
2. Anderson WF, Umar A, Viner JL, Hawk ET. (2002): The role of cyclooxygenase inhibitors in cancer prevention. *Curr. Pharm. Des.* 8(12):1035-1062.
3. Arunasree KM, Roy KR, Anilkumar K, Aparna A, Reddy GV, Reddanna P. (2008): Imatinib-resistant K562 cells are more sensitive to cecloxiib, a selective COX-2 inhibitor: role of COX-2 and MDR-1. *Leuk. Res.* 32(6): 855-864.

سلوکوکسیب دیگر ایجاد نشد. در واقع این روند با هدف قرار دادن ایزوآنزیم Cox-2 که در سنتز PGE2 نقش دارد، توسط سلوکوکسیب انجام شد.

علاوه بر این نشان داده شد که سلوکوکسیب، آپوپتوز را در یاخته‌های B لنفومای فولیکولار در کشت توامان با یاخته‌های استرومال در NHL B-Cell lines به طور غیر وابسته به محور PGE2-Cox-2 افزایش می‌دهد و در نهایت سلوکوکسیب فعالیت آپوپتوزی TRAIL را افزایش می‌دهد.

در این مطالعه شواهدی دال بر اثرات سلوکوکسیب بر حساسیت و تکثیر NHL B-Cell lines نسبت به آپوپتوز از طریق اثرات غیر وابسته به Cox-2 از طریق کند کردن چرخه سلولی و کاهش بیان پروتئین‌های بقا مثل Mcl-1 ارائه شد. در نتیجه این داده‌ها، استراتژی قوی جدیدی برای درمان NHL با ترکیب کردن داروها و هدف قرار دادن هر دو یاخته‌های B توموری و یاخته‌های استرومال و سیگنال‌های بقای ارائه شده توسط ریزموتورها پیشنهاد شد (۱۰).

در مطالعه حاضر پس از تماس ۴۸ ساعته یاخته‌های EL4 با غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومول در لیتر سلوکوکسیب و انجام آزمون MTT مشخص گردید، غلظت‌های بالاتر از ۱۵ میکرومول در لیتر سلوکوکسیب می‌توانند به طور معنی‌داری بقای یاخته‌های سرطانی را کاهش دهند.

با توجه به کاهش وابسته به دوز درصد بقای یاخته‌ها و پس از رسم منحنی دوز - پاسخ (نمودار ۲)، غلظت مورد نیاز سلوکوکسیب برای مهار ۵۰ درصدی بقای این یاخته‌ها، ۲۰ میکرومول در لیتر تعیین گردید. سپس مواجهه ۴۸ ساعته یاخته‌های EL4 با غلظت‌های ۱۵، ۲۰ و ۴۰ میکرومول در لیتر سلوکوکسیب انجام شد و به منظور تعیین درصد وقوع آپوپتوز یاخته‌ها، آزمون فلوسایتومتری توسط کیت Annexin V/PI انجام شد. طبق نتایج حاصل

4. Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, Goda AE. (2004): The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? *Pharmacol. Res.* 50(5):487-498.
5. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. (2005): Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 7(4): R422-435.
6. Bocca C, Bozzo F, Bassignana A, Miglietta A. (2011): Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* 350(1-2): 59-70.
7. De Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, de Jong S. (2007): Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 61(1): 52-69.
8. Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS, D'Ambrosio SM. (2005): Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int. J. Cancer.* 113(5): 803-810.
9. Dhawan D, Jeffreys AB, Zheng R, Stewart JC, Knapp DW. (2008): Cyclooxygenase-2 dependent and independent antitumor effects induced by celecoxib in urinary bladder cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7(4): 897-904.
10. Galloet AS, Travert M, Bepoldin LB, Trate K, Lamy T, Guilloton F, Pangault C, Laugendre SC, guillaudeux T. (2014): COX-2 independent effects of celecoxib sensitize Lymphoma B cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 20 (10): 2663-2673.
11. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. (2006): Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.* 98(11):736-747.
12. Kundu N, Smyth MJ, Samsel L, Fulton AM. (2002): Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res. Treat.* 76(1): 57-64.
13. Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, Takahashi S, Murayama SY, Suzuki H, Tsuchimoto K. (2014): New pharmaceutical treatment of gastric MALT lymphoma : anti-angiogenesis treatment using VEGF receptor antibodies and cecloxi. *Curr. Pharm. Des.* 20(7): 1097-1103.
14. Sovak M.A, Arsura M, Zanieski G, Kavanagh KT, Sonenshein GE. (1999): The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression. *Cell growth & differentiation: Cell Growth Differ.* 10(8): 537-544.
15. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. (2001): Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* 15(12): 2057-2072.
16. Ward JM. (2006): Lymphomas and leukemias in mice. *Comparative Medicine Branch, National institute of Allergy and Infectious diseases, NIH. USA.* 57(5-6): 377-381.
17. Waskewich, C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM, Burton J. (2002): Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase(COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res.* 62(7): 2029-2033.
18. Zattelli MC, Luchin A, Tagliati F, Leoni S, Piccin D, Bondanelli M., et al. (2007): Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent the development of chemoresistance phenotype in a breast cancer cell line by inhibiting glycoprotein p-170 expression. *Endocr. Relat. Cancer.* 14(4): 1029-1038.
19. Zhang H, Ye Y, Bai Z, Wang S. (2008): The COX-2 selective inhibitor-independent COX-2 effect on colon carcinoma cells is associated with the Delta1/Notch1 pathway. *Dig. Dis. Sci.* 53(8):2195-2203.

