

اثر استازولامید بر توان زیستی سلول‌های سرطان سینه در رده سلولی T-47D

راضیه محمدپور^۱، شاهرخ صفریان^۲، فاطمه اژنیان^۳، محمدحسین عبدالمحمیدی^۴

^۱ دانشجوی کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۲ استادیار بیوشیمی، علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳ کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۴ استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در این مقاله به بررسی اثر بازدارندگی استازولامید در رشد و تکثیر رده‌ای از سلول‌های سرطان سینه (T-47D) پرداخته شده است.

روش بررسی: در این مطالعه، ظهور علائم ریخت‌شناسی ویژه آپاپتوزیس به وسیله میکروسکوپ فلئورسانس پس از رنگ‌آمیزی با Annexin-PI بررسی گردید. تحقیقات فلوسایتومتری برای بررسی میزان و نوع مرگ سلولی، همچنین مطالعه چرخه سلولی با بهره‌گیری از رنگ DAPI صورت گرفت. میزان فعالیت کاسپاز-۳ و نیز الگوی DNA Laddering در سلول‌های تیمار شده تعیین و با نمونه شاهد مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه صورت گرفت و مقایسه گروه‌ها در سطح $p < 0.05$ انجام شد.

یافته‌ها: بررسی علائم ریخت‌شناسی توسط میکروسکوپ فلئورسانس در کنار نمودارهای حاصل از مطالعات فلوسایتومتری، پتانسیل قابل توجهی را برای داروی استازولامید در القای فرآیند آپاپتوزیس نشان داد. اما در مقابل، میزان فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در زمان تیمار سلول‌ها با دارو افزایش مشخصی داشت. این در حالی بود که در بررسی‌های انجام‌شده بر روی DNA ژنومی، الگوی نردبانی مشخصی در رابطه با سلول‌های تیمار شده با دارو مشاهده نشد و این خود دلیل دیگری را بر وقوع درصد پایین آپاپتوزیس در زمان تیمار سلول‌ها با دارو آشکار ساخت. از سوی دیگر، نمودارهای فلوسایتومتری رسم‌شده با استفاده از نشانگر DAPI بیان‌کننده آن بود که داروی سدیم استازولامید توان کمی را در کاهش سرعت چرخه تقسیم سلولی دارد و تنها توقف بخش اندکی از جمعیت سلولی را در مرحله G₂/M باعث می‌شود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، یافته‌های فوق نشان داد که اثر بازدارندگی داروی استازولامید بر روی رده T-47D را می‌توان از طریق اثرگذاری به روی سایر فرآیندهای سلولی به غیر از آپاپتوزیس و یا توقف چرخه سلولی (احتمالاً از طریق القای فرآیندهایی مانند کاتاستروف میتوزی) توضیح داد.

کلید واژه‌ها: استازولامید؛ سرطان‌های سینه؛ آپاپتوزیس؛ چرخه سلولی؛ فلوسایتومتری.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: safarian@ibb.ut.ac.ir

تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۳۲۳۷

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۶

مقدمه

افزایش حلالیت سولفونامیدها در ادرار، که موجب کاهش مسمومیت کلیوی می‌شود و نیز کشف استفاده ترکیبی از این داروها، مانند تریپل سولفا (ترکیبی از ۳ داروی سولفاتiazول، سولفابنزامید و سولفاستامید) و به‌خصوص ترکیب تری متوپریم و سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول) صورت گرفته است (۱). همچنین این دسته از داروها به‌عنوان آنتی‌متابولیت نیز مطرح

سولفونامیدها اولین داروهای مؤثر برای درمان عفونت‌های سیستمیک باکتریایی بوده‌اند. شکل اولیه این داروها در سال ۱۹۰۸ کشف شد و برای اولین بار در سال ۱۹۳۳ از لحاظ بالینی استفاده گردید (۱). از آن به بعد مشتقات بسیاری از این دارو ساخته شده و پیشرفت‌های زیادی در مورد کاربرد درمانی آن، از جمله

(آپاتوزیس) ایفا می کنند و مهار آنها توسط بعضی مشتقات سولفونامیدی که مراحل ابتدایی تحقیقات خود را طی می کند، می تواند به منزله داروی مناسبی برای جلوگیری از مرگ بی رویه سلولی مطرح باشد. استازولامید (۲) - استیل آمینو-۱،۳،۴- تیادیازول-۵- سولفونامید) یا Diamox با فرمول مولکولی $C_4H_6N_4O_3S_2$ عضو خانواده دارویی سولفونامیدها است که از طریق مهار کربونیک انیدراز در درمان گلوکوم، صرع و... استفاده می شود (شکل شماره ۱، A). استازولامید به عنوان یک داروی عمومی ادرار آور به عنوان درمان مکمل در تورم وابسته به مصرف دارو، نارسایی قلبی، صرع های وابسته به مغز و گلوکوم ساده به کار می رود (۱۰). استازولامید فاقد قابلیت ضد باکتریایی است و با سایر اعضای این خانواده تفاوت ساختاری و عملکردی مشخصی دارد. این دارو مهار کننده قوی آنزیم کربونیک انیدراز بوده و به دلیل حلالیت بسیار پایین نمک سدیم آن در آب، استفاده می شود (۱۳-۱۰). سولفونامیدهای آروماتیکی با اثرات مهار کنندگی به روی کربونیک انیدراز مانند استازولامید، متازولامید، اتاکسوزولامید و بیس سولفونامیدها، دی کلروفنایمید بیش از ۴۰ سال است که به عنوان دارو در سطح کلینیکی استفاده می شوند (۱۴). اثرات رقابتی استازولامید در مهار آنزیم کربونیک انیدراز II گاوی نیز در سال ۲۰۰۷ نشان داده شده است (۱۵). در سال ۱۹۹۵ برای اولین بار Chagwidden و Spencer گزارش کردند بعضی از سولفونامیدها روی مهار رشدی سلول های سرطانی انسانی تأثیر گذار هستند. آنها نشان دادند استازولامید ($LC_{50}=0/25mM$) و اتاکسوزولامید ($LC_{50}=0/5mM$) رشد سلول های لنفومای انسانی را مهار می کنند (۱۶). یکی از شایع ترین بدخیمی های زنان در سراسر دنیا سرطان سینه است که پس از سرطان ریه، بالاترین آمار ابتلا به سرطان را در جهان به خود اختصاص داده است. بیشتر تومورهای تشکیل شده در بافت سینه، خوش خیم و فاقد قابلیت تهاجم و رشد غیرقابل کنترل می باشند. اما تومورهای بدخیم تشکیل شده در لوبول ها و مجاری عبور شیر اغلب مهاجم بوده و توانایی انتشار به بافت های مجاور را دارند (۱۷). بدون شک درمان های هدف دار، در نتیجه شناخت بیشتر مکانیسم ها و مسیرهای انتقال پیام مرتبط با سرطان حاصل شده اند. این روش های درمانی بر پایه ایجاد تداخل با مولکول های ویژه

می باشند و با ساختاری مشابه ۴- آمینو بنزوئیک اسید، از تبدیل پارا آمینوبنزوئیک اسید به دی هیدرو فوئیک اسید جلوگیری کرده و در نهایت باعث مهار رقابتی بیوسنتز اسید فوئیک می شوند. مهار مسیر ساخت اسید فوئیک در سلول باکتریایی، ساخت دیواره سلولی و اسیدهای نوکلئیک را با مشکل روبرو می سازد و باعث نابودی باکتری ها می شود (۳-۱). برخی از سولفونامیدها فعالیت ضد توموری دارند و اخیراً در درمان های بالینی برای درمان سرطان استفاده می شوند (۹-۴). همچنین مطالعات، بررسی رابطه ساختار با عملکرد وجود دو گروه از ضد تومورهای سولفونامیدی را به نام های [N-(۳-کلرو-۷-ایندولیل) ۴،۱- بنزن دی سولفونامید] (E7070) و [N-(۲- [۴-هیدروکسی فنیل] آمینو]-۳- پیریدینیل] ۴- متوکسی بنزن سولفونامید (E7010) نشان داده اند (۴). E7070 و همسانه های آن متعلق به گروه جدیدی از مهار کننده های چرخه سلولی هستند که پیشبرد چرخه سلولی را در نقاط چندگانه کنترلی مهار می کنند. این ترکیبات با هدف قرار دادن فازهای G_1/M و G_1/S خصوصیات ضد توموری خود را نشان می دهند (۵،۶). گزارش هایی نیز وجود دارد که نشان می دهد E7010 با مهار پلی مریزاسیون توبولین ها و ممانعت از تشکیل میکروتوبول ها رشد و تکثیر سلول ها را متوقف می کند. E7010 به طور برگشت پذیر به مکان اتصال کلشی سین در β -توبولین متصل می شود و در مقابل تومورهای موش و چندین نوع از تومورهای انسانی فعالیت ضد توموری خود را نشان می دهد (۷). به علاوه، این ترکیبات در مقابل انواع گوناگونی از رده های سلولی مقاوم به دارو اثر گذارند (۷). اخیراً هر دو داروی E7070 و E7010 در حال عبور از مرحله دوم سنجش بالینی می باشند و در این مسیر الگوی سمی نسبتاً خوبی را در مواجهه با سلول های سرطانی نشان داده اند (۴). مشتقات سولفونامیدی جدیدی نیز با فعالیت ضد پروتئازی (متالو- سرین- سیستئین- و آسپارتیک- پروتئازهای با منشأ پستانداران و یا ویروسی) گزارش شده است که اثرات ضد ویروسی، ضد توموری و ضد التهابی مناسبی را از خود نشان می دهند (۷). بعضی از سیستمین پروتئازهای انسانی مانند کاسپازها و کتسپین ها در آسیب شناسی چند بیماری التهابی مثل آرتریت روماتوئید و آسیب های مغزی مطرح می باشند (۷). کاسپازها همچنین نقش مهمی را در مرگ برنامه ریزی شده سلول

مؤثر در سرطان‌زایی استوار گشته‌اند و از این طریق موجب توقف رشد و انتشار سرطان می‌شوند.

در این پژوهش، سعی گردید با وجود گزارش‌های ضد و نقیض موجود در ارتباط با مکانیسم عمل داروهای سولفونامیدی، به این سؤال اساسی پاسخ داده شود که آیا واقعاً این خانواده دارویی از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و یا توقف چرخه تقسیم سلولی باعث توقف رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود، یا از طرق دیگری این اثر را از خود نشان می‌دهد. به همین دلیل اثرات یکی از اعضای مهم این خانواده دارویی (استازولامید) به روی رده سلولی T-47D مورد توجه قرار گرفت. مطالعات نشان‌دهنده بینش جدیدی در نحوه اثرگذاری داروی استازولامید بر روی سلول‌های سرطانی است که می‌تواند در نابودی درمان سرطان‌هایی مثل سرطان سینه راهگشا باشد.

روش بررسی

محیط کشت سلولی RPMI1640 و سرم جنین گاوی از شرکت GIBCO انگلستان، [۳- (۴،۵- دیمیتیل تiazول-۲-تیل)-۲،۵- دیفنیل تترازولیوم برومید] (MTT) و محلول تریپسین- EDTA از شرکت Sigma انگلستان، استرپتومایسین- پنی‌سیلین، کیت DNA Laddering، کیت رنگ‌آمیزی Annexin-V-FLOUS، کیت رنگ‌آمیزی پرویديوم يدید، کیت سنجش فعالیت کاسپاز-۳، کیت ۴، ۶- دی آمیدینو-۲- فنیل ایندول (DAPI) از شرکت Roche آلمان، دوکسوروبیسین از شرکت Ebewe Pharma اتریش و نمک سدیم‌دار استازولامید از شرکت Aventis Farma تهیه گردید. در این پژوهش از دستگاه‌های ثبت الایزا ساخت شرکت Rayto چین؛ میکروسکوپ فلئوئورسانس ساخت شرکت Karl Zeiss آلمان؛ طیف نورسنج فلئوئورسانس مدل MPF-4A ساخت شرکت HITACHI ژاپن؛ طیف نورسنج Nanodrop ساخت شرکت Thermsientific آمریکا و دستگاه فلوئوسایتمتر ساخت شرکت Partec آمریکا مجهز به نرم‌افزار Flowmax استفاده شد.

سلول‌های T-47D (رده سلولی سرطانی بافت پوششی مجاری شیری سینه در انسان) تهیه‌شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (با کد HTB-133 ATCC) در محیط سترون RPMI1640 غنی‌شده با سرم جنین گاو (۱۰٪ حجم/حجم) و پنی‌سیلین/استرپتومایسین (۱٪

حجم/حجم) تحت شرایط کنترل‌شده دما (37°C) و اتمسفر مرطوب حاوی CO_2 (۵٪ حجم/حجم) کشت داده شد و تعویض محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک‌بار صورت گرفت. در زمان پاساژ سلولی جهت انتقال سلول‌ها به فلاسک جدید از محلول سترون تریپسین- EDTA با زمان انکوباسیون ۵-۳ دقیقه استفاده گردید. براساس نتایج حاصل از MTT و تعیین غلظت مؤثر دارو جهت کاهش ۵۰ درصدی بقای سلول‌ها در ۴۸ ساعت (LC_{50})، پودر سدیم استازولامید ($\text{MW}=244/23\text{gr/mol}$) در محیط کشت تا حصول غلظت 26mM حل و سپس محیط کشت به دست آمده با استفاده از فیلتر $0/22\mu\text{M}$ سترون گردید. سپس محیط کشت حاوی دارو در زمانی که سلول‌ها حدوداً ۸۰٪ از سطح فلاسک سلولی را پوشاندند، طی فرآیند تعویض محیط کشت به فلاسک افزوده شد. پس از طی شدن ۲۴ ساعت محیط کشت رویی تخلیه و با افزودن محلول سترون تریپسین- EDTA سلول‌های جداشده از کف فلاسک ۳ بار با استفاده از بافر فسفات- سالین شستشو و سپس به دمای 4°C -۷۰ منتقل شدند (تعیین توان زیستی سلول‌ها با استفاده از ماده شیمیایی MTT صورت می‌گیرد. این ماده میزان فعالیت تنفسی میتوکنندری‌های مستقر در سلول‌های زنده را سنجش می‌کند). برای تعیین توان زیستی سلول‌ها در حضور دارو و قیاس آن با نمونه شاهد منفی، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به چاهک‌های صفحات ۹۶ خانه منتقل و پس از ۲۴ ساعت تحمل شرایط کشت سلولی (۵٪ CO_2 و 37°C) و اتصال به کف چاهک‌ها، محیط کشت رویی جدا و محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف دارو (سدیم استازولامید، شکل شماره ۱A و دوکسوروبیسین، شکل شماره ۱B) افزوده شد. جهت بررسی اثر دارو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد ۳ صفحه ۹۶ خانه (هر صفحه مختص یک زمان انکوباسیون دارویی) در نظر گرفته شد؛ به‌طوری‌که در هر صفحه، دستجات ۳ تایی از چاهک‌های کنار هم، به‌منظور ایجاد شرایط تکرار آزمایش مرتبط با یک غلظت از دارو، فراهم شود. آزمایش فوق در ۳ تکرار مجزا برای هر زمان انکوباسیون صورت گرفت؛ به‌نحوی‌که برای هر غلظت دارویی حداقل ۹ تکرار موجود باشد. پس از گذران زمان انکوباسیون دارویی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) از محلول ذخیره MTT با غلظت 4mg/ml به هر چاهک افزوده شد؛ تا غلظت خالص $100\mu\text{g}$ از MTT در هر چاهک به دست آید. سپس محصول فورمازان به دست آمده (پس از انکوباسیون ۳ ساعته در دمای 37°C)

روش سلول‌ها به روی لامل‌های پوشانده‌شده با پلی‌ال-لیزین کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت با تخلیه محیط کشت رویی، محیط کشت حاوی دارو (استازولامید و یا دوکسوروبیسین) افزوده شد و پس از طی شدن زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته، محلول رنگی Annexin V-FITC ($20 \mu\text{g/ml}$) و پروپیدوم دیدید ($20 \mu\text{g/ml}$) به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی در مجاورت سلول‌ها قرار گرفت. سپس تصاویر سلولی در درشت‌نمایی‌های مختلف در زیر میکروسکوپ فلئوئورسانس (طول موج تحریکی $450-500 \text{nm}$ و طول موج ثبتی $515-565 \text{nm}$) بررسی شد. سنجش فعالیت کاسپاز-۳ با استفاده از کیت نشرزای شرکت Roche با حساسیت بسیار بالا، طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. در این روش سلول‌های تیمار شده با دارو با بافر PBS شسته و به مدت ۱ دقیقه به روی یخ در مجاورت بافر لیز سلولی قرار داده شدند. پس از انجام سانتریفوژ، بخش رویی جدا و به روی چاهک پوشیده‌شده با آنتی‌بادی ضد کاسپاز-۳ انتقال داده شد، تا پس از گذشت زمان انکوباسیون و انجام فرآیند شستشو، سوپسترای ویژه کاسپاز-۳ (AC-DEVED-AFC) در اختیار مولکول‌های آنزیمی به دام افتاده در ته چاهک قرار داده شود. (انجام فرآیند کاتالیز آنزیمی به روی سوپسترا باعث رهاسازی ماده نشرزای AFC می‌شود که می‌توان غلظت آن را در واحد زمانی (یک ساعت) براساس منحنی استاندارد AFC آزاد، مشخص و ملاکی را برای مشخص نمودن فعالیت آنزیمی تعیین نمود). در این راستا، تحریک نمونه‌ها در طول موج 400nm و ثبت فوتون‌های نشری در طول موج 505nm صورت گرفت. به‌منظور بررسی قطعات DNA حاصل از عملکرد کاسپازها در سلول‌های تیمار شده با دارو (سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین) و مقایسه آن با شاهد منفی از کیت DNA Laddering ساخت شرکت Roche استفاده گردید. در این روش تعداد 2×10^6 سلول پس از شستشو با بافر PBS در دمای $25-15^\circ\text{C}$ با حجم مساوی از بافر لیز سلولی انکوبه شد. سپس DNA با استفاده از لوله‌های ویژه‌ای که حاوی فیلتر اتصال یابنده به DNA می‌باشد، پس از یک دقیقه انجام سانتریفوژ در 8000RPM جداسازی شد. DNA اتصال‌یافته به فیلتر پس از ۲ بار شستشو از درون لوله خارج و توسط سانتریفوژ جمع‌آوری شد. غلظت DNA با روش جذب‌خوانی تعیین و الکتروفورز آن به روی آگاروز ۱٪ و تحت ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱/۵ ساعت انجام گرفت. نرم‌افزار Flowmax جهت

در 100ml دی متیل سولفو کساید حل و میزان جذب نوری فورمازون تولید شده با استفاده از دستگاه ثبت الایزا در طول موج 570nm تعیین گردید. توان زیستی سلول‌های تیمار شده با دارو (در هر غلظت از دارو) به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازون تولیدی در شاهد منفی (در همان غلظت از دارو) تعیین و در یک منحنی دوبعدی (درصد توان زیستی یا بقای سلول‌ها در مقابل غلظت دارو) نشان داده شد. از منحنی به دست آمده می‌توان LC_{50} را برای ۲ داروی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعیین نمود. به‌منظور تعیین تعداد سلول‌های آپاپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با دارو (سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین) و قیاس آن با جمعیت سلولی شاهد منفی، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با ۲ رنگ Annexin-FITC و پروپیدوم دیدید (PI)، طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دوبعدی به ۴ ناحیه Q_1 - Q_4 صورت گرفت؛ به‌نحوی که ناحیه Q_1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی Annexin-FITC^- و PI^+ ؛ ناحیه Q_2 نمایانگر سلول‌های آپاپتوز شده پیر با ویژگی Annexin-FITC^+ و PI^+ ؛ ناحیه Q_3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی Annexin-FITC^- و PI^- و ناحیه Q_4 نمایانگر سلول‌های آپاپتوزی جوان با ویژگی Annexin-FITC^+ و PI^- بود. به‌منظور تعیین اثرات داروهای به کار رفته در جهت القای آپاپتوزیس و یا نکروز، درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه توسط نرم‌افزار محاسبه و گزارش گردید. اندازه‌گیری محتوای DNA سلول‌ها در یک جمعیت سلولی با استفاده از نشانگر DAPI صورت گرفت. در این روش، تعداد 5×10^5 سلول برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی با محلول DAPI در بافر PBS با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ حاوی ۶٪ تریتون X100 انکوبه شد. سپس نشر فلئوئورسانس نشانگر به کار رفته پس از تهیج در طول موج 359nm ثبت گردید. ثبت فوتون‌های نشری در طول موج 461nm تجزیه و تحلیل داده‌ها به روی منحنی دوبعدی پهنا (W) در برابر سطح زیرپیک (A) با استفاده از نرم‌افزار FloMax صورت گرفت. بررسی حضور فسفاتیدیل سرین در نیم غشای خارجی سلول‌ها به‌عنوان یک ویژگی مهم سلول‌های آپاپتوزی به همراه نفوذ پروپیدوم دیدید به داخل هسته سلول‌های آپاپتوزی پیر و سلول‌های نکروزی، با بهره‌گیری از میکروسکوپ فلئوئورسانس صورت گرفت. در این

شده است، نشان‌دهنده اثرات بازدارندگی وابسته به غلظت دارو در رشد و تکثیر سلول‌ها در محدوده غلظت ۰/۰-۳۰mM برای سدیم استازولامید و ۰/۰-۰/۶۰μM برای دوکسوروبیسین می‌باشد (شکل شماره ۲). به منظور تعیین رابطه اثر دارو با زمان، نمونه‌ها بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محدوده غلظت تعیین شده، بررسی شدند و میزان توان زیستی سلول‌ها پس از تیمار دارویی در قیاس با نمونه شاهد محاسبه گردید. در شکل شماره ۲ ارتباط میزان توان زیستی سلول‌ها (محور y) با افزایش غلظت دارو (محور x) نشان داده شده است. با استفاده از این نمودار غلظت مؤثر دارو برای کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلول‌ها (LC_{50}) در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه و در ۴۸ ساعت برای سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین به ترتیب برابر با ۲۶mM و ۰/۳۳۷μM مشخص شده است که این غلظت در تمامی تحقیقات انجام شده در این مقاله جهت تشخیص نوع اثر بازدارندگی دارو مورد استفاده قرار گرفت.

پردازش داده‌های فلوسایتومتری به منظور تعیین درصد سلول‌های سالم، آپاپتوزی و نکروزی و نیز تعیین درصد سلول‌های مستقر در مراحل G_1 ، S و G_2/M مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و Excel 2007 و آزمون آماری واریانس یک‌طرفه صورت گرفت و مقایسه گروه‌های مختلف با هم در سطح $p < 0/05$ انجام شد. نتایج در کل به شکل میانگین $\pm$ خطای استاندارد گزارش گردید.

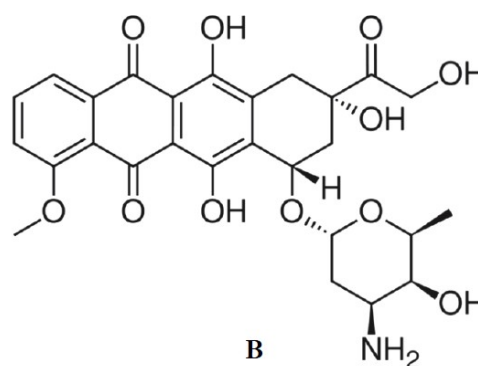
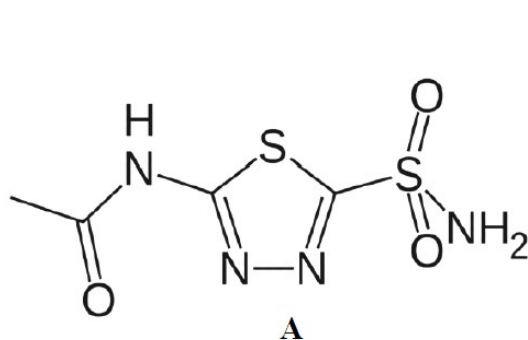
یافته‌ها

در این بررسی از آزمون MTT جهت سنجش توان زیستی و قدرت بقای سلول‌ها در مجاورت با دارو، به منظور تعیین غلظتی از دارو (سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین) که در آن توان زیستی سلول‌ها در قیاس با شاهد منفی به نصف کاهش می‌یابد (LC_{50})، استفاده شد. نمودار جذب نوری محلول فورمازان در حلال DMSO، که براساس غلظت‌های افزاینده استازولامید (شکل شماره ۱، A) و دوکسوروبیسین (شکل شماره ۲، B) رسم

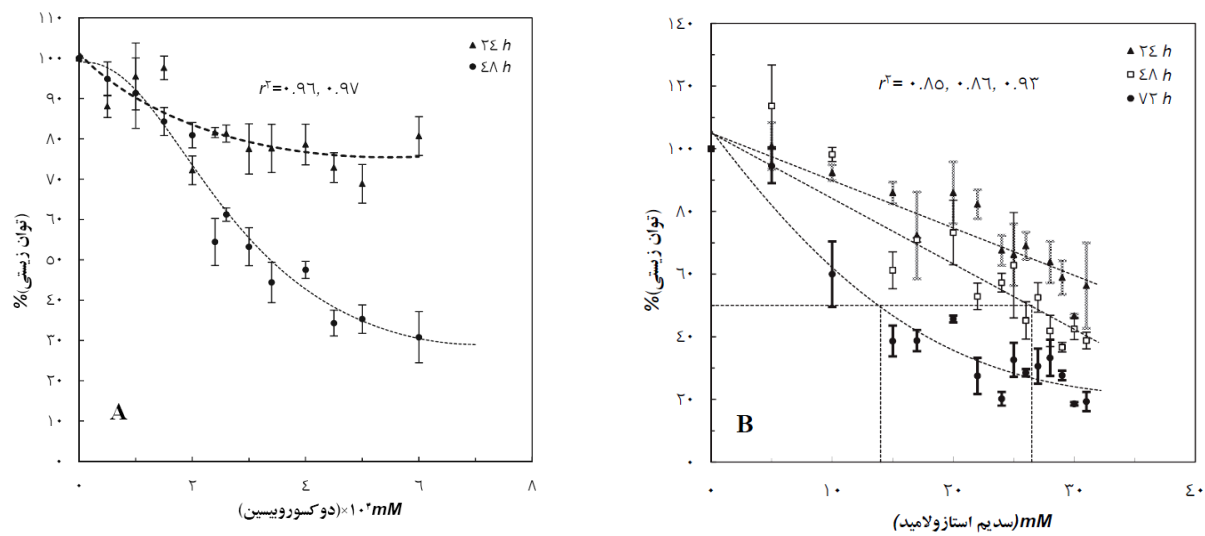
جدول: نتایج عددی آزمون فلوسایتومتری

سلول‌های تیمار شده	Q_3	Q_1	Q_2	Q_4	Q_1+Q_2	Q_2+Q_4	% G_1	% S	% G_2/M
کنترل منفی	۹۹/۲۸ $\pm$ ۰/۳۰	۰/۵۰۵ $\pm$ ۰/۱۹	۰/۰۶ $\pm$ ۰/۰۴	۰/۴ $\pm$ ۰/۰۷	۰/۵۳۵ $\pm$ ۰/۱۳	۰/۴۳ $\pm$ ۰/۱۱	۶۷/۰۶ $\pm$ ۵/۷۹	۱۶/۳۹ $\pm$ ۴/۲۷	۱۶/۵۴ $\pm$ ۳/۲۰
دوکسوروبیسین	۹۸/۴۹ $\pm$ ۰/۲۲	۰/۷۴ $\pm$ ۰/۰۱	۰/۳ $\pm$ ۰/۰۲	۰/۷۲ $\pm$ ۰/۱۱	۰/۷۶ $\pm$ ۰/۱۲	۰/۹۵ $\pm$ ۰/۳۱	۳۰/۵۸ $\pm$ ۱/۱۴	۴۰/۵۵ $\pm$ ۴/۶۵	۲۸/۸۶ $\pm$ ۳/۵۱
استازولامید	۹۹/۰۹ $\pm$ ۰/۱۴	۰/۴ $\pm$ ۰/۰۵۶	۰/۰۶ $\pm$ ۰/۰۲۱	۰/۴۶۵ $\pm$ ۰/۰۱	۰/۴۴۵ $\pm$ ۰/۰۳۵	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۰۸۴	۶۳/۹۱ $\pm$ ۰/۱۲	۱۶/۶۲ $\pm$ ۳/۵۰	۱۹/۳۸ $\pm$ ۳/۴۰

نتایج برای حداقل ۲ تکرار آزمایش به شکل درصد میانگین سلول‌ها $\pm$ خطای معیار گزارش شده است. هر ستون Q_i نشان‌دهنده هریک از نواحی چهارگانه در نمودارهای آورده شده در شکل شماره ۴ می‌باشد. ستون‌های Q_1 و یا Q_1+Q_2 نمایانگر سلول‌های تکروزی و ستون‌های Q_4 و یا Q_2+Q_4 نمایانگر درصد کل سلول‌های آپاپتوزده براساس هریک از ۲ روش ذکر شده در بخش نتایج است (نگاه به متن). ستون Q_2 معرف سلول‌های سالم می‌باشد. ستون‌های G_1 ، S و G_2/M نشان‌دهنده درصد سلول‌های واقع در هر مرحله چرخه سلولی است که در شکل شماره ۵ نشان داده شده است. درصد سلول‌های قرار گرفته در G_1 sub بسیار اندک و قابل چشم‌پوشی است.



شکل شماره ۱: ساختار شیمیایی داروی استازولامید (A)، ساختار شیمیایی داروی دوکسوروبیسین (B).



شکل شماره ۲: منحنی توان زیستی سلول‌های T-47D بر حسب افزایش غلظت دوکسوروبیسین (A) و سدیم استازولامید (B)

درصد توان زیستی سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل منفی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سدیم استازولامید (۰/۰-۳۰ mM) و دوکسوروبیسین (۰-۰/۶ μM) به ترتیب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای سدیم استازولامید و ۲۴ و ۴۸ ساعت برای دوکسوروبیسین محاسبه گردید. منحنی حاصل نشان‌دهنده اثر بازدارندگی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین بر روی سلول‌ها به صورت تابعی از غلظت و زمان می‌باشد. هریک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از حداقل ۳ آزمون مستقل با $\pm$ خطای معیار (SD) است. در بالای نمودار ضریب همبستگی برای سدیم استازولامید در زمان‌های به ترتیب از چپ به راست ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت؛ و برای داروی دوکسوروبیسین برای زمان‌های به ترتیب از چپ به راست ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود.

می‌گردد که الگوی شکست نردبانی DNA آن به روی ژل آگاروز قابل مشاهده است (شکل شماره ۳). همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود، الگوی مورد نظر در مورد DNAهای استخراج‌شده از سلول‌های تیمار شده با سدیم استازولامید، دوکسوروبیسین و سلول‌های نمونه شاهد منفی، قابل مشاهده نیست که این موضوع بیان‌کننده عدم بروز آپاتوزیس در این نمونه‌ها می‌باشد (شکل شماره ۳). آنزیم کاسپاز-۳ به عنوان یکی از مهم‌ترین کاسپازهای عمل‌کننده در زمان بروز آپاتوزیس فعال می‌شود (۱۹). بنابراین افزایش میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های تیمار شده (در قیاس با سلول‌های شاهد) می‌تواند نشان‌دهنده القای آپاتوزیس در سلول‌های سرطانی T-47D و در حضور سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین باشد. همان‌گونه که در بخش روش بررسی توضیح داده شد با استفاده از سوبسترای اختصاصی کاسپاز-۳ (AC-DEVD-AFC) و آزادسازی AFC در نتیجه برش آنزیمی سوبسترا، می‌توان به میزان فعالیت کاسپاز-۳ در مدت زمان مشخص پی برد. میانگین میزان نشر فلئورسانس حاصل از ۳ بار تکرار صورت پذیرفته در نمونه‌های کنترل منفی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۶ mM سدیم استازولامید و سلول‌های تیمار شده با ۰/۳۳۷ μM دوکسوروبیسین به ترتیب برابر

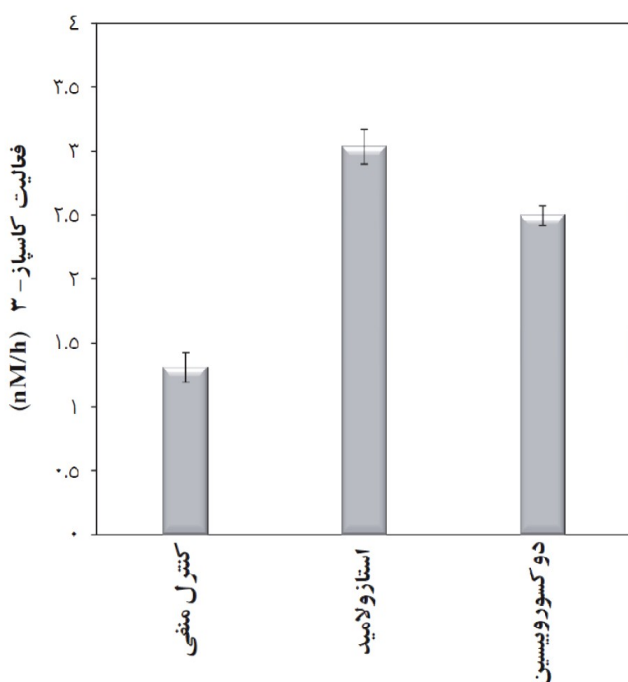
قطعه‌قطعه شدن DNA کروماتینی یکی از نشانه‌های وقوع مرگ سلولی است. در مرگ ناگهانی سلول (نکروز) DNA بدون نظم مشخص و به صورت اتفاقی از نقاط مختلف شکسته می‌شود، در حالی که در مراحل انتهایی فرآیند آپاتوزیس، بر اثر فعال شدن آنزیم‌های اندونوکلاز درونی (مانند CAD/CPAN/DFF₄₀) به وسیله کاسپازها، DNA کروموزومی از نواحی بین نوکلئوزومی بریده و قطعات یک و یا چند نوکلئوزومی تشکیل می‌شود. قطعات حاصل پس از تفکیک به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، الگوی نردبانی مشخصی را ایجاد می‌کنند که به راحتی از الگوی پیوسته DNA در سلول‌های نکروتیک قابل تفکیک است (۱۸). در این مطالعه، DNA ژنومی سلول‌های تیمار شده با سدیم استازولامید، دوکسوروبیسین و شاهد منفی، استخراج و بر روی ژل آگارز تفکیک و رنگ آمیزی شد. مشاهده الگوی شکست نردبانی مشخص در نمونه کنترل مثبت نشان‌دهنده درستی کارکرد کیت به منظور آشکارسازی الگوی نردبانی شکل می‌باشد (شکل شماره ۳). در این بررسی از عصاره سلول‌های U937 تیمار شده با غلظت ۴ μg/ml داروی Camptothecin به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شده است. این دارو موجب القای آپاتوزیس در حدود ۳۰٪ در سلول‌های U937

مشاهده می‌گردد، درحالی‌که در سلول‌های آپاپتوزی جوان تجمع هیچ رنگی در هسته دیده نمی‌شود (شکل شماره 5b). در شکل شماره 5c نیز نشانه‌هایی از جوانه‌زنی غشا و تشکیل اجسام آپاپتوزی مشاهده می‌گردد. وجود سلول‌های زنده در محیط که به علت عدم رنگ‌پذیری با رنگ‌های فلئورسنت در میدان دید فلئورسانس قابل تشخیص نمی‌باشند، در یک میدان دید مشخص با استفاده از امکانات فاز کنتراست میکروسکوپ به تعداد زیاد رؤیت شدند که تصاویر آن نشان داده نشده است. به منظور دستیابی به مقادیر عددی القای آپوپتوزیس و نکروز در نمونه‌های کنترل منفی (سلول‌های تیمارنشده)، و سلول‌های تیمار شده با داروهای سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین، آزمون فلوسایتومتري با نشانگرهای PI و Annexin-FITC انجام شد. سلول‌های وارد شده به دستگاه فلوسایتمتر براساس اختلاف در میزان نشر رنگ‌های فلئورسین ایزوتوسیانات (FITC) و پروپیديوم یدید (PI) که جذب سلول می‌شوند، تفکیک شدند. در یک جمعیت سلولی فاقد رنگ، تعیین حدود اصلی سلول‌ها و حذف ذرات نامناسب با استفاده از منحنی دوبعدی (FSC) در برابر (SSC) صورت گرفت. در نمودار دوبعدی Annexin-FITC در برابر PI محاسبات مورد نظر با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی به روی 4 ناحیه اصلی Q₁-Q₄ انجام پذیرفت و درصد سلول‌های سالم، آپاپتوزی و نکروزی براساس آنچه در بخش روش بررسی بدان اشاره شد، مشخص گردید (شکل شماره 6، 7 و جدول). در اینجا با توجه به نوع نتیجه‌گیری در اغلب منابع، مجموع درصد سلول‌های واقع شده در نواحی Q₂ و Q₄ به عنوان درصد کل وقوع آپاپتوزیس (سلول‌های آپاپتوز شده پیر و جوان) در نظر گرفته شد (23-20). در این حالت، سلول‌های قرار گرفته در نواحی Q₁ و Q₃ به ترتیب، معرف سلول‌های نکروزی و سالم می‌باشد. در شکل شماره 7 و جدول علاوه بر مجموع درصد سلول‌های واقع شده در نواحی Q₂ و Q₄ به مجموع اعداد نواحی Q₁ و Q₃ نیز اشاره شده است که این مورد (مورد دوم) در برخی از منابع به عنوان درصد کل وقوع نکروز مورد استناد قرار گرفته است (24). بدیهی است که در چنین حالتی ناحیه Q₄ به تنهایی نشان‌دهنده درصد کل سلول‌های آپاپتوزی می‌باشد. اشاره به هر 2 روش محاسبه‌ای فوق (Q₁+Q₂ و Q₂+Q₄) از آنجا صورت گرفته است؛ تا مشخص گردد که در صورت محاسبه وقوع آپاپتوزیس و

۱/۴۲±۱۶، ۱/۷۱±۳۸ و ۱/۸۹±۳۱ بود. این افزایش نشر نمونه‌های تیمار شده با دارو در قیاس با نمونه شاهد منفی به خودی خود نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در زمان مجاورت سلول‌ها با دارو می‌باشد. به وسیله رسم منحنی استاندارد می‌توان از روی میزان نشر نمونه‌ها، غلظت دقیق AFC آزاد شده ناشی از فعالیت آنزیمی را در واحد زمان (که معرف فعالیت آنزیمی است) همراه با انحراف معیار مربوط به آن به دست آورد (شکل شماره ۴). فعالیت آنزیمی در نمونه کنترل منفی ۱/۱۱۵±۰/۳۰۸ nM/h در نمونه تیمار شده با سدیم استازولامید ۱/۱۳۶±۰/۳۵۵ nM/h و در نمونه تیمار شده با دوکسوروبیسین برابر با ۲/۴۹۶±۰/۰۸۸ nM/h محاسبه شد (شکل شماره ۴). افزایش ۲/۳ و ۱/۹ برابری فعالیت کاسپاز-۳ به ترتیب در نمونه‌های تیمار شده با سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین به ظاهر نمایانگر وقوع فرآیند آپاپتوزیس در این نمونه‌ها در قیاس با شاهد منفی است که از این منظر با نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA مغایرت نشان می‌دهد. این عدم همخوانی ظاهری موجود در بین نتایج، در بخش تفسیر یافته‌ها مورد بحث قرار گرفته و به آن توضیح داده شده است.

نتایج حاصل از مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلئورسانس نشان داد در یک جمعیت سلولی استقرار یافته در سطح لام، پس از تیمار دارویی با سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین (به مدت ۴۸ ساعت) و رنگ‌آمیزی با سامانه رنگی Annexin-PI، پیدایش ظاهر مشابه با آنچه در مورد سلول‌های قرار گرفته در مراحل ابتدایی آپاپتوزیس گزارش شده است، تنها در مورد تعداد بسیار کمی از سلول‌ها (در میدان‌های دید مختلف) مشاهده می‌شود که از این نظر این موضوع مؤید وقوع کم آپاپتوزیس در بین سلول‌های تیمار شده با دارو در قیاس با شاهد منفی (همانند نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA) می‌باشد (شکل شماره ۵). گردشگی سلول‌ها در نتیجه سست شدن اتصالات سلولی همراه با شناسایی فسفا تیدیل سرین‌های غشایی توسط مولکول‌های نشاندار شده Annexin-FITC، سلول‌های آپاپتوز شده را به صورت دایره‌ای درخشان مشخص می‌کند (شکل شماره 5a). در سلول‌های آپاپتوزی پیر (که نفوذپذیری غشا و در نتیجه خصوصیات رنگ‌پذیری هسته در آنها مشابه سلول‌های نکروزی است)، به دلیل تجمع PI در هسته، این غشای درخشان با هسته‌ای مشخص به رنگ قرمز رنگ‌آمیزی شده

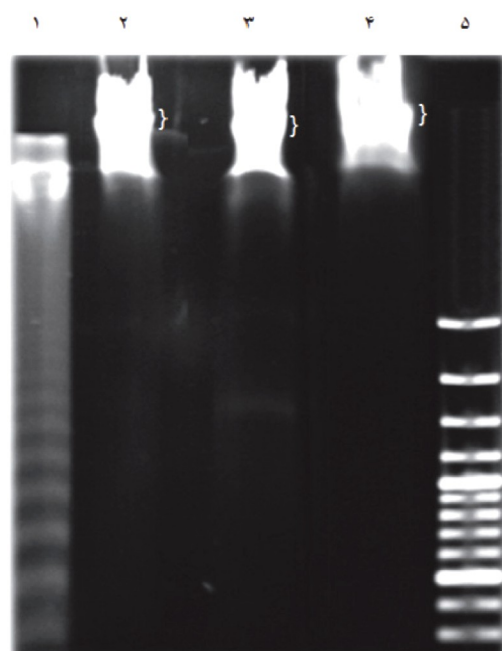
(G_2/M)، ولی برای دو کسورویسین بروز این تغییرات با جابجایی مشخص سلول‌ها از مرحله G_1 به مرحله S (و به میزان کمتر به مرحله G_2/M) همراه بوده است که این تغییرات قاعدتاً زمانی می‌تواند ایجاد شود که مکانیسم‌های گذار سلولی از مرحله S (و به میزان کمتر، مکانیسم‌های گذار از مرحله G_2/M) در زمان مجاورت با دو کسورویسین به‌نحوی دچار اختلال شده باشند (شکل شماره ۸ جدول). از این یافته‌ها مشخص می‌گردد که در زمان تیمار سلول‌ها با سدیم استازولامید، جابجایی ناچیز سلول‌ها از G_1 به G_2/M نمی‌تواند کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلولی را در زمان تیمار با این دارو توجیه نماید، ولی توقف چرخه سلولی در مرحله S در سلول‌های تیمار شده با دو کسورویسین می‌تواند دلیل محکمی در رابطه با مکانیسم اثر این دارو در ممانعت از تکثیر سلولی ارائه دهد.



شکل شماره ۴: بافت‌نگار مربوط به فعالیت کاسپاز-۳

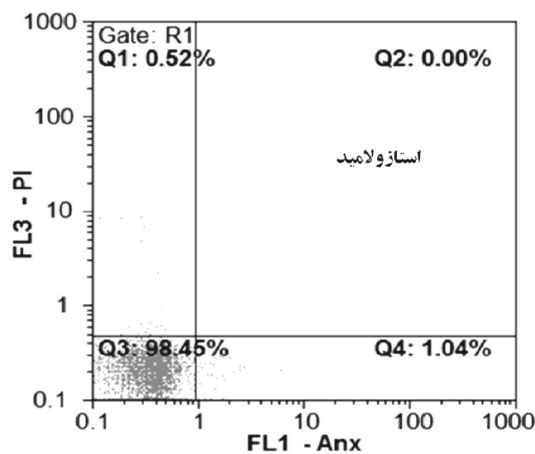
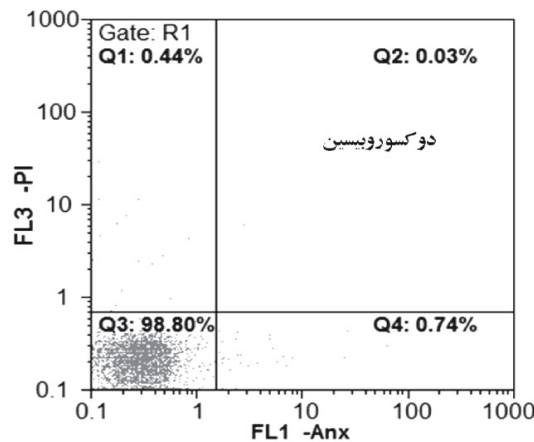
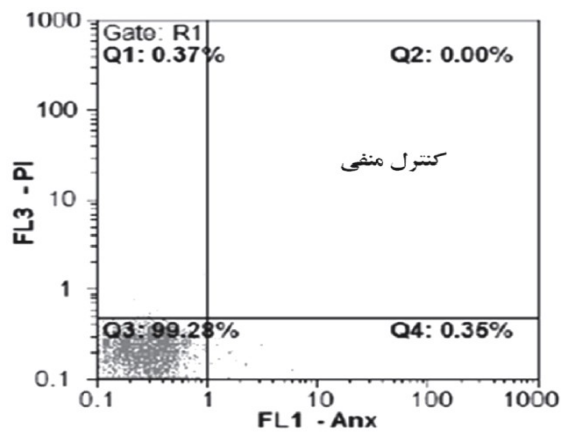
فعالیت آنزیمی در دمای 27°C در عصاره سلولی استخراج‌شده از تعداد 2×10^6 سلول و براساس دستورالعمل کیت انجام شده و میزان نشر AFC آزادشده توسط طیف نورسنج فلونورسانس در طول موج تحریکی 400nm ، طول موج نشری 505nm اندازه‌گیری شده است. فعالیت آنزیمی در نمونه کنترل منفی $1/30 \pm 0/11\text{nM/h}$ در نمونه تیمار شده با سدیم استازولامید $3/03 \pm 0/13\text{nM/h}$ و در نمونه تیمار شده با دوکسورویسین برابر با $2/49 \pm 0/08\text{nM/h}$ می‌باشد.

نکروزیس با توجه به هر کدام از ۲ روش فوق، در حصول این نتیجه که درصد کل وقوع آپاپتوزیس و نکروزیس در زمان تیمار دارویی بسیار کم بوده است، تأثیری را نخواهد داشت. از طرف دیگر، روش فلوسایتومتری علاوه بر اینکه توانایی تعیین نسبت درصد سلول‌های آپاپتوز شده، نکروز شده و سالم را دارد، قادر است به‌عنوان روشی مناسب برای تعیین جمعیت‌های سلولی درگیر در مراحل G_1 ، G_2/M و S، نیز استفاده شود. بدین‌منظور معمولاً از نشانگرهای نشرزایی چون PI و یا DAPI که توانایی ورود به محیط هسته و اتصال به DNA را دارند، استفاده می‌شود. در ادامه کار مشخص گردید که در نتیجه تیمار با داروی سدیم استازولامید پراکنش سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی به نسبت نمونه شاهد تغییرات محسوسی را نداشته (اندکی جابجایی از G_1 به



شکل شماره ۳: آشکارسازی الگوی شکست نردبانی DNA

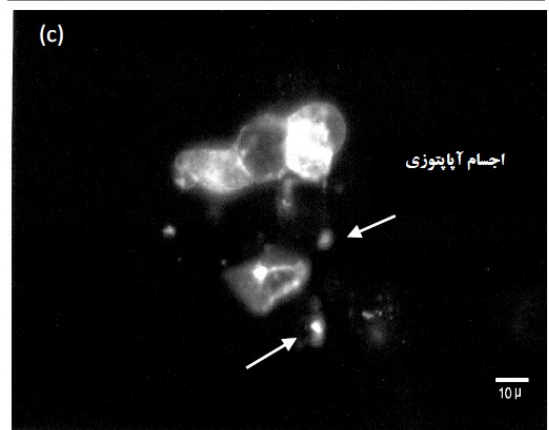
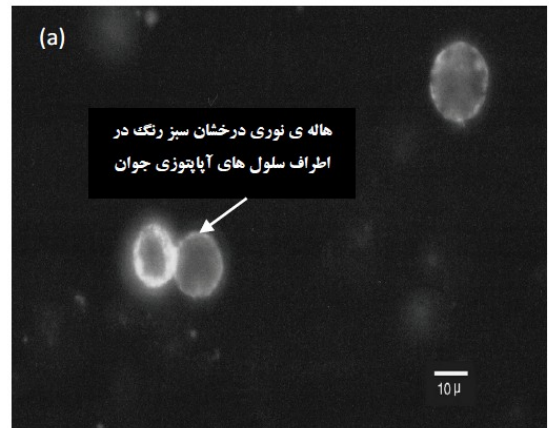
ستون‌ها مشتمل بر کنترل مثبت فراهم‌شده توسط کیت (۱)، نمونه DNA شاهد منفی (۲)، نمونه DNA سلول‌های تیمار شده با سدیم استازولامید (۳)، نمونه DNA سلول‌های تیمار شده با دوکسورویسین (۴) و شاخص اندازه مولکولی (۵) می‌باشد. DNA از تعداد 2×10^6 سلول استخراج و مقدار $1-3\mu\text{g}$ آن به روی آگاروز ۱٪ بارگذاری شده است. به‌منظور بالا بردن حساسیت و ایجاد بهترین شرایط جهت رؤیت باندهای DNA قطعه‌قطعه شده در کمترین غلظت، بارگذاری DNA نمونه‌ها با حداکثر غلظت انجام شده است که این موضوع در کنار هیپوترپلوئید بودن سلول‌های T-47D باعث پهن شدن باند DNA ژنومی شده است، ولی همان‌گونه که مشاهده می‌شود حدود باند اصلی در هر مسیر حرکتی قابل تشخیص می‌باشد که به علامت نشان داده شده است.



شکل شماره ۶: بافت‌نگار دوبعدی Annexin-FITC علیه PI مربوط به

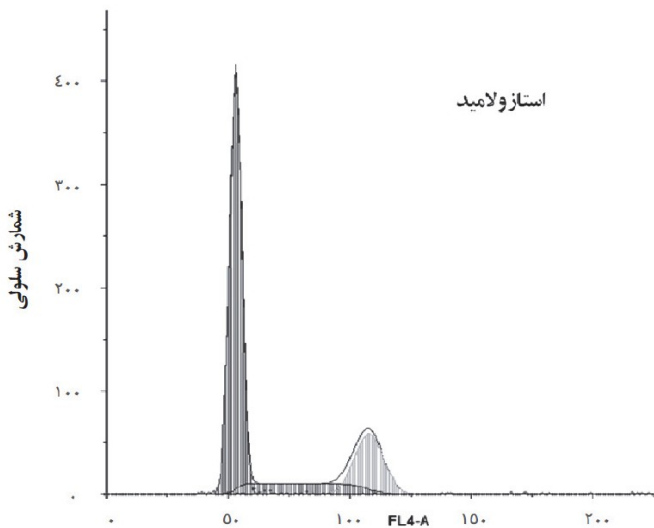
یکی از تکرارهای آزمون فلوسایتومتری

در شکل، نمودارهای رسم‌شده مربوط به یکی از تکرارهای شاهد منفی، تیمار شده با داروهای دوکسوروبیسین و سدیم استازولامید به‌عنوان نمونه آورده شده است. محدوده اندازه سلول‌های مورد بررسی، روی نمودار FSC/SSC در نمونه سلول‌های سالم فاقد رنگ و براساس اندازه طبیعی سلول‌ها تعیین گردیده است. همچنین تعیین محدوده ناحیه ذکر شده براساس قرارگیری بیش از ۹۰٪ سلول‌های نمونه کنترل منفی در ناحیه Q_3 صورت پذیرفته است. نمودارهای دوبعدی حاصل از مطالعات فلوسایتومتری نشان داد درصد سلول‌های آپاپتوزی و تکروری تفاوت فاحشی را با نمونه کنترل منفی (سلول‌های تیمار نشده) ندارد.

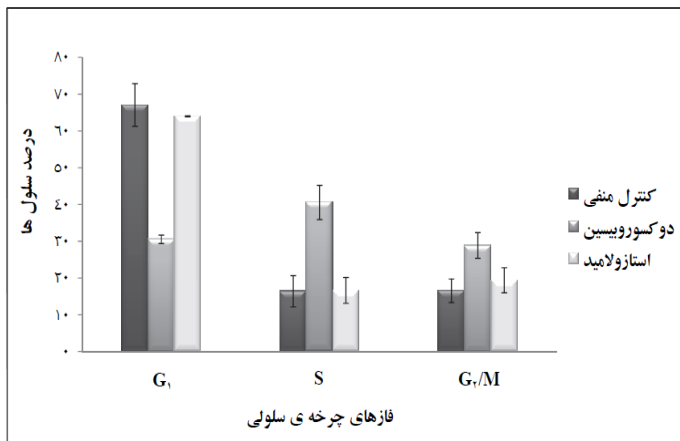


شکل شماره ۵: مشاهده ریخت‌شناسی ویژه سلول‌های آپاپتوتیک و نکروتیک توسط میکروسکوپ فلوروسانس پس از رنگ‌آمیزی همزمان سلول‌ها با Annexin-PI

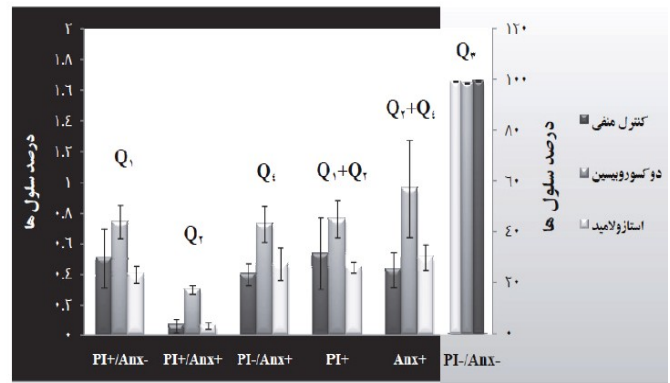
(a) سلول‌های گرد شده با غشای درخشان نشان دهنده القای آپاپتوزیس در سلول‌های T-47D در نتیجه اثر داروی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین می‌باشد. هاله سفید رنگ نشان داده شده در شکل معرف درخشندگی رنگ سبز است. (b) سلول‌های آپاپتوزی پیر با غشای درخشان حاصل از اتصال مولکول‌های نشان‌دار Annexin-FITC به غشا و به دلیل نفوذپذیر شدن غشا و تجمع PI در هسته، با هسته قرمز پر رنگ مشاهده می‌شوند. (c) نشانه‌هایی از جوانه‌زنی غشا و تشکیل اجسام آپاپتوزی به‌عنوان یکی از علائم ریخت‌شناسی ویژه آپاپتوزیس دیده می‌شود. بزرگنمایی همه تصاویر $\times 250$ می‌باشد.



شکل شماره ۸: بررسی اثر استازولامید و دوکسوروبیسین بر چرخه سلولی در سلول‌های T-47D با بهره‌گیری از روش فلوسایتومتری در این نمودار FL4-A نمایانگر سطح زیر منحنی علائم ثبت شده برای هر سلول رنگ شده با DAPI، در زمان عبور از مقابل پرتو لیزر می‌باشد. نواحی زنگوله مشخص شده در شکل، از چپ به راست معرف درصد سلول‌های موجود در فاز G_1 ، S و G_2/M است. سلول‌های شاهد منفی، سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و سلول‌های تیمار شده با سدیم استازولامید در شکل نشان داده شده است.

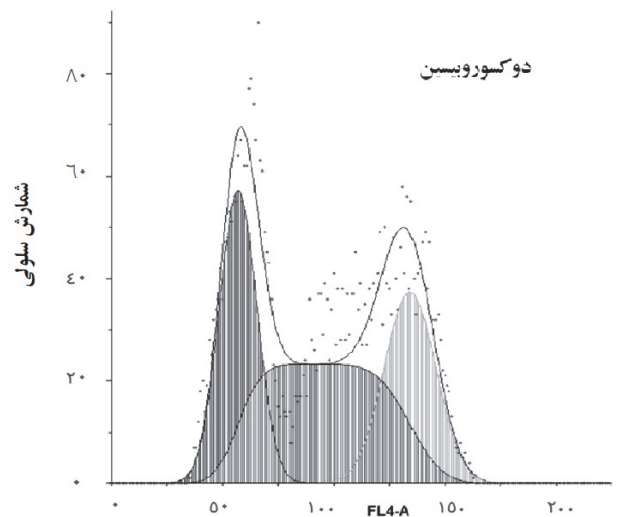
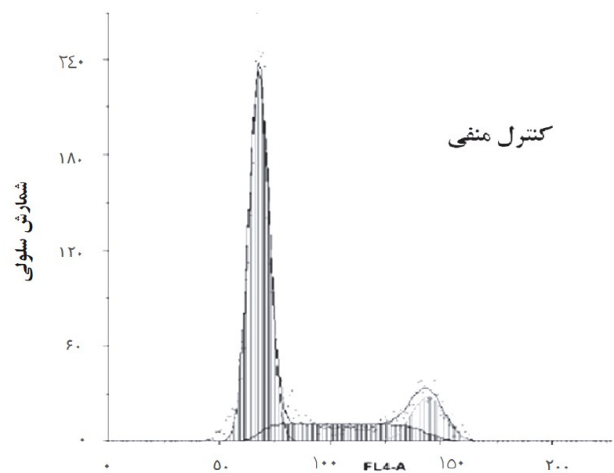


شکل شماره ۹: بافت‌نگار ستونی درصد سلول‌ها علیه فازهای چرخه سلولی حاصل از آزمون فلوسایتومتری در این نمودار درصد سلول‌های موجود ۳ فاز چرخه سلولی G_1 ، S، G_2/M در ۳ نمونه کنترل منفی، دوکسوروبیسین و سدیم سولفابنزامید مشاهده می‌شود. خطای معیار نمونه‌های ذکر شده در جدول و نیز در روی شکل مشخص شده است.



شکل شماره ۷: بافت‌نگار ستونی درصد سلول‌ها علیه Annexin-PI حاصل از آزمون فلوسایتومتری

در این نمودار درصد سلول‌های دارای مشخصه مشابه در رنگ‌های PI و Annexin نشان داده شده است. همان‌طور که با رنگ مشخص است نمودار عمودی (محور y) سمت راست مربوط به ناحیه Q_2 (PI-/Anx-) و نمودار عمودی سمت چپ مربوط به سایر نواحی (Q_1 ، Q_2 ، Q_3+Q_4 و Q_5+Q_6) می‌باشد. خطای معیار نمونه‌های ذکر شده در جدول و نیز در روی شکل مشخص شده است.



بحث

تلاش برای دستیابی به دارویی مؤثر، که با عملکردی ویژه باعث نابودی سلول‌های سرطانی گردد؛ پژوهشگران را بر آن داشته است تا نظر خود را بر مسیرها و مولکول‌های ویژه‌ای معطوف کنند که نقش مهمی را از خود در بروز بیماری سرطان به ظهور می‌رسانند. استراتژی‌های عمده در این مبارزه هدفمند با بیماری سرطان شامل مهار رگ‌زایی، القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپاتوزیس) و تنظیم مسیرهای حیاتی سلول مانند چرخه تقسیم سلولی می‌باشد. سولفونامیدها، از سال‌ها پیش با کاربردهای متعددی در درمان بیماری‌ها مورد استفاده بوده‌اند. طیف وسیع اثرات دارویی این خانواده، نویسندگان مطالعه حاضر را بر آن داشت تا با تکیه بر توانایی اثرگذاری آنها بر مسیرها و ترکیبات مختلف سلولی، به بررسی قابلیت مهارکنندگی عضوی از اعضای این خانواده دارویی بر روی یک رده خاص سلولی (T-47D) پردازند. در این پژوهش از میان سولفونامیدها، داروی استازولامید به دلیل استفاده‌های درمانی متداول در مواردی چون گلوکوم و صرع، به‌عنوان گزینه‌ای مناسب جهت بررسی اثرات ضد سرطانی انتخاب گردید (۱۳-۱۰). به همین منظور، نمک سدیم‌دار این دارو در شرایط استاندارد کشت سلول بر روی یک رده از سلول‌های سرطان سینه (T-47D) اثر داده شد. همان‌گونه که در بخش نتایج عنوان گردید، نمک سدیم‌دار استازولامید به‌صورت وابسته به غلظت و زمان بر روی میزان تکثیر سلول‌های T-47D دارای اثرات بازدارندگی است که پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در غلظت‌های ۲۶mM و ۱۴mM توان حیاتی سلول‌ها را (به نسبت نمونه شاهد فاقد دارو) به میزان ۵۰٪ کاهش می‌دهد. در مراحل بعدی کار به‌منظور توجیه مکانیسم اثر دارو، مطالعه اثرات القایی آن بر روی فرآیند آپاتوزیس و یا سایر پدیده‌های سلولی که می‌توانست به‌نحوی در رشد و تکثیر سلولی مؤثر باشد (مانند چرخه سلولی) در حضور غلظت ۲۶mM سدیم استازولامید در مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت صورت گرفت. به‌علاوه، تیمار سلول‌ها با داروی دوکسوروبیسین در غلظت ۰/۳۳۷μM و مدت زمان ۴۸ ساعت برای بررسی نحوه اثرگذاری این دارو بر روی سلول‌ها مورد توجه قرار گرفت که علت آن نیز وجود گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر این دارو در راه‌اندازی آپاتوزیس و

توقف چرخه سلولی در زمان مجاورت با سلول‌ها بوده است (۲۵، ۲۶). در واقع، این دارو می‌توانست به‌عنوان شاهد مثبت در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این نکته که مطالعه مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌ها و بررسی فرآیندهای تنظیمی مؤثر در چرخه سلولی معمولاً به‌عنوان ۲ شاخص مهم در نحوه اثرگذاری داروهای ضد سرطان بررسی می‌شود، لذا در این پژوهش اثرات داروی سدیم استازولامید بر القای این دو فرآیند سلولی مورد توجه قرار گرفت. در این پژوهش به‌عنوان اولین گام، تغییر ویژگی‌های ظاهری سلول‌ها به سمت یک سلول آپاتوز شده در حضور ۲ داروی سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین بررسی شد. همان‌گونه که در شکل شماره ۵ مشاهده می‌گردد تیمار سلول‌ها با داروها سبب شکل‌گیری سلول‌هایی گردیده با غشای سبز درخشان شده است (هاله سفید رنگ نشان داده شده در شکل معرف درخشندگی رنگ سبز می‌باشد). اما تعداد این سلول‌ها در قیاس با تعداد کل سلول‌ها (که در زمینه سیاه میکروسکوپ فلئورسانس قابل مشاهده نیستند، ولی در میدان دید فاز کنتراست مشاهده می‌گردند) بسیار اندک است. در پژوهش حاضر، وقوع کم آپاتوزیس در ارتباط با داروی دوکسوروبیسین نیز برخلاف آنچه در مقالات به آن اشاره شده بود، مشاهده گردید (شکل شماره ۵). جهت حصول اطمینان از وقوع کم آپاتوزیس در زمان تیمار سلول‌ها با سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین، وضعیت سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر و رنگ آمیزی همزمان با ۲ ردیاب نشرزای Annexin-FITC و PI به‌طور کمی مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌های وارد شده به دستگاه فلوسایتومتر براساس اختلاف میزان نشر رنگ‌های فلئورسنت Fluorescein و PI متصل به سلول تفکیک گردید و نتایج حاصل با توجه به توضیحات بخش روش بررسی در جدول طبقه‌بندی شد. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود درصد کل سلول‌های آپاتوز شده (ستون Q_4 یا Q_4+Q_2) و یا نکروز شده (ستون Q_1 یا Q_1+Q_2) به‌همان صورت که در بررسی‌های میکروسکوپ فلئورسانس مشخص است، بسیار اندک می‌باشد (شکل شماره ۶، ۷ و جدول). پایین بودن میزان وقوع آپاتوزیس در حضور داروهای سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین به‌وسیله مطالعه الگوی شکست نردبانی DNA نیز به اثبات رسید (شکل شماره ۳). بنابراین با توجه

ارائه می‌کند. غیرفعال‌سازی Cdc25 به‌عنوان فسفاتاز فعال‌کننده Cdk2 می‌تواند توضیح‌دهنده مدت زمان طولانی‌تر توقف سلول‌ها در مراحل S و G_۲ و در نهایت طولانی‌تر شدن مدت زمان مضاعف شدن سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین باشد (۲۷). گزارش‌هایی مبنی بر وقوع فرآیند کاتاستروف میتوزی (MC) در پی فعال‌سازی کمپلکس سایکلین B1/Cdc2، در زمانی که سلول‌ها در مراحل S و G_۲ متوقف شده‌اند، وجود دارد (۲۸، ۲۹). این موضوع نشان می‌دهد که وقوع پدیده MC به‌واسطه تحت تأثیر قرار گرفتن ساز و کارهای کنترل چرخه سلولی به‌ویژه در مرحله G_۲ می‌باشد (۳۲-۳۰). در واقع کاتاستروف میتوزی در پی از کار افتادن فعالیت Cdc25 و توقف چرخه سلولی در مراحل S و G_۲ روی می‌دهد که در نهایت می‌تواند با افزایش بی‌رویه سایکلین B1 و Cdc2 و القای بی‌موقع میتوز، مرگ سلولی را باعث گردد (۳۶-۳۳). با توجه به این توضیحات، در اینجا نیز کاتاستروف میتوزی به‌عنوان محتمل‌ترین دلیل وقوع مرگ سلولی در زمان انکوباسیون سلول‌ها با دوکسوروبیسین پیشنهاد می‌شود که اثبات نهایی آن هم‌اکنون در دستور کار آزمایشگاه قرار دارد.

نتیجه‌گیری

در کل، براساس یافته‌های فوق می‌توان گفت که نحوه اثرگذاری سدیم استازولامید می‌بایست از طریق راه‌اندازی مسیرهای سلولی به غیر از آپاپتوزیس و توقف چرخه سلولی اعمال گردد. فرآیندهایی که می‌توان در مورد آنها پیشنهادهایی را جهت انجام فعالیت‌های پژوهشی بعدی مطرح نمود. از جمله این پیشنهادها می‌توان به بررسی کمی میزان نسخه‌برداری از ژن‌های دخیل در بروز فرآیند کاتاستروف میتوزی اشاره نمود که اثبات آن همانند بررسی ساز و کار اثرگذاری دوکسوروبیسین در دست بررسی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

اعتبارات این کار توسط صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) و حوزه پژوهشی دانشگاه تهران فراهم شده است که بدین‌وسیله مراتب تشکر مؤلفین از این دو نهاد اعلام می‌گردد.

به یافته‌های سه‌گانه فوق (میکروسکوپ فلورئوسانس، فلوسایتومتری، الگوی شکست نردبانی DNA) می‌توان استنتاج نمود که اثرات ضد رشد و تکثیر سدیم استازولامید و دوکسوروبیسین در سلول‌های T-47D بدون شک از طریق القای فرآیند آپاپتوزیس اعمال نمی‌شود. در این راستا، افزایش مشاهده‌شده فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ را می‌توان با توجه به وجود نقص در فرآیندهای مولکولی پایین دست کاسپاز-۳ از جمله عدم کارکرد درست DFF₄₀ توضیح داد (شکل شماره ۴). این بدان معناست که با وجود ثبت فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ در شرایط آزمایشگاهی (که در زمان مجاورت با سوبسترای مصنوعی و نه DFF₄₀ ثبت شده است)، در شرایط طبیعی سلول که این آنزیم می‌بایست به روی سوبستراهای طبیعی خود (مانند DFF₄₀) اثر داشته باشد، این اثرگذاری احتمالاً با توجه به وجود نقص در ساختار سوبستراهای طبیعی (مانند DFF₄₀) در سلول مشاهده نمی‌گردد و لذا به‌واسطه عدم فعال‌سازی DFF₄₀ تجزیه DNA و ظهور الگوی شکست نردبانی نیز قابل رؤیت نیست. روش فلوسایتومتری علاوه بر اینکه توانایی تعیین نسبت درصد سلول‌های آپاپتوز شده، نکروز شده و سالم را دارد قادر است به‌عنوان روشی مناسب برای تعیین جمعیت‌های سلولی درگیر در مراحل مختلف چرخه سلولی استفاده شود (شکل شماره ۸). از روی نمودارهای فلوسایتومتری و محاسبات صورت گرفته در محدوده R₁ (محدوده اصلی سلول‌ها) مشخص شده است که در نتیجه تیمار با سدیم استازولامید پراکنش سلول‌ها در مرحله G_۲/M به میزان ۲/۸۴٪ و در مرحله S به میزان ۰/۲۳٪ به نسبت نمونه شاهد منفی افزایش یافته است. این در حالی است که تحت تأثیر داروی دوکسوروبیسین شاهد، افزایش درصد سلول‌های قرار گرفته در مرحله S به میزان ۲۴/۱۶٪ و در مرحله G_۲/M به میزان ۱۲/۳۲٪ می‌باشد. مقایسه اعداد محاسبه شده مؤید آن است که کاهش ۵۰ درصدی تعداد سلول‌ها در زمان انکوباسیون با داروی سدیم استازولامید نمی‌تواند با اثرگذاری به روی چرخه سلولی و توقف سلول‌ها در مرحله‌ای خاص از چرخه تقسم سلولی صورت گرفته باشد، در حالی که در مورد داروی دوکسوروبیسین توقف سلول‌ها در مراحل S و G_۲/M (مجموعاً ۳۶/۴۸٪) دلیلی قانع‌کننده را در مورد ساز و کار اثرگذاری این دارو به روی سلول‌های T-47D

References:

1. Javidannjad S, Hadjibabaei M. Medical Drugs Information: Generic Drugs of Iran. Tehran: University of Tehran Publication; 2001. p. 648-655. [Text in Persian]
2. Seydel JK. Sulfonamides, Structure-Activity Relationship, and Mode of Action. Structural Problems of the Antibacterial Action of 4-Aminobenzoic Acid (PABA) Antagonists. J Pharm Sci 1968;57(9):1455-1478.
3. Gennaro AR. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. Pennsylvania; Mach Publishing Co, Eston; 1990. p. 1174-1180.
4. Mohan R, Banerjee M, Ray A, Manna T, Wilson L, Owa T, Bhattacharyya B, Panda D. Antimitotic Sulfonamides Inhibit Microtubule Assembly Dynamics and Cancer Cell Proliferation. Biochemistry 2006;45(17):5440-5449.
5. Fukuoka K, Usuda J, Iwamoto Y, Fukumoto H, Nakamura T, Yoneda T, Narita N, Saijo N, Nishio K. Mechanisms of Action of the Novel Sulfonamide Anticancer Agents E7070 on Cell Cycle Progression in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Investigational New Drugs 2001;19(3):219-227.
6. Ozawa Y, Sugi NH, Nagasu T, Owa T, Watanabe T, Koyanagi N, Yoshino H, Kitoh K, Yoshimatsu K. E7070, a Novel Sulphonamide Agent with Potent Antitumour Activity in Vitro and in Vivo. European Journal of Cancer 2001;37(17):2275-2282.
7. Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Protease Inhibitors of the Sulfonamide Type: Anticancer, Antiinflammatory, and Antiviral Agents. Medicinal Research Reviews 2003;23(5):535-558.
8. Owa T, Yoshino H, Okauchi T, Yoshimatsu K, Ozawa Y, Sugi NH, Nagasu T, Koyanagi N, Kitoh K. Discovery of Novel Antitumor Sulfonamides Targeting G₁ Phase of the Cell Cycle. J Med Chem 1999;42(19):3789-3799.
9. Yokoi A, Kuromitsu J, Kawai T, Nagasu T, Sugi NH, Yoshimatsu K, Yoshino H, Owa T. Profiling Novel Sulfonamide Antitumor Agents with Cell-Based Phenotypic Screens and Array-Based Gene Expression Analysis. Molecular Cancer Therapeutics 2002;1(4):275-286.
10. Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: Future Perspective in Topical Glaucoma Therapeutics. Int J Pharm 2002;248 (1-2):1-14.
11. Scozzafava A, Menabuoni L, Mincione F, Briganti F, Mincione G, Supuran CT. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Synthesis of Water-Soluble, Topically Effective, Intraocular Pressure-Lowering Aromatic/Heterocyclic Sulfonamides Containing Cationic or Anionic Moieties: Is the Tail More Important than the Ring? J Med Chem 1999;42(14):2641-2650.
12. Reiss WG, Oles KS. Acetazolamide in the Treatment of Seizures. Ann Pharmacother 1996;30(5):514-519.
13. Hauge A, Nicolaysen G, Thorensen M. Acute Effects of Acetazolamide on Cerebral Blood Flow in Man. Acta Physiol Scand 1983;117(2):233-239.
14. Schrier RW: Renal and Electrolyte Disorders. Boston: Little Brown and Co; 1976. p. 11-14.
15. Safarian Sh, Bagheri F, Moosavi-Movahedi AA, Amanlou M, Sheibani N. Competitive Inhibitory Effects of Acetazolamide Upon Interactions with Bovine Carbonic Anhydrase II. The Protein Journal 2007;26(6):371-385.
16. Chegwiddden WR, Spencer IM. Sulfonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrase Inhibit the Growth of Human Lymphoma Cells in Culture. Inflammopharmacology 1995;3:231-239.
17. Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008. Atlanta: American Cancer Society, Inc; 2007.
18. Nagata S. Apoptotic DNA Fragmentation. Exp Cell Res 2000;256(1):12-18.
19. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer Proteases. TIBS 1997;(22):299-306.
20. LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi E, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin Confers Resistance Against Cisplatin in Breast Cancer Cells by Activating Glutathione-S-Transferase. Carcinogenesis 2009;30(8):1298-1304.
21. Hsu CL, Yen GC. Induction of Cell Apoptosis in 3T3-L1 Pre-Adipocytes by Flavonoids Is Associated with Their Antioxidant Activity. Mol Nutr Food Res 2006;50(11):1072-1079.
22. Dowejko A, Bauer RJ, Muller-Richter UDA, Reichert TE. The Human Homolog of the Drosophila Headcase Protein Slows Down Cell Division of Head and Neck Cancer Cells. Carcinogenesis 2009;30(10):1678-1685.
23. Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin Activates p53-Caspase 2 Pathway and Causes Caspase-Mediated Cleavage of Cip1/p21 in Apoptosis Induction in Bladder Transitional-Cell Papilloma RT4 Cells: Evidence for a Regulatory Loop between p53 and Caspase 2. Carcinogenesis 2006;27(11):2269-2280.

24. Davis JW, Melendez K, Salas VM, Lauer FT, Burchiel SW. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Inhibits Growth Factor Withdrawal-Induced Apoptosis in the Human Mammary Epithelial Cell Line, MCF-10A. *Carcinogenesis* 2000;21(5):881-886.
25. Ling YH, el-Naggar AK, Priebe W, Perez-Soler R. Cell Cycle Dependent Cytotoxicity, G2/M Phase Arrest and Distribution of P34cdc2/cyclin B1 Activity induced by Doxorubicin in Synchronized p388 Cells. *Mol Pharmacol* 1996;49(5):832-841.
26. Poter AJ, Gollahon KA, Palanca BJA, Harbert MJ, Choi YM, Moskovitz AH, Potter JD, Rabinovitch PS. Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle Phas Specificity of DNA Damage Induced by Radiation, Hydrogen Peroxide and Doxorubicin. *Carcinogenesis* 2002;23(3):389-401.
27. Park SS, Eom YW, Choi KS. Cdc2 and Cdk2 Play Critical Roles in Low Dose Doxorubicin-Induced Cell Death Through Mitot. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:1014-21.
28. Ianzini F, Mackey MA. Spontaneous Premature Chromosome Condensation and Mitotic Catastrophe Following Irradiation of HeLa S3 Cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72:409-421.
29. Mackey MA, Zhang XF, Hunt C, Sullivan S, Blum J, Laszlo A, Roti Roti JL. Uncoupling of M-Phase Kinase Activation from the Completion of S Phase by Heat Shock. *Cancer Res* 1996;56:1770-1774.
30. Heald R, McLoughlin M, McKeon F. Human Wee1 Maintains Mitotic Timing by Protecting the Nucleus from Cytoplasmically Activated cdc2 Kinase. *Cell* 1993;74:463-474.
31. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 Is Required to Prevent Mitotic Catastrophe after DAN Damage. *Nature* 1999;401:616-620.
32. Canman CE. Replication Checkpoint: Preventing Mitotic Catastrophe. *Curr Biol* 2001;11:R121-124.
33. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards Against Radioresistant DNA Synthesis. *Nature* 2001;410:842-847.
34. Ianzini F, Cherubini R, Mackey MA. Mitotic Catastrophe Induced by Exposure of V79 Chinese Hamster Cells to Low Energy Protons. *Int J Radiat Biol* 1999;75:717-723.
35. Ianzini F, Bertoldo A, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Lack of p53 Function Promotes Radiation-Induced Mitotic Catastrophe in Mouse Embryonic Fibroblast Cells. *Cancer Cell Int* 2006;6:11-18.
36. Ianzini FF, Domann FE, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Human Glioblastoma U87MG Cells Transduced with a Dominant Negative p53 Adenovirus Construct Undergo Radiation-Induced Mitotic Catastrophe. *Rad Res* 2007;168:183-192.

