

بررسی اثر ضد توموری ترکیب شیمیایی

'N-(5-نیتروتیوفن-2-YL-متیلن)-2-فنیل تیو) بنزو هیدرازید در مدل موشی سرطان پستان



سوده دهقانی^۱، مونا سلیمی^{۲*} و نرگس نیکونهاد^۱

^۱ ایران، یزد، دانشگاه علم و هنر یزد، دانشکده علوم و مهندسی، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۸

چکیده

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده و علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان است. مقاومت دارویی و سمیت سلولی داروهای ضدسرطانی از دلایلی هستند که سبب جستجو برای یافتن عوامل ضدسرطانی جدیدتر شده است و این رو محققان از آزمایشگاه‌های مختلف، داوطلب یافتن راه حل مناسب تری جهت درمان سرطان می‌باشند. مشتقات هیدرازیدی فعالیت‌های دارویی مختلفی شامل: ضدباکتریایی، ضدقارچ، ضد درد، ضد التهاب، ضدافسردگی و فعالیت‌های ضدسرطانی را از خود نشان دادند. با در نظر گرفتن این نکته، مشتق جدیدی از این سری ترکیبات، به نام ترکیب (1)-(5)-[N'-nitrothiophen-2-YL)methylene)-2(phenylthio) benzohydrazide] سنتز و فعالیت ضد سرطانی آن در محیط *In vitro* ثابت شده است. جهت تأیید بیشتر داده‌های قبلی، فعالیت ضد توموری این ترکیب در موش‌های ماده BALB/C سرطانی شده با سلول‌های 4T1 مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های 4T1 کارسینومای پستان (به میزان ۱۰^۶ سلول) به صورت fatpad در ناحیه غدد پستانی موش‌های ماده BALB/C به منظور ایجاد تومور پستان تزریق شدند. تزریق IP (تزریق داخل صفاقی) سه دز از ترکیب (۱) به میزان ۱،۱۰،۵۰ mg/kg نتوانست به طور معنی داری رشد تومور را بعد از سه هفته به تأخیر اندازد. کاهش رشد تومور در ۳ تا ۴ هفته رخ داد که با نکرور گسترده و نفوذ لکوسیت‌ها همراه بود که با روش هیستوپاتولوژی تأیید گردید. قابل ذکر است که ترکیب (۱) همچنین به طور مؤثر متاستاز ریه را کاهش داده که توسط مطالعات هیستوپاتولوژی ثابت شد. نتایج این تحقیقات در مجموع قوی بودن ترکیب (۱) را به عنوان یک کاندید امیدوارکننده شیمی درمانی برای درمان سرطان پستان انسان آشکار کرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان، موش، مشتقات هیدرازیدی، متاستاز

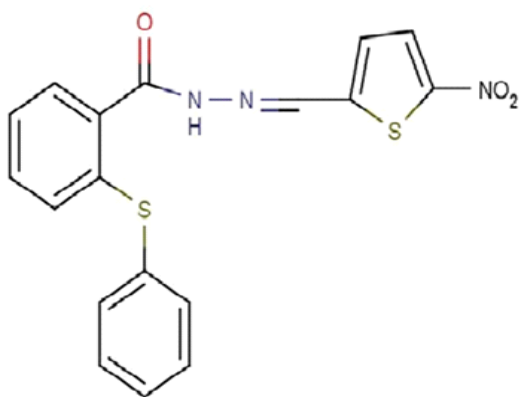
* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۶۴۱۱۲۲۶۴، پست الکترونیکی: salimimona@pasteur.ac.ir

مقدمه

انواع سرطان، سرطان پستان شایع‌ترین نوع آن در میان زنان می‌باشد (۱۷). طبق آمار منتشر شده، از هر هشت زن ایرانی، یک نفرشانس ابتلاء به سرطان پستان را داراست و حدود یک چهارم کل سرطان‌های زنان در کشور مربوط به سرطان پستان است (۱). بر اساس گزارش ارائه شده در سال ۲۰۱۵، در ایران ۶۱۶۰ مورد سرطان پستان تشخیص داده شده است که ۱۰۶۳ مورد منجر به مرگ شده است (۲).

سالانه بیش از ۷ میلیون نفر در جهان در اثر ابتلاء به سرطان جان خود را از دست می‌دهند و پیش‌بینی می‌شود که تعداد موارد جدید ابتلاء تا سال ۲۰۲۰ سالانه از ۱۰ میلیون به ۱۵ میلیون نفر برسد (۱۸و۸). طبق گزارشات، میزان مرگ و میر ناشی از سرطان در سال ۲۰۱۲، هشت میلیون و دوویست هزار نفر بوده که این میزان از سال ۲۰۰۸، هشت و چهاردهم درصد افزایش یافته است (۱۰). در میان

باشند ($IC_{50} = 0.18 \mu M$)، لذا این مطالعه برای اثبات بیشتر این اثر طراحی شده است.



شکل ۱- ساختار ترکیب شیمیایی: N-(۵-نیتروتیوفن-۲-یلیدن)-N'-(۲-فنیل تیو)بنزوهیدرازید (۱)

مواد و روشها

حیوانات و مواد شیمیایی مورد استفاده: در این مطالعه ۶۰ سرموش سوری ماده، نژاد BALB/C، سن ۵ تا ۷ هفته ای از انستیتو پاستور کرج خریداری گردید و در حیوانخانه آزمایشگاه فارماکولوژی انستیتو پاستور تهران به مدت یک هفته برای عادت کردن به محیط و شرایط حیوانخانه با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای $22 \pm$ درجه سانتی گراد همراه با آب و غذا نگهداری شدند. در این تحقیق، DMSO مورد استفاده از شرکت Sharlo اسپانیا، محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین از شرکت Gibco آمریکا، همتاکسیلین از شرکت Sigma - Aldrich آمریکا، اتوزین از شرکت Merck آلمان، زایلن از شرکت دکتر مجلی و چسب مخصوص سیتولوژی Entellan از آلمان خریداری شدند.

کشت سلولی: سلولهای رده موشی 4T1 سرطان پستان از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد. سلولها در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند. سلولها پس از تریپسینه شدن و شستشو با بافر PBS

شیمی درمانی، پرتو درمانی و ژن درمانی از راههای مطرح درمان سرطان به شمار می رود که از این میان شیمی درمانی، درمان سرطان با داروی ضد توموری، رایج ترین راه درمان در سالهای اخیر می باشد. داروهای شیمی درمانی با تأثیر بر تقسیم سلولی، رشد و گسترش تومور سرطانی را مختل می نماید، طوری که سلولهای بدخیم نمی توانند تکثیر شده و یا اینکه آسیب می بینند و توانایی ترمیم را از دست می دهند. واضح است که هر سلولی که تقسیم سلولی در آن انجام شود، می تواند تحت تأثیر شیمی درمانی قرار گیرد. از این رو داروها علاوه بر سلولهای بیمار می توانند موجب اختلال و آسیب در سلولهای سالم بدن نیز شوند و باعث ایجاد عوارض جدی گردند. بنابراین عدم انتخابی بودن و همچنین مقاومت دارویی که در سلولهای سرطانی ایجاد می شود، سبب محدودیت استفاده از داروهای متداول شیمی درمانی شده است (۷و۵). در نتیجه همواره نیاز به مطالعه، شناخت و کشف داروهای جدید با مکانیسمهای متعدد و پتانسیل مناسب جهت کاهش عوارض داروهای شیمی درمانی مطرح در درمان سرطان، حائز اهمیت بوده است. یکی از این دسته داروها، مشتقات هیدرازیدی می باشد که این ترکیبات دارای خواصی مانند شلات کنندگی آهن، ضد تشنج، ضد پلاکت، ضد ویروس، ضد مالاریا، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد التهابی را دارا می باشند (۴). همچنین این ترکیبات اثرات ضد سرطانی و ضد ایدز نیز از خود نشان داده اند (۱۹). در این مطالعه به بررسی خواص ضد توموری ترکیب جدیدی از دسته ترکیبات هیدرازیدی به نام N-(۵-نیتروتیوفن-۲-یلیدن)-N'-(۲-فنیل تیو)بنزوهیدرازید (ترکیب ۱) (شکل ۱) در محیط *in vivo* پرداخته شده است، با توجه به اینکه در مطالعه پیشین در محیط *in vitro* اثر ضد سرطانی این ترکیب بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بررسی شده و مشاهده شده که این ترکیب اثر ضد سرطانی بر روی سلولهای سرطان سینه را دارا می

یکدیگر از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post-Tukey test و $p < 0.05$ با استفاده از نرم افزار Graphpad prism6 استفاده گردید.

نتایج

پس از اینکه اندازه تومورها توسط کولیس دیجیتال قابل اندازه گیری بود، حجم تومور هر سه روز یکبار اندازه گیری و تمامی داده های حاصل، در طی سه هفته در جدول ۱ به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است. همان طور که در جدول مشاهده می شود، اندازه تومور در گروه کنترل- حامل نسبت به سایر گروهها با گذشت زمان به مقدار بیشتری افزایش می یابد، در حالی که در گروه درمانی با ترکیب شیمیایی (۱) این روند کندتر می باشد. به عنوان مثال در دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز اندازه تومور از 140.8 ± 29.4 به 380.4 ± 98.4 mm^3 در طی سه هفته رسیده است، در صورتیکه در گروه کنترل حامل اندازه تومور از 268.4 ± 33.64 به 1953.0 ± 232.4 mm^3 در طی سه هفته افزایش پیدا کرده است. این مسئله خود شاهدی بر مؤثر بودن ترکیب (۱) به ویژه در دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز می باشد. این کاهش اندازه در مورد سایر دزها نیز صدق می کند، به طوری که بعد از تیمار با دز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیز اندازه تومور پس از سه هفته کاهش یافته و اما ترکیب (۱) در دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم توانسته به مقدار بیشتری اندازه تومور را نسبت به گروه کنترل حامل کاهش دهد که این تفاوت از لحاظ آمار معنی دار بوده است. معنی داری همه داده ها نسبت به گروه کنترل- حامل سنجیده شده و با نماد ستاره نمایش داده شده است.

جهت نمایش بهتر نتایج حاصل از تیمار دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم ترکیب (۱)، نمودار شکل ۲ که نمایانگر اندازه تومور در گروه کنترل حامل و گروه درمان شده با دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در طی ۳۲ روز می باشد، رسم شده است.

شمارش شدند و تعداد 10^6 سلول در $50 \mu\text{l}$ میکرولیتر PBS در سرنگ انسولین به صورت سوسپانسیون تهیه گردید.

بررسی اندازه تومور موشها در زمانهای مختلف: در این آزمون، موشها به ۶ گروه (n=10) تقسیم شدند. به این صورت که یک گروه کنترل مثبت (مبتلا به سرطان و درمان نشده)، یک گروه کنترل منفی (سالم)، یک گروه DMSO و سه گروه موشی تحت درمان با دزهای مختلف (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) ترکیب شیمیایی (۱) قرار گرفتند. میزان 10^6 سلول 4T1 در سرنگ انسولین شمارش و به صورت fatpad در ناحیه غدد پستانی (اولین پستان در سمت راست هر سرموش در ناحیه قفسه سینه) تزریق گردید. روز تزریق سلول سرطانی، روز صفر در نظر گرفته شد و بعد از مشاهده اولین جوانه تومور (حدوداً یک هفته پس از تزریق سلول 4T1)، ترکیب شیمیایی (۱) در سه دز به گروههای درمانی به صورت داخل صفاقی (IP) با سرنگ انسولین تزریق گردید. در طی اجرای پرتکل درمانی، بعد از رؤیت تومور و قابل اندازه گیری شدن با کولیس، تومورها هر سه روز یکبار با کولیس دیجیتال اندازه گیری و وزن موشها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

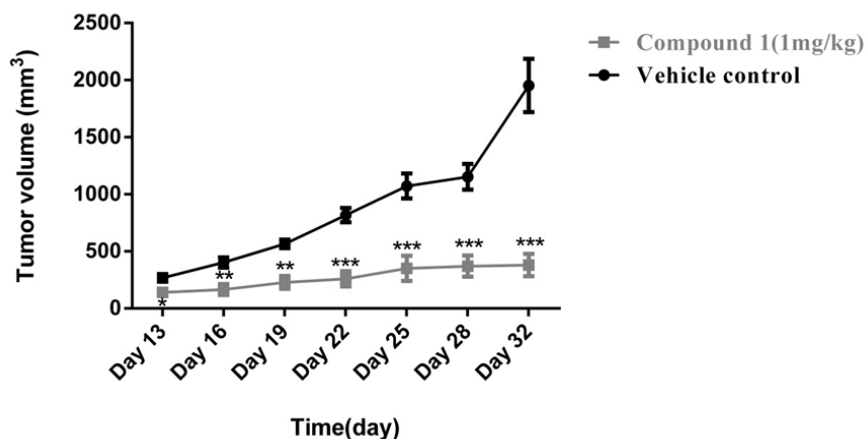
آزمون هیستوپاتولوژی: بعد از ۳ هفته درمان بر طبق پرتکل درمانی مورد نظر، موشها در روز ۳۲ام کشته و تومورها و ریه ها از بدن هر کدام جدا و با فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند و برای مطالعات هیستوپاتولوژی مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژی، از بافتها لام تهیه گردید و به روش H&E رنگ آمیزی و سلولهای توموری با بزرگنمایی $40\times$ ، $100\times$ و $400\times$ بررسی شدند.

آنالیز آماری: تومورها در گروههای درمانی مختلف با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت اندازه گیری $0.1/1$ میلی متر اندازه گیری شدند و حجم هر یک از تومورها با فرمول حجم تومور ($\text{قطر کوچک} \times \text{قطر بزرگ} / 2$) محاسبه گردید. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ و آزمونها حداقل ۳ بار تکرار شدند. جهت مقایسه میانگین گروههای مختلف با

جدول ۱- میانگین حجم تومور (mm³) در موشها با سرطان پستان (مدل 4T1 سرطان پستان) که با ترکیب شیمیایی (۱) در دزهای مختلف درمان شده اند (دوز ۱۰، ۱۵۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) ^۱.

گروهها زمان (روز)	کنترل حامل	ترکیب (۱) ۱ میلی گرم بر کیلوگرم	ترکیب (۱) ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم	ترکیب (۱) ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم
۱۳	۲۶۸,۴±۳۳,۶۴	۱۴۰,۸±۲۹,۴۰*	۱۵۸,۷±۱۱,۵۲*	۲۴۶,۹±۲۸,۱۰
۱۶	۴۰۲,۲±۴۳,۹۱	۱۶۵,۸±۴۸,۷۳**	۲۴۲,۶±۲۴,۵۹*	۳۶۳,۸±۴۷,۳۸
۱۹	۵۶۵,۴±۳۸,۲۵	۲۲۸,۴±۵۶,۳۸**	۲۶۸,۹±۴۸,۷۸*	۶۳۶,۳±۸۵,۱۶
۲۲	۸۱۷,۸±۶۲,۵۵	۳۲۳,۵±۸۴,۸۰***	۳۴۷,۶±۳۵,۸۵***	۸۳۵,۶±۶۴,۲۴
۲۵	۱۰۷۳,۰±۱۰۹,۴	۳۵۰,۳±۱۱۰,۳***	۳۷۸,۷±۵۶,۳۲***	۹۸۲,۳±۱۱۱,۶
۲۸	۱۱۵۳,۰±۱۱۲,۸	۳۷۰,۵±۹۲,۵۱***	۴۱۷,۳±۹۱,۷۶***	۱۰۲۶,۰±۱۶۱,۵
۳۲	۱۹۵۳,۰±۲۳۲,۴	۳۸۰,۴±۹۸,۴۱***	۷۲۶,۱±۳۴,۳۰***	۱۰۴۲,۰±۱۲۷,۴***

^۱مقادیر به صورت mean±SEM و $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل حامل در نظر گرفته شده است.



شکل ۲- مقایسه گروه کنترل با گروه درمانی تیمار شده با دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم از ترکیب (۱) در طی روزهای مختلف. هر داده نشان دهنده mean±SEM است. منظور از گروه Vehicle control، گروه کنترل و DMSO می باشد. آزمون One-way ANOVA (post-Tukey test) $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.05$ (در مقایسه با کنترل- حامل، معنی دار، برای مقایسه گروهها انجام شد. موشهای هر گروه n=10 می باشد، تلقی می شود.

گروه کنترل و گروه درمانی در ریه محاسبه گردید (جدول ۲). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، اندازه بزرگترین توده توموری در گروه کنترل حامل نسبت به دز مؤثر ترکیب شیمیایی (۱) بسیار بیشتر است. همچنین تعداد سلولهای توموری و میتوز در دز مؤثر ترکیب شیمیایی (۱) نسبت به گروه کنترل حامل کاهش چشم گیری داشته است.

همان طور که در تصویر مشاهده می شود، تومور در گروه درمانی (با دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) نسبت به گروه کنترل حامل با سرعت کمتری رشد کرده و یا حتی در بعضی روزها مانند روز ۲۵ تا ۳۲ ام تومور رشد چندانی نداشته است. جهت مشاهده اثر ترکیب شیمیایی (۱) بر روند رشد تومور و متاستاز آن به ریه، تعدادی از پارامترها در تومورهای

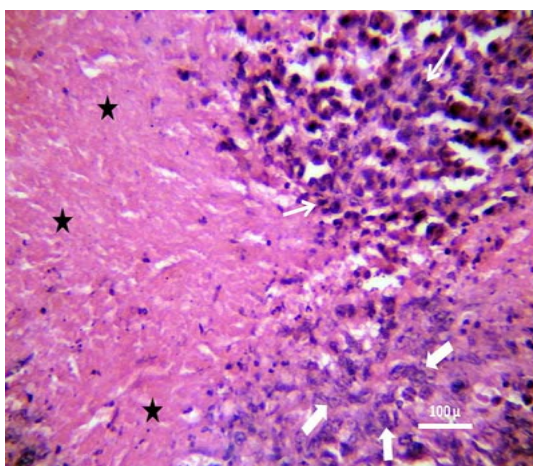
جدول ۲- میانگین حجم تومور ریه (mm³) در موشها با سرطان پستان (مدل 4T1 سرطان پستان)

گروه	اندازه بزرگترین توده توموری (μ ²)	تعداد سلولهای توموری در توده (n/mm ²)	تعداد میتوز (n/mm ²)
کنترل حامل	۱۲۳۸۸,۰±۱۸۶,۷	۷۲۰۰,۰±۱۳۰,۴	۱۶۱۰,۰±۷۱,۰۶
ترکیب شیمیایی (۱)	۵۷۵,۰±۴۸,۴۰	۴۰۲۰,۰±۴۹,۶۵	۴۰۵,۰±۱۸,۵۱

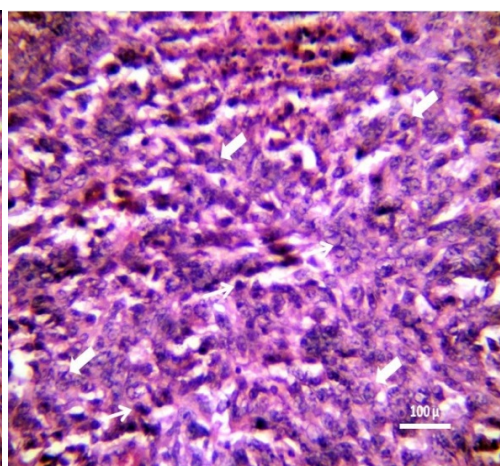
^۱مقادیر به صورت mean±SEM و $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل حامل در نظر گرفته شده است.

نیافته و پلی مرفیسم با هسته های هایپرکروماتیک و مقادیر کم سیتوپلاسم بود که بیانگر سرطانی بودن توده ایجاد شده می باشد. همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می گردد، سلولهای 4T1 سلولهای بزرگ و متورم با هستکی مشخص و کروماتینی معلوم است که در نمونه های حاصل به خوبی قابل تشخیص و متمایز از سایر سلولها هستند.

پس از اندازه گیری ابعاد تومور، موشها در روز ۳۲م قربانی شدند و تومور آنها از محل پستان جدا و برای مطالعات هیستوپاتولوژی فیکس و رنگ آمیزی گردیدند. بررسی توده پستانی نشانگر لانه گزینی سلولهای سرطانی 4T1 و التهاب آن بود. به عبارت دیگر نتیجه رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین (H&E) از تومور اولیه جدا شده از ناحیه پستانی حاکی از حضور سلولهای نئوپلاستیک تمایز



(ب)



(الف)

راهنمای اشکال:

۱. سلول های التهابی (لنفوسیت، ماکروفاژ، پلاسماسل و نوتروفیل)
۲. سلول های توموری
۳. مراحل تقسیم میتوز در سلول های توموری
۴. عروق خونی

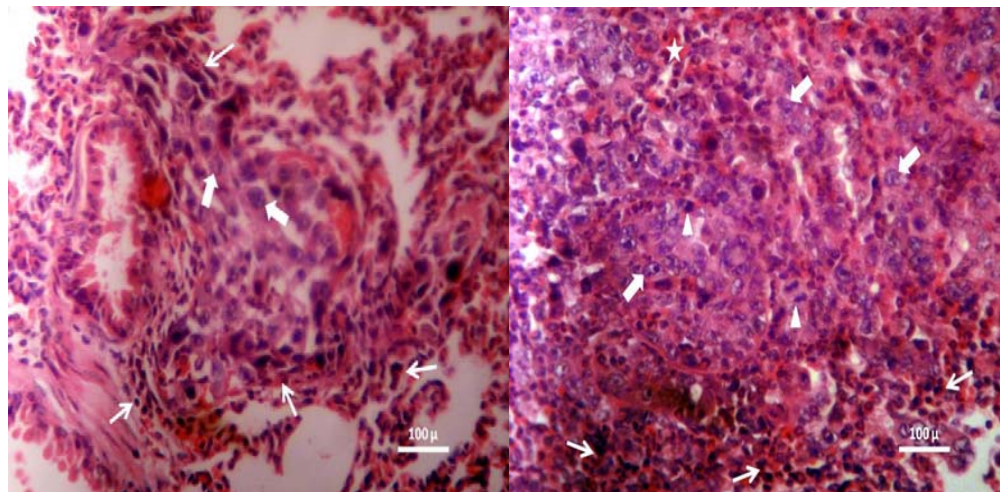
شکل ۳- الف) بررسی هیستوپاتولوژی تومور پستان کنترل مثبت (مبتلا به سرطان و درمان نشده، با بزرگنمایی-400X) حاصل از تزریق سلول 4T1 پس از مدت زمان سه هفته. ب) تصویر تومور پستان گروه درمان شده با دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز از ترکیب (۱) (با بزرگنمایی 400X). همان طور که در تصویر مشاهده می شود، سلولهای التهابی (لنفوسیت، ماکروفاژ، پلاسماسل و نوتروفیل) در اطراف بافت توموری وجود دارند.

بدخیم سرطان پستان، توده ای با واکنش التهابی ایجاد شده است و کپسولی از جنس بافت همبندی اطراف توده شکل

همچنین در این سلولها مراحل مختلف متافاز و تلوفاز قابل ملاحظه می باشد. در نتیجه می توان عنوان نمود که توده

نوتروفیل) را می‌توان به خوبی مشاهده نمود. همچنین در این تصویر سلولهای توموری که به شکل پلی مورفیک بوده و دارای هسته ای بزرگ با غشای پر رنگ و حاشیه دار اما مختلف الشكل هستند، قابل مشاهده می‌باشد. نکته قابل ذکر آن است که تصویری که از ریه گروه درمانی، دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز (شکل ۴.ب) تهیه شده حاوی بافت نکروزه به وفور می‌باشد، همچنین تعداد تقسیم میتوز و در نهایت سلولهای توموری نسبت به گروه کنترل مثبت بسیار کمتر است که این خود شاهدی بر اثر گذاری ترکیب (۱) بر اندازه رشد تومور می‌باشد.

گرفته است (شکل ۳.الف)، در حالی که در تصویری که از گروه درمانی با دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز از تومور پستان تهیه شده، می‌توان گفت در مقایسه با گروه کنترل از تعداد میتوزها کاسته شده اما نواحی نکروزی به صورت موضعی افزایش یافته است که این مطلب خود نشانگر پاسخ به درمان است (شکل ۳.ب). به جهت اطمینان از متاستاز سلولهای سرطان پستان به ریه، از تومورهای ریه نیز لام تهیه و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴.الف). همان گونه که در شکل ۴(الف) مشخص است، سلولهای چند هسته ای و التهابی (لنفوسیت، ماکروفاژ، پلاسماسل و



ب)

الف)

شکل ۴- الف) بررسی هیستوپاتولوژی ریه کنترل مثبت (متلا به سرطان و درمان نشده، با بزرگنمایی 400X) حاصل از تزریق سلول 4T1 پس از مدت زمان سه هفته. همان طور که در تصویر مشخص شده، سلولهای التهابی به اطراف سلولهای توموری فراخوانده شده اند. ب) تصویر ریه گروه درمان شده با دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روز با بزرگنمایی 400X. همان طور که در تصویر مشاهده می‌شود، سلولهای التهابی (لنفوسیت، ماکروفاژ، پلاسماسل و نوتروفیل) در اطراف بافت توموری وجود دارند.

نیتروتیوفن -۲- (YL-متیلن) -۲- (فنیل تیو) بنزوهیدرازید (ترکیب ۱) که به تازگی طراحی شده و اثرات آن بر روی رده سلولی سرطان سینه به اثبات رسیده (۱۴ و ۱۶)، از این رو تصمیم بر این شد تا مطالعه *in vivo* این ترکیب نیز انجام گیرد. برای بررسی اثرات *in vivo* لازم بود، مدل موشی سرطان پستان ایجاد شود. در واقع مطالعات *in vivo* توانایی بررسی تشکیل تومور، پیشرفت آن و پاسخ درمان مورد نظر را فراهم می‌نماید و با ایجاد مدل *in vivo*

بحث و نتیجه گیری

تاکنون اثرات متفاوتی از ترکیبات هیدرازیدی گزارش شده است، همچون اثرات ضد تشنج، ضد ویروس، ضد مالاریا و بسیاری از اثرات دیگر، اما اخیراً توجه دانشمندان به سمت اثرات ضد سرطانی ترکیبات هیدرازیدی معطوف شده است. در عین حال با توجه به مطالعه پیشین مبنی بر اثرات ضد سرطانی ترکیب هیدرازیدی جدیدی به نام 'N' - (۵)-

سرطان پستان، می‌توان بیماری سرطان پستان در انسان را به سهولت شبیه‌سازی کرد که در مطالعات بالینی و فارماکولوژیکی، ایجاد چنین مدل‌هایی برای تقلید بیماری انسانی بسیار مفید به نظر می‌رسد. یکی از رایج‌ترین مدل‌های *in vivo* سرطان، استفاده از تزریق سلول‌های سرطانی رده موشی است که به کمک آن می‌توان انواع تومورهای حاصل از سرطان را ایجاد کرد. در مطالعات *in vivo* سرطان پستان، استفاده از سلول‌های 4T1 همواره به عنوان مدل‌های مناسبی پیشنهاد می‌شود. بر طبق مطالعات انجام شده، سلول‌های 4T1 در موش *BALB/C* بیشترین حالت مهاجمی را دارا می‌باشند و شرایطی مشابه با سرطان پستان در انسان را ایجاد می‌نماید. موش نژاد *BALB/C* نوعی موش‌های اصلاح ژنتیکی شده می‌باشد که بسیاری از مدل‌های تومور موشی ایجاد شده در طول سال‌های گذشته، در این نوع موش انجام شده است (۱۵).

مشکل عمده دیگر در مطالعات حیوانی ایجاد مدل متاستاتیک می‌باشد. یکی از مهم‌ترین موانع مطالعه متاستاز، دردست نبودن مدل مناسبی است که بتواند به صورت قابل اطمینان پروسه متاستاز در شرایط *in vivo* را مشابه‌سازی نماید. مدل‌های گزینوگرافت که در آنها سلول‌های توموری انسان به موش سرکوب شده ایمنی تزریق می‌شوند، به طور گسترده برای مطالعه رشد و متاستاز تومور در موش به کار می‌رود (۹). اگرچه ایجاد تومور اولیه با این شرایط امکان‌پذیر است، شبیه‌سازی متاستاز تومور در این مدل بسیار مشکل می‌باشد. از میان این مدل‌ها، مدل سینژنیک (*Syngeneic*) مناسب‌ترین مدل برای ایجاد مدل‌های متاستاتیک می‌باشد. در این مدل چندین مزایا وجود دارد که عبارتند از: (۱) در دسترس بودن آن، (۲) هزینه پایین حیوانات میزبان، (۳) تکرار پذیری داده‌ها. با توجه به اینکه در این مدل هم سلول‌های سرطانی وهم میزبان این سلول‌ها، موش می‌باشد (۲۱) و از طرفی سلول‌های توموری انسان به طور ضعیفی در موش متاستاز می‌یابند و هنگامی که متاستاز هم ایجاد شود اغلب

خصوصیات غیر منتظره دارد، لذا این مدل را برای انجام این آزمون مناسب دیده‌اند. در واقع مدل‌هایی که با استفاده از سلول‌های توموری موشی باشند، به طور مؤثرتری متاستاز می‌یابند و خصوصیات مشابه آنچه در بیماران سرطانی دیده می‌شود، تظاهر پیدا می‌کند (۱۱). این نوع مدل امکان آنالیز تومور در حیوان با سیستم ایمنی طبیعی را فراهم می‌نماید. از آنجایی که سیستم ایمنی نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت سرطان ایفاء می‌نماید، مدل‌هایی که بتوان در موش دارای ایمنی کامل (نسبت به *Nude mouse*) به کار برد، برای آنالیز پیشرفت و متاستاز سرطان و ارزیابی داروها ضروری خواهد بود (۲۰). نتایج حاصل از مطالعات در این تحقیق ایجاد این مدل توسط تزریق سلول‌های سرطانی به ناحیه زیر غدد شیری را تأیید نمود، به طوری که پس از گذشت تقریباً هفت روز حضور این تومور قابل لمس بود. جهت تأیید بیشتر تومور ایجاد شده، مطالعات هیستوپاتولوژی بر روی بافت تومور و ریه انجام گرفت. با توجه به حضور سلول‌هایی با هسته‌های بزرگ و دارای شکل پلی مورفسم و همچنین مشاهده مراحل مختلف تقسیم سلولی، مشخص شد که این نوع مدل توموری به خوبی ایجاد شده است. نکته قابل توجه آن بود که با گذشت زمان به تدریج اندازه تومور بزرگتر شده به طوری که در هفته چهارم به اندازه‌ای رسید که نه تنها قابل اندازه‌گیری بود، بلکه کاملاً قابل مشاهده نیز بود. نمونه بافتی تومور جدا گردید و از نظر حضور سلول‌های غیر نرمال سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی مشخص شد که تومور حاصل از نوع سرطانی بدخیم است که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Tobias Hahn و همکاران صورت گرفت، در یک راستا بودند و هر دو نشان دادند که تومور حاصل از این مدل از نوع سرطان پستان است (۱۲). مرحله بعد مشخص بودن حالت متاستاتیک سرطان پستان ایجاد شده بود. از آنجا که مطالعات نشان دادند، ریه از جمله نواحی است که متاستاز در آن سریع دیده می‌شود (۳ و ۶)، لذا بافت ریه از

متاستاز تومور به ریه نیز جلوگیری نماید که این امر خود نکته قابل تأملی در درمان سرطان پستان می باشد (۱۳). نکته قابل توجه آن است که اثر دز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم از ترکیب (۱) در کاهش اندازه تومور، کمتر از سایر دزها بوده است که این کاهش را می توان به سمیت ترکیب در این دز نسبت داد. باتوجه به بررسیهای صورت گرفته می توان نتیجه گرفت که ترکیب شیمیایی (۱) جهت کاهش رشد تومور در سرطان پستان انسانی نیز می تواند مؤثر می باشد چرا که مدل موشی، مدل شبیه به سرطان پستان در انسان است، هر چند که مطالعات تکمیلی بیشتری با انجام آزمونهای مولکولی و ایمنو هیستوشیمی مورد نیاز می باشد.

موشهای توموری نیز جدا و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات هیستوپاتولوژی تأیید نمود که این بافت نیز توموری شده است. بنابراین اکنون مدل سرطان پستان متاستاتیک ایجاد گردیده است. لذا تصمیم این شد که از این مدل برای بررسی اثرات ضد توموری ترکیب (۱) استفاده گردد. نتایج حاصل از اندازه گیری تومور با کولیس دیجیتال و بررسیهای هیستوپاتولوژی نشان داد که ترکیب (۱) در دز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم توانسته اندازه تومور را در مدت سه هفته به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل - حامل کاهش دهد. به این صورت که از هفته دوم رشد تومور کاهش یافته و در هفته سوم توانسته بیشترین اثر را بر روی کاهش اندازه تومور داشته باشد. دز مؤثر علاوه بر کاهش اندازه تومور توانسته تا حد زیادی از

منابع

- 1- Ahmadi, M., Asadi, F., Jalali-fard, B., Sadoghi, F. (2005) Management of health information. Tehran: Nopardaz publications.
- 2- Alizadeh otaghvar, H., Hosseini, M., Tizmaghz, A., Shabestanipour, GH., Noori, H. (2015) A review on metastatic breast cancer in Iran. Asian pacific journal of tropical biomedicine, 5(6): 429-433.
- 3- Baliga, MS., Meleth, S., Katiyar, SK. (2005) Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. Clinical Cancer Research, 11(5): 1918-27.
- 4- Bharti, SK., Nath, G., Tilak, R., Singh, SK. (2010) Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2, 4-disubstituted thiazole ring. European Journal Of Medicinal Chemistry, 45: 651-660.
- 5- Chidambaram, M., Manavalan, R., Kathiresan, K. (2011) Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 14(1): 67-77.
- 6- DuPre, SA., Redelman, D., Hunter, KW Jr. (2007) The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumors and metastatic tumor foci. Int J Exp Pathol, 88(5): 351-60.
- 7- Gottesman, MM. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. Annual review of medicine, 53(1): 615-27.
- 8- Hasanpoor Dehkordi, A., Azari, S. (2006) Quality of life and related factor in cancer patients. Behbood, 10(2): 110-19.
- 9- Hepper, GH., Miller, FR., Shekhar, PM. (2000) Nontransgenic models of breast cancer. Breast Cancer Res, 2(5): 331-4.
- 10- International Agency for Research on Cancer; Fact sheet by cancer. Available at: URL: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- 11- Jonkers, J., Derksen, PW. (2007) Modeling metastatic breast cancer in mice. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 12(2-3): 191-203.
- 12- Masferrer, JL., Leahy, KM., Koki, AT., Zweifel, BS., Settle, SL., Woerner, BM, et al. (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. Cancer research, 60(5): 1306-11.
- 13- Motovali-Bashi, M., Kouhkan, F., Hojati, Z. (2016) The role of SNP in fibroblast collagenase gene with increasing of metastasis risk and viability reduction in breast cancer patients. Journal of Molecular and Cellular Research, 26(3): 365-377.

- 14- Mousavi, E., Tavakolfar, SH., Almasirad, A., Kooshafar, Z., Dehghani, S., Afsharinasab, A., et al. (2017) In vitro and in vivo assessments of two novel hydrazide compounds against breast cancer as well as mammary tumor cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79:1195–1203.
- 15- Redelman, D., Hunter, KW. (2007) The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic foci. *International journal of experimental pathology*, 88(5):351-60.
- 16- Rezaei, M., Ghafoori, H., Jamalzadeh, L., Aghamaali, M., Mohammadi, A. (2017) Anti-inflammatory effects of novel thiazolidinedione derivative on RAW 264.7 cells stimulated with LPS. *Journal of Molecular and Cellular Research*, 29(3):282-290.
- 17- Safaei, A., Zeighami, B., Tabatabaee, HR., MoghimiDehkordi, B. (2008) Quality of life and Related Factors in Breast Cancer Patients under Chemotherapy. *Iranian Journal of Epidemiology*, 3(4):61-6.
- 18- Saki, A., Hajizadeh, E., Tehranian, N. (2011) Evaluating the Risk Factors of Breast Cancer Using the Analysis of Tree Models. *Ofogh-eDanesh. Journal of Breast Cancer Gonabad University of Medical Sciences*, 17(2):60-9.
- 19- Vicini, P., Zani, F., Cozzini, P., Doytchinova I. (2002) Hydrazones of 1, 2- benzisothiazole hydrazides: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 37: 553-564.
- 20- Xanthopoulos, JM., Romano, AE., Majumdar, SK. (2005) Response of Mouse Breast Cancer Cells to Anastrozole, Tamoxifen, and the Combination. *J Biomed Biotechnol*, (1): 10-9.
- 21- Zhang, Y., Cao, W., Toneri, M., Zhang, N., Kiyuna, T., Murakami, T., et al. (2017) Toxicology and efficacy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R compared to VNP 20009 in a syngeneic mouse tumor model in immunocompetent mice. *Oncotarget*, (1):1-13.

Evaluation of anti-tumor effect of chemical compound [N'-((5-nitrothiophen-2-yl)methylene)-2(phenylthio)benzohydrazide] in breast cancer mouse model

Dehghani S.¹, Salimi M.² and Nikoonahad N.¹

¹Dept. of Biology, Science and Engineering Faculty, Yazd Science & Art University, Yazd, I.R. of Iran

²Dept. of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death among females. Resistance and cytotoxicity of anticancer drugs are the reasons that warrant the search for newer anticancer agents, and researchers from various laboratories are engaged to find a more pleasant solution for treatment of cancer. Hydrazide derivatives have shown various pharmacological activities including antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory, antidepressant and anticancer activities. With this point in mind, a novel hydrazide derivative, compound (1) [N'-((5-nitrothiophen-2-yl)methylene)-2(phenylthio) benzohydrazide] was synthesized and its anticancer activity was evaluated in breast cancer cell line. To further confirm our previous data, we investigated the anti-mammary tumor activity of this compound in BALB/c mice bearing 4T1 breast cancer cells. 4T1 mammary carcinoma cells (10^6) were injected into the mammary fat pad of female BALB/c mice to produce breast tumor. Histopathology experiment was also performed to demonstrate the metastasis. i.p. administration of three doses of compound (1) at doses of 1, 10, 50 mg/Kg, significantly retarded growth of tumor after 3 weeks. Regression of tumor growth, which occurred in weeks 3 to 4, was associated with extensive necrosis and infiltration of leukocytes and confirmed by histopathological method. Importantly, compound (1) (1mg/kg) effectively prevented the lung metastasis, which demonstrated by histopathology experiments. Our results collectively revealed the great potential of compound (1) as a promising chemotherapeutic candidate for human breast cancers.

Key words: Cancer"; "Mouse"; "Hydrazide Derivatives"; "Metastasis