

مطالعه اثرات بازدارندگی داروی سدیم سولفابنزامید بر رشد و تکثیر سلول های T-47D با تأکید بر آپاپتوزیس و توقف چرخه ی سلولی

محمدحسین عبدالحمیدی^{۱*}، سرور فرحناک^۲، راضیه محمدپور^۲، شاهرخ صفریان^۲

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

^۲گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات - آدرس الکترونیکی: mh.abdolmohammadi@gmail.com

(دریافت: ۸۹/۴/۲۹؛ پذیرش: ۸۹/۸/۲۵)

چکیده

در راستای مطالعات گسترده ی انجام گرفته به روی سولفونامیدها اثرات ضد توموری برای این خانواده ی دارویی مشاهده و گزارش شده است. ساز و کار بروز اثرات ضد سرطانی در خانواده ی دارویی سولفونامیدی به عوامل متعددی نسبت داده شده است که از آن جمله می توان به مهار آنزیم کربنیک انیدراز غشائی، ممانعت از تشکیل ساختار های میکروتوبولی، مهار چرخه سلولی و مهار رگ زایی اشاره نمود. در این پروژه ی تحقیقاتی داروی سدیم سولفابنزامید با توان کم مهارکنندگی آنزیم کربنیک انیدراز انتخاب گردید تا اثر خالص آن بر فرآیندهای سلولی نظیر القای مرگ سلولی و یا توقف چرخه سلولی در یک رده سلولی سرطان سینه (T-47D) مورد بررسی قرار گیرد. با استفاده از آزمون MTT غلظت بازدارندگی دارو به منظور کاهش ۵۰ درصدی بقاء سلولی در محیط کشت (LC_{50}) پس از ۴۸ ساعت برابر با ۱۰/۸ mM محاسبه و به عنوان شرایط پایه جهت تیمار سلول های سرطانی در انجام تمامی مراحل کاری مورد استفاده قرار گرفت. علائم ریخت شناسی ویژه آپاپتوزیس در کنار نمودارهای دو بعدی حاصل از مطالعات فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلول های آپاپتوزی و نکروزی تفاوت فاحشی را با نمونه کنترل منفی نشان نمی دهد. از سوی دیگر، الگوی شکست نردبانی DNA در سلول های تیمار شده با دارو قابل مشاهده نبود. همچنین نمودارهای فلوسیتومتری مؤید آن بود که داروی سدیم سولفابنزامید قادر به توقف چرخه ی سلولی به میزان نسبتاً مناسبی می باشد. این درحالی بود که افزایش قابل توجهی در سنجش میزان فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در جمعیت سلولی تیمار شده مشاهده می گردید. یافته های فوق نشان می داد که اثر بازدارندگی داروی سدیم سولفابنزامید بر روی رده ی سلولی T-47D می بایست با راه اندازی سایر فرآیندهای سلولی مؤثر بر توان زیستی سلول های سرطانی به غیر از آپاپتوزیس اعمال شده باشد. در این میان طولانی تر شدن مراحل S و G₂/M در قیاس با شاهد منفی (که به معنای توقف چرخه ی سلولی در این مراحل است) می تواند تا حدی نحوه ی اثر گذاری سدیم سولفابنزامید را به روی سلول های T-47D توضیح دهد.

واژه های کلیدی: داروهای سولفونامیدی؛ سدیم سولفابنزامید؛ سرطان سینه؛ آپاپتوزیس؛ چرخه ی سلولی؛ فلوسیتومتری

مقدمه

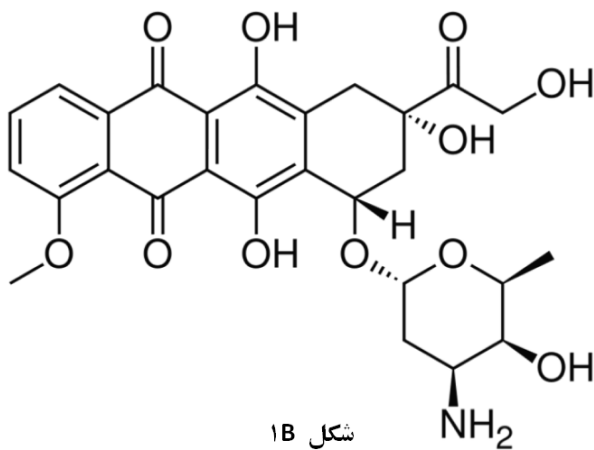
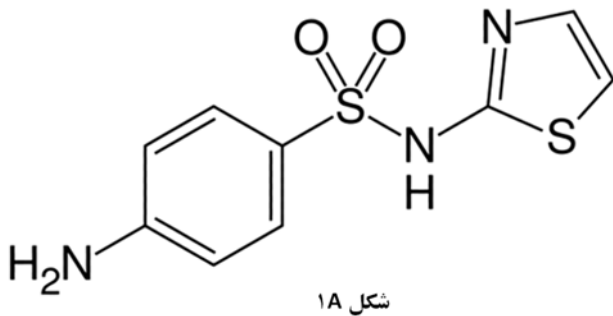
پیشرفت های بدست آمده در مهار، تشخیص اولیه، مدیریت جراحی ها، شیمی و رادیو درمانی سرطان، هنوز هم درمان قطعی بیماران سرطانی به شکل یک آرزو باقی مانده است و نیاز به توسعه ی درمان های موثرتر به شدت احساس می شود.

سولفونامیدها داروهای آنتی باکتریال سنتزی اند که در سال های متعددی در درمانهای بالینی استفاده شده اند و اثرات زیستی مختلفی مانند اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد دیابتی، آدرار آوری و ضد تیروئیدی را دارا می باشند. این طیف گسترده از اثرات دارویی، نشان دهنده این مطلب است که هسته ساختاری در سولفونامیدها از نظر عملکردی توانایی میانکش با اهداف متعددی را در سلول دارد. به عنوان

سرطان سینه یکی از شایع ترین بدخیمی های زنان در سراسر دنیا است و پس از سرطان ریه، با فراوانی ۱۰/۴ درصد بالاترین آمار ابتلاء به سرطان را در جهان به خود اختصاص داده است. اگرچه این بیماری معمولاً در بین زنان بروز می کند ولی در مردان نیز با فراوانی کمتر (حدود ۱ درصد) دیده می شود (Perry 1996). بیشتر تومورهای تشکیل شده در بافت سینه خوش خیم و فاقد قابلیت تهاجم و رشد غیر قابل کنترل می باشند. اما تومورهای تشکیل شده در لوبول ها و مجاری عبور شیر اغلب مهاجم و بد خیم می باشند و به همین دلیل توانایی انتشار به بافت های مجاور را دارا هستند (DeSantis et al. 2007). علی رغم

آرتربت در چند مدل حیوانی مورد آزمایش قرار گرفته و در برخی موارد اثرات فارماکولوژی آنها مشاهده شده است اما به علت سمی بودن و اینکه به طور غیر انتخابی همه ی MMP ها را مهار می کنند هنوز در سطح کلینیکی مورد استفاده قرار نگرفته اند (Supuran *et al.* 2003).

N-N- (۴- آمینوبنزن سولفونیل) بنزامید نام علمی سولفابنزامید از اعضای خانواده ی سولفونامیدهاست که فرمول مولکولی آن $C_{13}H_{12}N_2O_3S$ می باشد (شکل ۱A). وزن مولکولی این دارو برابر با $276/31 \text{ gr/mol}$ و نقطه ی ذوب آن $184-180^\circ \text{C}$ می باشد. حلالیت آن در آب در دمای 20°C معادل $0/3 \text{ gr/L}$ است. این دارو به عنوان یک آنتی بیوتیک از اعضای خانواده ی سولفونامیدها در ترکیب با دو داروی دیگر سولفونامیدی به نام های سولفاتیازول و سولفاستامید به صورت پماد موضعی برای درمان عفونت های خاص واژینال استفاده می شود (Valley & Balmer 1999).



شکل ۱: ساختار مولکولی سولفابنزامید (A)، ساختار مولکولی دوکسوروبیسین (B).

به دنبال کشف و معرفی داروها و مواد شیمی درمانی برای مهار سرطان سینه با منشأ اپیتلیالی، هدف ما این بود که برای اولین بار اثرات شیمی درمانی سولفابنزامید را به روی رده ی سلولی T-47D بررسی کنیم. در مجموع، یافته های ما افق های جدیدی را در مورد سازوکار

مثال سولفونامیدها خاصیت ضد باکتریایی خود را، به عنوان مهار کننده رقابتی پارآمینوبنزوتیک اسید، از طریق دخالت در عملکرد آنزیم های مسیر بیوسنتز فولیک اسید اعمال می کنند. از سوی دیگر، این داروها میزان تولید ادرار را از طریق مهار آنزیم کربنیک انیدراز افزایش می دهند و از این طریق می توانند موجب کاهش عمومی فشار خون و یا کاهش فشار هیدروستاتیک در بافت ها و اندامها گردند (Owa *et al.* 1999; Supuran *et al.* 2001; Supuran *et al.* 2003; Fukuoka *et al.* 2001; Yokoi *et al.* 2002). بیماری هانسن که در گذشته به آن جذام می گفتند یک عفونت باکتریایی است که توسط باکتری میکوباکتریوم لپرا بوجود می آید. درمان با داپسون که یک داروی ضد باکتری متعلق به خانواده ی سولفونامیدها است سریعاً عفونت را متوقف و در نهایت بیماری را ریشه کن می کند (محمدزاده ۱۳۸۰).

سولفونامیدها به عنوان یک آنتی متابولیک با پارآمینوبنزوتیک اسید برای تشکیل فولیک اسید رقابت می کنند. این عمل سولفونامیدها یک سمیت انتخابی را برای اثر به روی سلول های پستانداران و باکتری ها نشان می دهد. همه ی سلول ها برای رشد نیاز به فولیک اسید دارند. فولیک اسید (به عنوان یک ویتامین در مواد غذایی) به درون سلول های انسانی انتشار می یابد اما قابلیت گذار فعال و یا غیرفعال از دیواره ی سلولی باکتری ها را ندارد و از این روست که ساخت آن در باکتری ها می بایست از پارآمینو بنزوتیک اسید صورت پذیرد. تا به امروز بیش از ۱۵۰۰۰ مشتق، آنالوگ و ترکیبات وابسته به سولفونامیدها ساخته شده است. به واسطه همین عملکرد وسیع دارویی است که در سال های اخیر، توجه ویژه ای به کشف داروهای ضد سرطانی مؤثر از این خانواده دارویی شده است (Owa *et al.* 1999; Supuran *et al.* 2001; Supuran *et al.* 2003; Fukuoka *et al.* 2001; Yokoi *et al.* 2002).

دو گروه از خانواده ی سولفونامیدها به نام های N-(۳-کلرو-۷-ایندولیل)-۱،۴-بنزن دی سولفونامید (E7070) و N-(۲-۴-هیدروکسی فنیل) آمینو-۳-پیریدینیل-۴-متوکسی بنزن سولفونامید (E7010) با اثرات ضد توموری گزارش شده اند. گروه جدیدی از ایندول سولفونامیدها نیز گزارش شده که در ساختمان شیمیایی آنها گروه آمینی موجود در حلقه ی پیریدین از داروی E7010 با یک گروه ایندول جایگزین شده است و فعالیت ضد توموری قابل توجهی را از خود نشان می دهد (Supuran *et al.* 2003). گرچه نشان داده شده که E7070 و E7010 پلیمریزاسیون تبولین و تکثیر سلولی را مهار می کنند اما سازوکار ضد تکثیری آن ها واضح نیست. اخیراً مطالعات صورت گرفته مشخص ساخته است که مکانیسم عمل ایندول سولفونامیدها متفاوت از مشتقات بنزوتیل سولفونامیدها (E7010) می باشد (Supuran *et al.* 2003). بعضی از سولفونامیدهای مهارکننده ی ماتریکس متالوپروتئازها (MMPIs sulfonamide) در درمان سرطان و

تهیه محلول دارویی سدیم سولفابنزامید و تیمار سلولی:

با توجه به نتایج حاصل از سنجش MTT میزان LC₅₀ برای داروهای سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین بعد از ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۰/۸mM و 0.337×10^{-3} mM بدست آمد. سپس محلول های دارویی با غلظت های مورد نظر پس از حل کردن مقدار گرم لازم از داروها در محیط کشت ساخته شد و با بهره گیری از فیلترهای ۰/۲۲ سترون گردید. در گام بعد و در شرایط سترون، پس از تخلیه ی محیط کشت قدیمی از فلاسک های سلولی (با پراکنش سلولی ۰/۸۰) تعویض محیط کشت با بهره گیری از محلول های دارویی از پیش ساخته شده (با غلظت های مورد نظر از دارو) و افزودن ۵ میلی لیتر از آن به روی فلاسک های سلولی انجام و پس از گذشت ۴۸ ساعت برداشت سلولی با تخلیه ی محیط کشت و افزودن محلول سترون تریپسین-EDTA (۰/۲۵٪ تریپسین + ۰/۰۱٪ EDTA) صورت گرفت. در زمان برداشت سلولی، سلول ها پس از انکوباسیون در دمای ۳۷°C (حدود ۳ تا ۵ دقیقه) از کف فلاسک جدا و با استفاده از بافر فسفات-سالین، سه بار در دمای ۴°C و در دور ۲۵۰۰rpm مورد شستشو قرار گرفت و سپس به فریزر ۷۰°C- انتقال یافت.

سنجش MTT:

آزمون MTT، آزمونی کمی و رنگی است که اساس آن بر پایه ی احیاء نمک زرد رنگ محلول در آب (۳- [۴-دیمتیل تiazول-۲-ئیل-۲-۵-دیفنیل تترازولیوم برومید؛ MTT) و تشکیل کریستال های آبی رنگ تیره و نامحلول فورمازان در آب می باشد. احیاء MTT، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و تنها در سلول های زنده رخ می دهد (Hughes & Mehmet 2003). بلورهای فورمازان در حلال های آلی چون ایزوپروپانول و DMSO قابل حل می باشند که با سنجش میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر می توان تعداد سلول های زنده را که فعالیت سوخت و سازی دارند تعیین نمود (Denizot 2003; Hughes & Mehmet 1986; Lang &). روش کار به این صورت است که در هر یک از چاهک های یک پلیت ۹۶ خانه ای، ۱۰^۴ سلول را کشت می دهیم و پس از رسیدن به پراکنش سطحی ۰/۸۰٪، محیط رویی را با محیط جدید حاوی غلظت های مختلف دارو جایگزین و سلول ها را برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط کشت نگهداری می کنیم. هر غلظت از دارو در سه چاهک تکرار و از سوی دیگر آزمایش در سه تکرار مجزا برای هر زمان انکوباسیون صورت می گیرد به نحوی که برای هر غلظت دارو حداقل ۹ تکرار موجود باشد. بعد از گذشت زمان مورد نظر، پلیت ها از انکوباتور خارج و به هر چاهک ۲۵µl از محلول ذخیره ی MTT افزوده می گردد تا غلظت نهایی ۴ mg/ml یا ۱۰۰ µg/well بدست آید. سپس پلیت ها مجدداً به انکوباتور

اثرگذاری داروهای سولفونامیدی بر روی این رده ی سلولی، از منظر مولکولی آشکار ساخته است تا به دنبال آن بتوان از این داروها در درمان سرطان هایی مانند سرطان سینه استفاده نمود.

مواد و روشها**مواد**

محیط کشت RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute)، سرم جنین گاوی از شرکت Gibco (انگلستان) و محلول پنسیلین-استرپتومایسین از شرکت Roche (آلمان) خریداری گردید. محلول ۳- [۴-دیمتیل تiazول-۲-ئیل-۲-۵-دیفنیل تترازولیوم برومید (MTT) و محلول تریپسین-EDTA از شرکت سیگما (انگلستان) خریداری شد. کیت های رنگ آمیزی Annexin-V-FLOUS، کیت رنگ آمیزی پروپیدیوم یدید (PI)، کیت سنجش فعالیت کاسپاز-۳، کیت DNA Lddering و کیت ۴،۶-دی آمیدینو-۲-فنیل ایندول (DAPI) همگی از شرکت Roche (آلمان) خریداری شد. دوکسوروبیسین از شرکت Ebewe-Pharma (اتریش) و سولفابنزامید از شرکت سینا دارو تهیه گردید.

دستگاهها

دستگاه ثبت الایزا ساخت شرکت Rayto (چین)؛ میکروسکوپ فلوئورسانس ساخت شرکت Karl Zeiss (آلمان)؛ طیف نور سنج فلوئورسانس مدل MPF-4A ساخت شرکت HITACHI (ژاپن)؛ طیف نورسنج Nanodrop ساخت شرکت Thermo scientific (آمریکا) و دستگاه فلوسیتومتر ساخت شرکت Partec (آمریکا) مجهز به نرم افزار FloMax بوده است.

روشها**رده ی سلولی و محیط کشت سلولی**

T-47D رده ی سلولی با منشأ اپیتلیالی مجاری شیری از بانک سلولی ایران (با کد ATCC 133-HTB) تهیه گردید. سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاو (۱۰٪ حجم/حجم) و محلول پنسیلین/استرپتومایسین (۱٪ حجم/حجم) تحت شرایط کنترل شده ی دما (۳۷°C) و اتمسفر مرطوب حاوی CO₂ (۵٪ حجم/حجم) کشت داده شد. این سلول ها به صورت تک لایه در فلاسک رشد می کنند. محیط کشت هفته ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول ها نیز از محلول سترون تریپسین - EDTA استفاده شد.

در برابر سطح زیر پیک (Area) با استفاده از نرم افزار FloMax صورت گرفت.

بررسی ریخت شناسی سلول های آپتوزی با استفاده از میکروسکوپ فلوروسانس

بررسی حضور فسفاتیدیل سرین در نیم غشاء خارجی سلول ها به عنوان یک ویژگی مهم سلول های آپتوزی به همراه نفوذ پروپیدیوم دیدید به داخل هسته ی سلول های آپتوزی پیر و سلول های نکروزی با بهره گیری از میکروسکوپ فلوروسانس صورت گرفت (Fadok *et al.* 1992). در این روش سلول ها به روی لامل های پوشانده شده با پلی ال-لیزین کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت با تخلیه ی محیط کشت رویی، محیط کشت حاوی دارو (سدیم سولفابنزامید و یا دوکسوروبیسین) افزوده گردید و پس از طی شدن زمان انکوباسیون (۴۸ ساعت) محلول رنگی Annexin V-FITC (۲۰ $\mu\text{g/ml}$) و پروپیدیوم دیدید (۲۰ $\mu\text{g/ml}$) به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی در مجاورت سلول ها قرار گرفت. سپس تصاویر سلولی در درشت نمایی های مختلف در زیر میکروسکوپ فلوروسانس (طول موج تحریکی nm ۴۵۰-۵۰۰ و طول موج ثبتی nm ۵۶۵-۵۱۵) مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش فعالیت کاسپاز-۳

کاسپاز-۳ به دلیل قرارگیری در نقطه تلاقی مسیرهای مختلف القاء آپتوزیس در سلول، جایگاه ویژه ای را در آزمون های تشخیص آپتوزیس پیدا کرده است. فعال شدن این پروتئاز مهم توسط کاسپازهای آغازگر، موجب راه اندازی آبشار مرگ در سلول می گردد. به عنوان مثال، این آنزیم را می توان مسئول ایجاد شکست و در نهایت تخریب ترکیبات متعدد دخیل در تنظیم و ترمیم DNA دانست (Nicholson & Thornberry 1997; Casciola-Rosen *et al.* 1996; Alnemri 1997). به همین دلیل فعالیت کاسپاز-۳ می تواند به عنوان نشانگر مهمی برای ورود سلول ها به مسیر مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی تلقی گردد و در آزمون های سلولی جهت بررسی کمی اثر فعال کننده ها و مهار کننده های مرگ سلولی استفاده گردد. به منظور کمی نمودن میزان فعالیت کاسپاز-۳ در عصاره ی سلول های تیمار شده با دارو، از کیت سنجش فعالیت کاسپاز-۳ استفاده شد. این کیت به صورت Fluorometric Immunosorbent Enzyme Assay (FIENA) طراحی شده است و به همین دلیل با حساسیت بسیار زیاد و بدون تداخل با عملکرد سایر کاسپازها، غلظت کاسپاز-۳ فعال را در عصاره سلولی نشان می دهد. در این کیت از AC-DEVD-AFC به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده شده است که آبکافت آنزیمی پیوند AFC-سوبسترا موجب رهاسازی AFC در آن و افزایش نشر در طول موج

بازگردانده و به مدت سه ساعت در ۳۷ درجه نگهداشته می شوند. در گام بعد، محصول فورمازان تولید شده با افزودن $100 \mu\text{l}$ حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل و میزان رنگ تولیدی توسط دستگاه پلیت خوان (دستگاه الیزا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین می گردد. توان زیستی سلول های تیمار شده با دارو (در هر غلظت از دارو) به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در شاهد منفی (در همان غلظت از دارو) تعیین و در یک منحنی دویعدی (درصد توان زیستی یا بقاء سلول ها در مقابل غلظت دارو) نشان داده می شود. از منحنی بدست آمده می توان LC_{50} را برای دو داروی سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعیین نمود.

سنجش آپتوزیس با بهره گیری از روش فلوسیتومتری

به منظور تعیین تعداد سلول های آپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با دارو (سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین) و قیاس آن با جمعیت سلولی در شاهد منفی، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ Annexin-FITC و پروپیدیوم دیدید (PI) طبق دستور کار کیت انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دویعدی به چهار ناحیه ی Q_1 تا Q_4 صورت گرفت به نحوی که ناحیه ی Q_1 نمایانگر سلول های نکروزی با ویژگی $Annexin-FITC^-$ و PI^+ ؛ ناحیه ی Q_2 نمایانگر سلول های آپتوز شده ی پیر با ویژگی $Annexin-FITC^+$ و PI^+ ؛ ناحیه ی Q_3 نمایانگر سلول های سالم با ویژگی $Annexin-FITC^-$ و PI^- و ناحیه ی Q_4 نمایانگر سلول های آپتوزی جوان با ویژگی $Annexin-FITC^+$ و PI^- می باشد. به منظور تعیین اثرات داروهای بکار رفته در جهت القاء آپتوزیس و یا نکروزیس، درصد سلول های مستقر در هر ناحیه توسط نرم افزار محاسبه و گزارش گردید (LaPensee *et al.* 2009; Guichard *et al.* 2006).

بررسی چرخه ی تقسیم سلولی با بهره گیری از روش فلوسیتومتری

اندازه گیری محتوای DNA سلول ها 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 گردید. سپس نشر فلوروسانس نشانگر بکار رفته پس از برنگیختگی در طول موج nm ۳۵۹ ثبت گردید. ثبت فوتون های نشری در طول موج nm ۴۶۱ و تجزیه و تحلیل داده ها به روی منحنی دویعدی پهنای پیک (Width)

و جمع آوری می کنیم. غلظت DNA با روش جذب خوانی تعیین گردید و بررسی کیفیت آن نیز با انجام الکتروفورز به روی ژل آگارز ۱٪ به مدت ۱/۵ ساعت تحت ولتاژ ۷۵ ولت صورت گرفت. در اینجا از عصاره ی سلول های U937 تیمار شده با غلظت ۴ μg/ml از داروی Camptothecin به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. تیمار این سلول ها با داروی Camptothecin موجب القاء آپتوزیس در حدود ۳۰ درصد می گردد که الگوی نردبانی DNA ی آن به روی ژل آگاروز قابل مشاهده می باشد. سلول ها به صورت پودر لیوفیلیزه همراه با کیت خریداری شد و پس از ذوب شدن کلیه ی مراحل آماده سازی مشابه نمونه های دیگر بر روی آن ها انجام گرفت.

نرم افزارهای رایانه ای و تجزیه و تحلیل های آماری

جهت پردازش داده های فلوسیتومتری برای سنجش آپتوزیس و بررسی چرخه ی سلولی از نرم افزار FloMax استفاده شد. تجزیه و تحلیل های آماری به منظور انجام آزمون آماری ANOVA یک طرفه و مقایسه ی گروه های مختلف با هم در سطح $p < 0.05$ با استفاده از نرم افزارهای SPSS 2007 و Excel 2007 صورت گرفت و نتایج در کل به شکل خطای استاندارد \pm میانگین گزارش گردید.

نتایج

برای تعیین رابطه ی اثر دارو با زمان ، نمونه ها در محدوده ی غلظتی ۰/۰-۲۰ mM برای سدیم سولفابنزامید (شکل ۱A) و ۰/۰-۰/۶ mM برای دوکسوروبیسین (شکل ۱B) در بازه های زمانی ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). نمودار جذب نوری محلول فورمازان در حلال DMSO، نشان دهنده ی کاهش توان حیاتی سلول ها پس از تیمار با دارو در قیاس با نمونه ی شاهد منفی بود. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود غلظت موثر دارو برای کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلول ها (LC_{50}) در ۴۸ ساعت برابر ۱۰/۸ mM برای سدیم سولفابنزامید و ۰/۳۳ μM برای دوکسوروبیسین می باشد (شکل ۲). در سایر مطالعات انجام شده در این مقاله، جهت تشخیص نوع اثر بازدارندگی داروها از این غلظت ها استفاده شده است.

طبق آنچه که در قسمت روش ها گفته شد DNA ی ژنومی سلول های تیمار شده با دارو (سدیم سولفابنزامید ۱۰/۸ mM؛ دوکسوروبیسین ۰/۳۳ μM) و نمونه ی شاهد منفی استخراج و بر روی ژل آگارز مورد تفکیک و رنگ آمیزی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ دیده می شود، الگوی مورد نظر در DNA های استخراج شده از سلول های تیمار شده با سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین مشابه با سلول های نمونه ی شاهد منفی و متفاوت از الگوی شکست نردبانی مشاهده شده در نمونه ی کنترل مثبت کیت

۵۰۵ nm می گردد. میزان رنگ فلئورسنت ایجاد شده بر اثر شکست پروتئولیتیک سوبسترای کاسپاز، نمایانگر غلظت کاسپاز-۳ فعال موجود در عصاره سلولی است (Casciola-Rosen *et al.* 1996). سلول های تیمار شده با دارو با بافر PBS شسته و به مدت ۱ دقیقه به روی یخ در مجاورت بافر لیز سلولی قرار داده شد. پس از انجام سانتریفوژ، بخش روپی جدا و به روی چاهک پوشیده شده با آنتی بادی ضد کاسپاز-۳ انتقال داده شد تا پس از گذشت زمان انکوباسیون و انجام فرآیند شستشو، سوبسترای ویژه ی کاسپاز-۳ (AC-DEVED-AFC) در اختیار مولکول های آنزیمی به دام افتاده در ته چاهک قرار گیرد. انجام فرآیند کاتالیز آنزیمی به روی سوبسترا باعث رهاسازی ماده ی نشرزای AFC می شود که می توان غلظت آن را در واحد زمانی (۱ ساعت) بر اساس منحنی استاندارد AFC مشخص و ملاکی را برای مشخص نمودن فعالیت آنزیمی تعیین نمود. در این راستا، تحریک نمونه ها در طول موج ۴۰۰ nm و ثبت فوتون های نشری در طول موج ۵۰۵ nm صورت گرفت.

بررسی الگوی شکست نردبانی DNA

قطعه قطعه شدن DNA کروماتینی یکی از نشانه های وقوع مرگ سلولی می باشد. در مرگ ناگهانی سلول (نکروزیس) DNA بدون نظم مشخص و به صورت اتفاقی از نقاط مختلف شکسته می شود در حالی که در مراحل انتهایی فرایند آپتوزیس، بر اثر فعال شدن آنزیم های آندونوکلاز درونی (مانند CAD/CPAN/DFF₄₀) به وسیله ی کاسپازها، DNA کروموزومی از نواحی بین نوکلئوزومی بریده و قطعات یک و یا چند نوکلئوزومی ایجاد می گردد. قطعات حاصل پس از تفکیک به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، الگوی مشخص نردبانی ایجاد می نماید که به راحتی از الگوی پیوسته ی DNA در سلول های نکروزی قابل تفکیک است (Nagata 2000; Smith & Fornace 1996; Rosl 1992). پس از اثردهی دارو بر سلول ها به مدت ۴۸ ساعت، جهت استخراج و تخلیص DNA از کیت apoptotic DNA ladder kit استفاده شد. اساس این کیت بر اتصال اختصاصی مولکول های DNA به glass fiber fleece در حضور نمک chaotropic و guanidine-HCL استوار است. پس از شستشوی ناخالصی ها، DNA به کمک بافر نمکی ضعیفی از fleece جدا و جمع آوری می گردد. روش کار طبق دستور کار کیت به این صورت است که تعداد 2×10^6 از سلول های تیمار شده با دارو را فروپاشانده و عصاره حاصل را از فیبرهای شیشه ای مستقر در لوله سانتریفوژ عبور می دهیم. بعد از ۱ دقیقه انجام سانتریفوژ در rpm ۸۰۰۰ و جدا شدن اجزای سلولی از DNA ی متصل به فیبرها، لوله ی سانتریفوژ را چند بار شستشو می دهیم و سپس DNA را به کمک محلول نمکی ضعیف (تریس-HCl، ۱۰ میلی مولار ۸/۵ pH) استخراج

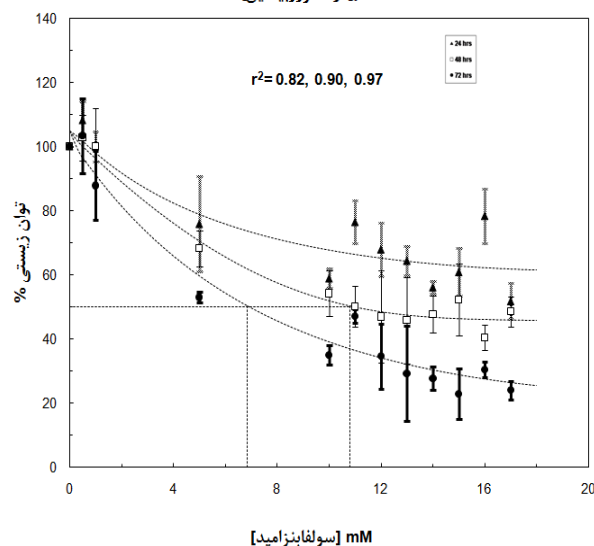
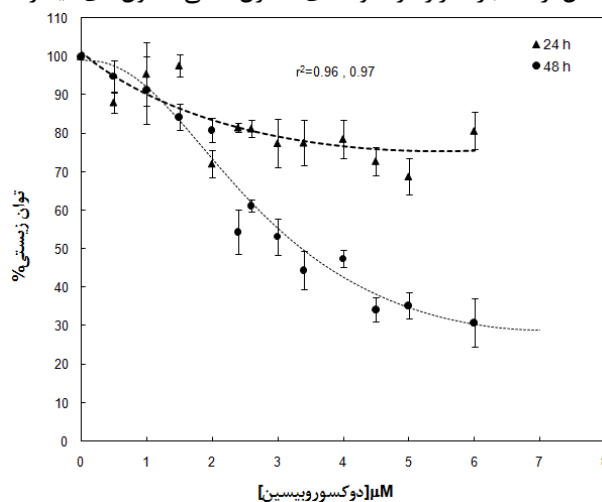
انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت را با نقاط تجربی مربوط به هر نمودار نشان می دهد.

با غلظت ۱۰/۸ mM سدیم سولفابنزامید و سلول های تیمار شده با $0.33 \mu\text{M}$ دوکسوروبیسین به ترتیب برابر با $1.6/6 \pm 1.3/3$ ، $26/2 \pm 1.3/3$ و $38/3 \pm 0.8/5$ بوده است. افزایش نشر مشاهده شده در نمونه های تیمار شده با دارو در قیاس با نمونه ی شاهد منفی به خودی خود نشان دهنده ی افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در زمان مجاورت سلول ها با دو داروی یادشده می باشد. به وسیله ی رسم منحنی استاندارد می توان از روی میزان نشرنمونه ها، 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 بدست آورد (شکل ۴). فعالیت آنزیمی در نمونه ی کنترل منفی $1/31 \pm 0.115 \text{ nM/h}$ در نمونه ی تیمار شده با سولفابنزامید $2/07 \pm 0.08 \text{ nM/h}$ و در نمونه ی تیمار شده با دوکسوروبیسین برابر با $2/45 \pm 0.11 \text{ nM/h}$ محاسبه گردید. افزایش فعالیت کاسپاز-۳ در نمونه های تیمار شده با سولفابنزامید و دوکسوروبیسین به ظاهر نمایانگر وقوع فرآیند آپتوزیس در این نمونه ها در قیاس با شاهد منفی است که از این منظر با نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA مغایرت نشان می دهد. در ارتباط با این تغایر در بخش بحث و نتیجه گیری بیشتر صحبت به میان خواهد رفت ولی در اینجا همان قدر اشاره می شود که افزایش فعالیت کاسپاز-۳ الزاماً با بروز آپتوزیس همراه نیست زیرا که در صورت وجود نقص در مسیر های پایین دست کاسپاز-۳، افزایش فعالیت این آنزیم می تواند الزاماً با بروز آپتوزیس همراه نباشد. بدیهی است که اثبات این موضوع نیازمند بهره گیری از نشانگرهای مولکولی مختلف و نیز استفاده از روشهای تجربی مناسب می باشد.

نتایج حاصل از مشاهده ی سلول ها با میکروسکوپ فلوروسنت نشان داد که در یک جمعیت سلولی استقرار یافته در سطح لام، پس از تیمار دارویی با سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین (به مدت ۴۸ ساعت) و رنگ آمیزی با Annexin-PI، پیدایش ظاهر آپتوزی تنها در مورد تعداد بسیار کمی از سلول ها مشاهده می شود. این موضوع، هم راستا با نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA، مؤید وقوع کم آپتوزیس در بین سلول های تیمار شده با دارو (سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین) در قیاس با شاهد منفی است (شکل ۵). گرد شدگی سلول ها، در نتیجه ی سست شدن اتصالات سلولی همراه با شناسائی فسفاتیدیل سرین های غشائی توسط مولکول های نشان دار شده ی Annexin-FITC، سلول های آپتوز شده را به صورت دایره ای درخشان مشخص می نماید (شکل ۵A). در سلول های آپتوزی پیر (که نفوذ پذیری غشاء و در نتیجه خصوصیات رنگ پذیری هسته در

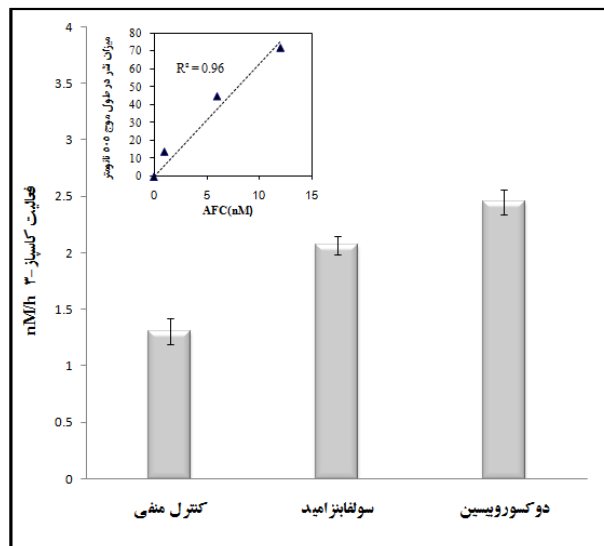
عصاره ی سلولی سلول های U937 تیمار شده با غلظت $4 \mu\text{g/ml}$ از داروی Camptothecin) می باشد که این موضوع مؤید عدم وقوع پدیده ی DNA Laddering (عدم وقوع آپتوزیس) در نمونه های تیمار شده با سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین می باشد.

همانگونه که توضیح داده شد با استفاده از سوبسترای اختصاصی کاسپاز-۳ (AC-DEVED-AFC) و آزاد سازی AFC می توان به میزان فعالیت کاسپاز-۳ پی برد. میانگین میزان نشر فلوروسانس حاصل از سه بار تکرار در نمونه های کنترل منفی، سلول های تیمار شده



شکل ۲: منحنی توان زیستی سلول های T-47D بر حسب افزایش غلظت سدیم سولفابنزامید (A) و دوکسوروبیسین (B). درصد توان زیستی سلول ها در مقایسه با نمونه ی کنترل منفی پس از تیمار با غلظت های مختلف سدیم سولفابنزامید ($0.2-20 \text{ mM}$) و دوکسوروبیسین ($0.06-0.33 \mu\text{M}$) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردیده است. منحنی حاصل نشان دهنده ی اثر بازدارندگی سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین بر روی سلول ها به صورت تابعی از غلظت و زمان می باشد. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از حداقل سه آزمون مستقل با $\pm \text{SD}$ می باشد. ضریب همبستگی (r^2) از چپ به راست به ترتیب میزان همبستگی نمودار نقطه چین مربوط به زمان های

DNA سلول های تیمار شده با سدیم سولفابنزامید (۳) ، شاخص اندازه ی مولکولی (۴) و DNA سلول های انکوبه با Camptothecin به عنوان کنترل مثبت فراهم شده توسط کیت (۵) می باشد. DNA از تعداد 2×10^6 سلول استخراج و مقدار $3-1 \mu\text{g}$ آن به روی آگاروز ۱٪ بارگذاری شده است.



شکل ۴: بافت نگار مربوط به فعالیت کاسپاز-۳. فعالیت آنزیمی در دمای 27°C در عصاره ی سلولی استخراج شده از تعداد 2×10^6 سلول و بر اساس دستور کار کیت انجام و میزان نشر AFC آزاد شده توسط طیف نورسنج فلئورسانس در طول موج برانگیختگی 400 nm و طول موج نشری 505 nm اندازه گیری شده است. فعالیت آنزیمی در نمونه ی کنترل منفی $1.3 \pm 0.1 \text{ nM/h}$ و در $11/31 \pm 0.115$ در نمونه ی تیمار شده با سولفابنزامید $2.1 \pm 0.08 \text{ nM/h}$ و در نمونه ی تیمار شده با دوکسوروبیسین برابر با $2.5 \pm 0.11 \text{ nM/h}$ می باشد. منحنی استاندارد بر اساس نشر (محور y) غلظت های مختلف آزاد برحسب نانومولار (محور x) رسم و به صورت شکل کوچک شده در گوشه ی سمت چپ شکل نشان داده شده است. نمودار میزان نشر AFC آزاد در طول موج برانگیختگی 400 nm و طول موج نشری 505 nm نانومتر رسم شده است.

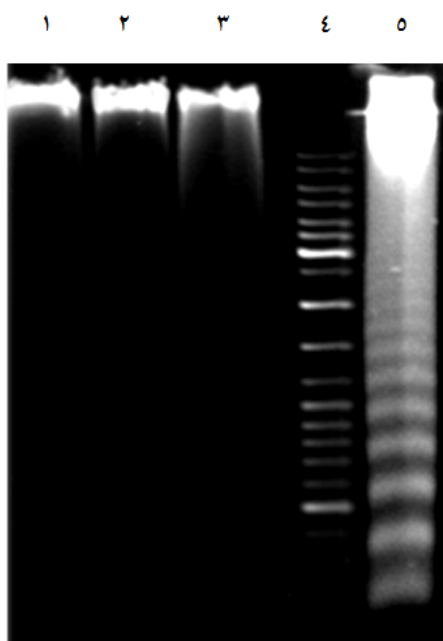
سلول های وارد شده به دستگاه فلوسیتومتر بر اساس اختلاف در میزان نشر رنگ های فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و پروپیدیوم دیدید (PI) که جذب سلول شده اند مورد تفکیک قرار گرفتند. در ابتدا در یک جمعیت سلولی فاقد رنگ تعیین حدود اصلی سلول ها (ناحیه ی R_1) و حذف ذرات نامناسب با استفاده از منحنی دوبعدی (FSC) در برابر (SSC) صورت گرفت.

در اینجا با توجه به نوع نتیجه گیری موجود در اغلب منابع، مجموع درصد سلول های قرار گرفته در نواحی Q_2 و Q_4 به عنوان درصد کل وقوع آپتوزیس (سلول های آپتوز شده ی پیر و جوان) در نظر گرفته شد (LaPensee et al. 2009; Hsu & Yen 2006; Dowejko et al. 2006; Tyagi et al. 2009). در این حالت، سلول های قرار گرفته در

آنها مشابه سلول های نکروزی است) این غشاء درخشان، به دلیل تجمع PI در هسته، با هسته ای مشخص که به رنگ قرمز رنگ آمیزی شده مشاهده می گردد در حالی که در سلول های آپتوزی جوان تجمع هیچ رنگی در هسته مشاهده نمی گردد (شکل ۵A). سلول های نکروزی تنها به علت نفوذ و تجمع PI در هسته و عدم تظاهر فسفاتیدیل های سرین در نیم غشاء خارجی (عدم رنگ پذیری غشاء) به شکل کره هایی قرمز رنگ با قطر کمتر از قطر یک سلول (قطری معادل قطر هسته) قابل مشاهده می باشند (شکل ۵A). در اشکال ۵B و ۵C نشانه هایی از جوانه زنی غشاء و تشکیل اجسام آپتوزی دیده می شود. وجود سلول های زنده در محیط به علت عدم رنگ پذیری با رنگ های فلئورسنت در میدان دید فلئورسنت قابل تشخیص نمی باشد و تنها با استفاده از امکانات فاز کنتراست همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده است قابل رؤیت هستند.

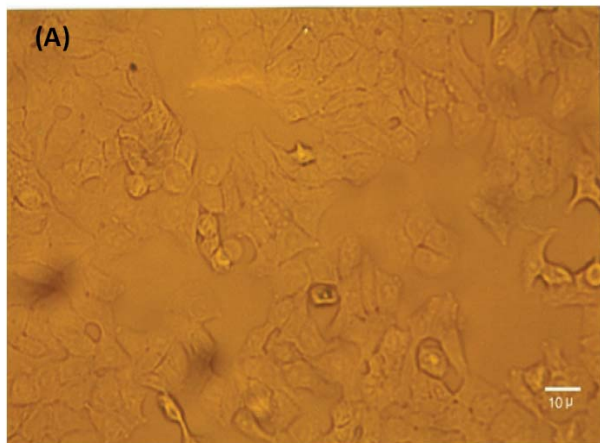
به منظور دستیابی به مقادیر عددی القاء آپتوز و نکروز در نمونه های کنترل منفی (سلول های تیمار نشده)، و سلول های تیمار شده با داروهای سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین، آزمون فلوسیتومتری با نشانگرهای PI و Annexin-FITC انجام گردید.

در نمودار دوبعدی Annexin-FITC در برابر PI محاسبات مورد نظر با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی به روی چهار ناحیه ی اصلی Q_1 تا Q_4 انجام پذیرفت و درصد سلول های سالم، آپتوزی و نکروزی بر اساس آنچه در بخش ۴-۳-۲ بدان اشاره شد مشخص گردید (شکل ۷، ۸ و جدول ۱).



شکل ۳: آشکار سازی الگوی نردبانی شکل تفکیک DNA. ستون ها مشتمل بر DNA شاهد منفی (۱)، DNA سلول های تیمار شده با دوکسوروبیسین (۲)،

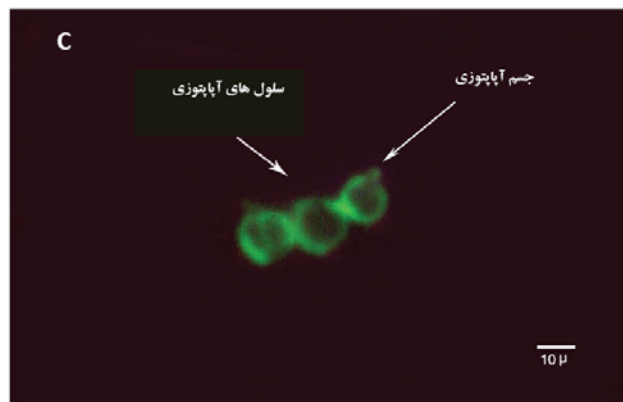
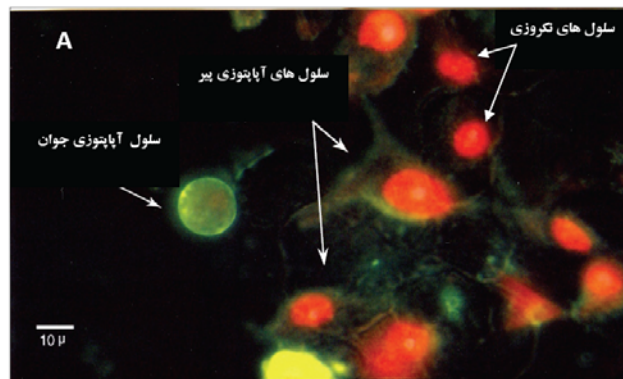
از اتصال مولکول‌های نشان دار Annexin-FITC به غشاء و به دلیل نفوذ پذیر شدن غشاء و تجمع PI در هسته، با هسته ی قرمز پر رنگ مشاهده می شوند (قابل رؤیت شدن هسته در سلول‌های آپاپتوزی پیر نمایانگر نفوذ رنگ به درون هسته و قرمز بودن آنها در تصویر سیاه و سفید می‌باشد) (B). نشانه هایی از جوانه زنی غشاء و تشکیل اجسام آپاپتوزی به عنوان یکی از علائم ریخت شناسی ویژه ی آپاپتوزیس دیده می‌شود (C). بزرگ نمایی همه ی تصاویر X ۲۵ می باشد.



شکل ۴: تصویری از سلول های سالم در حالت فازکنتراست و میدان دید فلوئورسنت. ریخت طبیعی سلول های T-47D در میدان دید فازکنتراست قابل مشاهده است (A). این سلول ها در میدان دید فلوئورسنت به دلیل عدم بهره گیری از رنگ های فلوئورسنت دیده نمی شوند (B). بدیهی است که در زمان رنگ آمیزی سلول ها با رنگهای فلوئورسنت، سلول ها ی آپاپتوزی و نکروزی قابل رؤیت خواهند بود (نگاه شکل ۵).

بدیهی است که در چنین حالتی ناحیه ی Q_4 به تنهایی درصد کل سلول های آپاپتوزی را نشان خواهد داد. اشاره به هر دو روش محاسبه ای فوق از آنجا صورت گرفته است تا مشخص گردد محاسبه ی وقوع آپاپتوزیس و نکروزیس با توجه به هر کدام از دو روش فوق که صورت

نواحی Q_1 و Q_3 به ترتیب، معرف سلول های نکروزی و سالم می باشد. در جدول ۱ به مجموع اعداد نواحی Q_1 و Q_2 نیز اشاره گردیده که در برخی از منابع به عنوان درصد کل وقوع نکروز مورد استناد قرار گرفته است (Davis et al. 2000).

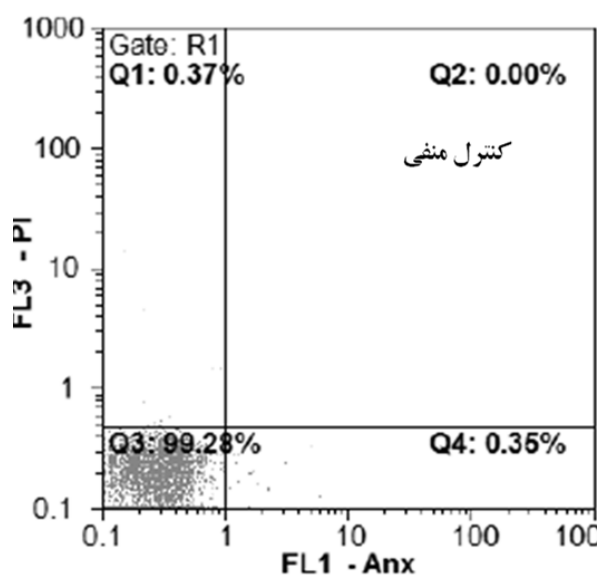
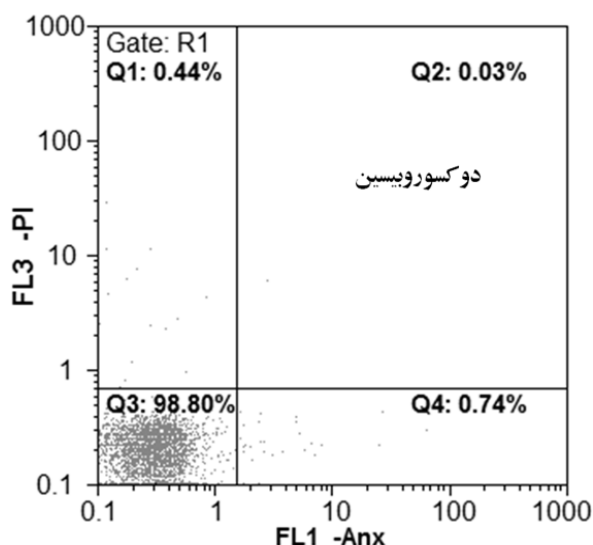


شکل ۵: مشاهده ی ریخت شناسی ویژه ی سلول‌های آپاپتوزی و نکروزی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت پس از رنگ آمیزی همزمان سلول‌ها با Annexin-PI. سلول‌های گرد شده با غشاء سبز درخشان نشان دهنده ی القاء آپاپتوزیس در سلول‌های T-47D در نتیجه ی اثر داروی سولفابنزامید سدیم می باشد (A). در مورد داروی دوکسوروبیسین نیز نتایج مشابهی حاصل گردید که اشکال مربوط به آن نشان داده نشده است. هاله ی سفید رنگ نشان داده شده در اطراف سلول‌ها معرف درخشندگی رنگ سبز در یک تصویر سیاه و سفید است. سلول‌های آپاپتوزی پیر با غشاء درخشان حاصل

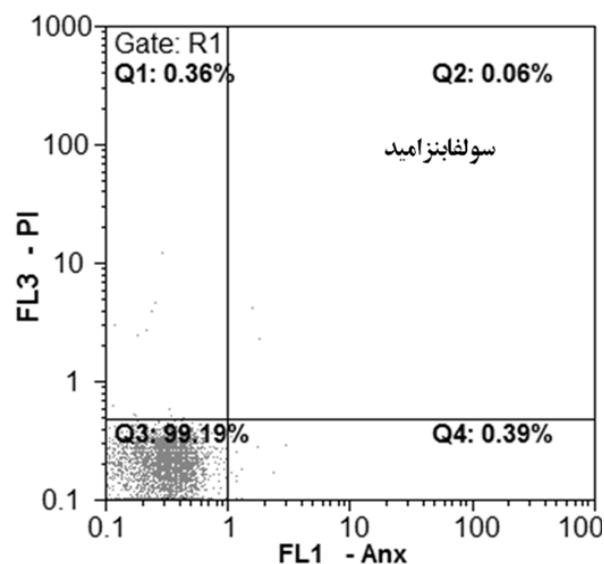
گیرد در حصول این نتیجه که درصد کل وقوع آپاپتوزیس و نکروزیس در زمان تیمار دارویی بسیار کم بوده است تأثیری را نخواهد داشت.

جدول ۱: نتایج عددی آزمون فلوسیتومتری. نتایج برای حداقل دو تکرار آزمایش به شکل خطای معیار \pm درصد میانگین سلول ها گزارش شده است. هر ستون Q_i نشان دهنده ی هر یک از نواحی چهارگانه در نمودارهای آورده شده در شکل ۵ می باشد. ستون های Q_1 و یا Q_1+Q_2 نمایانگر سلول های نکروزی و ستون های Q_4 و یا Q_2+Q_4 نمایانگر درصد کل سلول های آپاپتوز شده بر اساس هر یک از دو روش ذکر شده در بخش نتایج است (نگاه به متن). ستون Q_3 معرف سلول های سالم می باشد. ستون های G_1 ، S و G_2/M نشان دهنده ی درصد سلول های واقع در هر مرحله ی چرخه ی سلولی می باشد. درصد سلول های قرار گرفته در $subG_1$ بسیار اندک و قابل چشم پوشی بوده است. اعداد آورده شده در ستون های Q_i بصورت $100 \times$ (تعداد کل سلول ها/تعداد سلول های هر ناحیه) محاسبه شده است.

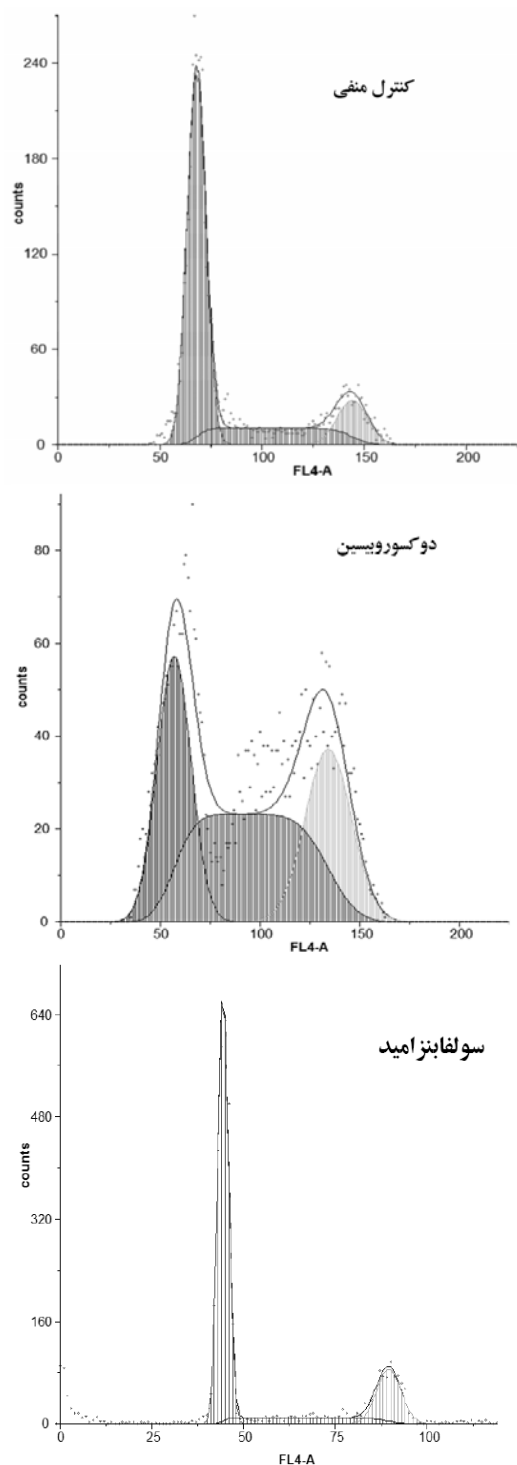
سلول های تیمار شده	Q_3	Q_1	Q_2	Q_4	Q_1+Q_2	Q_2+Q_4	% G_1	%S	% G_2/M
NC	0.72 ± 98.94	0.46 ± 0.90	0.04 ± 0.05	0.09 ± 0.35	0.50 ± 0.96	0.11 ± 0.40	5.79 ± 67.06	4.27 ± 16.39	3.20 ± 16.54
DOX	1.12 ± 97.60	0.68 ± 1.33	0.02 ± 0.15	0.90 ± 1.05	0.67 ± 1.34	0.90 ± 1.06	1.14 ± 3.05	4.65 ± 4.05	3.51 ± 28.86
SU	0.56 ± 98.58	0.19 ± 0.27	0.08 ± 0.09	0.57 ± 0.86	0.11 ± 0.37	0.54 ± 0.96	4.28 ± 48.80	4.39 ± 27.47	3.79 ± 22.70



شکل ۷: نمودار دوبعدی Annexin-FITC علیه PI مربوط به یکی از تکرارهای آزمون فلوسیتومتری. در شکل نمودارهای رسم شده مربوط به یکی از تکرار ها ی شاهد منفی، تیمار شده با داروهای سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین به عنوان نمونه آورده شده است. محدوده ی مربوط به اندازه ی سلول ها (محدوده ی R_1)، از روی نمودار دو بعدی FSC/SSC در نمونه ی سلولی فاقد رنگ و با توجه جمعیت اصلی ذرات ثبت شده تعیین گردیده است. نمودارهای دو بعدی حاصل از مطالعات فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلول های آپاپتوزی (سلول های واقع در ناحیه ی Q_4 و یا مجموع سلول های موجود در نواحی Q_2 و Q_4) و نکروزی (سلول های واقع در ناحیه ی Q_1 و یا مجموع سلول های مستقر در نواحی Q_1 و Q_2) تفاوت فاحشی را با نمونه کنترل منفی (سلول های تیمار نشده) نشان نمی دهد.

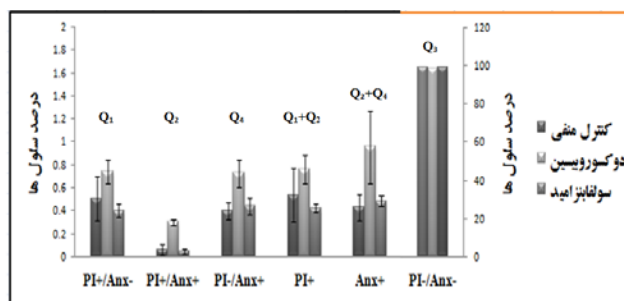


از طرف دیگر روش فلوسیتومتری علاوه بر این که توانایی تعیین نسبت درصد سلول های آپاپتوز شده، نکروز شده و سالم را دارد قادر است به عنوان روشی مناسب برای تعیین جمعیت های سلولی درگیر در مراحل G_0/G_1 ، S و G_2/M نیز مورد استفاده قرار گیرد. بدین منظور از نشانگر



شکل ۹: بررسی اثر سولفابنزامید سدیم و دوکسوروبیسین بر چرخه سلولی در سلول‌های T-47D با بهره‌گیری از روش فلوسیتومتری: در این شکل 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 زنگوله‌ی مشخص شده در شکل، از چپ به راست معرف درصد سلول‌های موجود در فاز G_1 ، S ، و G_2/M می‌باشد.

نشر زای DAPI که توانایی ورود به محیط هسته و اتصال به DNA را دارند استفاده گردید. در ادامه‌ی کار مشخص شد که در نتیجه‌ی تیمار با داروی سدیم سولفابنزامید پراکنش سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی به نسبت نمونه‌ی شاهد تغییرات شدیدی را نداشته (مجموعاً ۱۸٪ جابجایی از G_1 به S و G_2/M) ولی برای دوکسوروبیسین بروز این تغییرات با جابجایی مشخص سلول‌ها از مرحله‌ی G_1 به مرحله‌ی S و G_2/M (مجموعاً ۳۷٪) همراه بوده است که این موضوع قاعدتاً زمانی می‌تواند به وجود آید که مکانیسم‌های گذار سلولی از مرحله‌ی S (و به میزان کمتر از مرحله‌ی G_2/M) به نحوی در زمان انکوباسیون با دوکسوروبیسین دچار اختلال شده باشد (شکل ۹، ۱۰ و جدول ۱). این بدان معناست که اگر گذار از مرحله‌ی S و یا G_2 به ترتیب نیازمند کارکرد درست و به موقع آنزیم‌هایی چون Cdc25A و Cdc25C به عنوان عوامل برداشت‌کننده‌ی فسفات‌های از روی Cdk2 و Cdk1 داشته باشد، بنا براین ایجاد اختلال در کارکرد طبیعی Cdc25A و Cdc25C می‌تواند با تأخیر در برداشت فسفات‌های از روی Cdk2 و Cdk1 همراه گردد. از این یافته‌ها مشخص می‌گردد که در زمان تیمار سلول‌ها با سدیم سولفابنزامید، جابجایی نسبتاً کم سلول‌ها از G_1 به S و G_2/M (حدوداً ۱۸٪) شاید بتواند تاحدی توجیه‌کننده‌ی نحوه‌ی اثرگذاری سدیم سولفابنزامید باشد ولی نمی‌تواند کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلولی را در زمان تیمار با این دارو بطور کامل توجیه نماید. از سوی دیگر توقف مشخص چرخه سلولی در مراحل S و G_2/M (۲۴٪ در S و ۱۳٪ در G_2/M) در سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین می‌تواند دلیل قابل‌پذیرشی را در رابطه با مکانیسم اصلی اثر این دارو در ممانعت از تکثیر سلولی ارائه نماید.

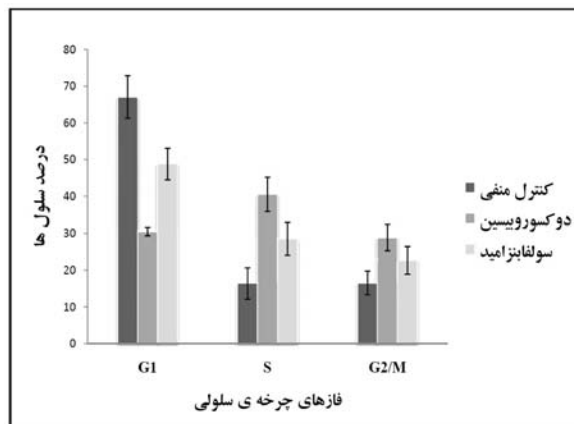


شکل ۸: نمودار ستونی آزمون فلوسیتومتری در رنگ آمیزی Annexin-PI: در این نمودار درصد سلول‌های موجود در نواحی چهارگانه‌ی Q_1 تا Q_4 در نمونه‌های شاهد منفی، تیمار شده با سدیم سولفابنزامید و تیمار شده با دوکسوروبیسین با توجه به روش رنگ آمیزی PI و Annexin نشان داده شده است. همانطور که با رنگ نشان داده شده نمودار عمودی (محور y) سمت راست مربوط به ناحیه‌ی Q_3 (PI^-/Anx^-) است و نمودار عمودی سمت چپ شکل مربوط به سایر نواحی (Q_1 ، Q_2 ، Q_4 ، Q_1+Q_2 و Q_2+Q_4) می‌باشد.

ما در مورد مقاومت ذاتی سلول های T-47D در برابر آپاتوزیس صحیح می بود آنگاه می بایست استنتاج نمود که داروی سدیم سولفابنزامید از طریق دیگری به غیر از آپاتوزیس (مثلاً توقف در چرخه ی سلولی، ممانعت از تشکیل رشته های دوک و یا مهار کربونیک انیدراز غشائی) باعث کاهش ۵۰ درصدی در رشد و تکثیر سلول های تیمار شده (در قیاس با شاهد منفی) شده باشد.

مطالعات انجام شده با بهره گیری از فلوسیتومتری و تصاویر میکروسکوپ فلئورسنت نشان داد که تیمار سلول ها با سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین تأثیر زیادی در القاء آپاتوزیس را در قیاس با شاهد منفی ندارد (اشکال ۵، ۷، ۸ و جدول ۱). این یافته ها در مجموع مؤید یافته های مربوط به الگوی شکست نردبانی DNA بود و از این منظر نشان می داد که فرض ما در مورد مقاومت ذاتی سلول های T-47D درست بوده است و این سلول ها حتی در زمان مجاورت با دارویی همانند دوکسوروبیسین هم توانایی ورود به مسیر آپاتوزیس را ندارند. در مورد افزایش فعالیت کاسپاز-۳ در زمان مجاورت با داروهای سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین (شکل ۴) نیز همانگونه که در بخش نتایج به آن اشاره گردید باید گفت که این افزایش می تواند الزاماً با ورود سلول ها به مسیر آپاتوزیس همراه نباشد. کاسپازهای عمل گر مانند کاسپاز-۳ زمانی می توانند در شرایط سلولی باعث ورود سلول ها به مسیر آپاتوزیس گردند که توانایی اتصال به سوپسترای طبیعی خود (DFF₄₅/iCAD) را به منظور تجزیه و حذف اثر مهاری آن به روی DFF₄₀ (-DNA Fragmentation factor) داشته باشند. بررسی صورت گرفته در این پژوهش نشان داد که فرایند اتصال و کاتالیز آنزیمی کاسپاز-۳ به روی سوپسترای مصنوعی (AC-DEVED-AFC) انجام پذیر است اما در شرایط طبیعی سلول، احتمالاً اتصال بین کاسپاز-۳ و سوپسترای طبیعی آن به دلیل بروز جهش ژنی در DFF₄₅/iCAD بوقوع نمی پیوندد و به همین دلیل است که سلول های T-47D ذاتاً توانایی ورود به مسیر آپاتوزیس را حتی در حضور دوکسوروبیسین ندارند. در این رابطه فرض دیگری را نیز می توان در نظر داشت که آن مربوط به بروز جهش احتمالی در ژن DFF₄₀ است به نحوی که حتی اگر اتصال کاسپاز-۳ با سوپسترای طبیعی خود (DFF₄₅/iCAD) قابل برقراری باشد با این حال با توجه به عدم توانایی DFF₄₀ در کارکرد صحیح، باز هم امکان وقوع آپاتوزیس در سلول وجود نخواهد داشت. با توجه به این توضیحات مشخص می گردد که سازوکار سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین در ممانعت از رشد و تکثیر سلول های سرطانی می بایست از طریق سایر مسیرهای سلولی بجز مسیر آپاتوزیس بوقوع پیوسته باشد.

اثر گذاری داروها به روی چرخه ی تقسیم سلولی دومین گزینه ی مناسب در تعیین سازوکار سدیم سولفابنزامید و دوکسوروبیسین بود



شکل ۱۰: بافت نگار ستونی بررسی چرخه سلولی تکرارهای مختلف آزمون فلوسیتومتری: در این نمودار درصد سلول های موجود در سه فاز چرخه ی سلولی G1, S, G2/M در سه نمونه ی کنترل منفی، دوکسوروبیسین و سولفابنزامید سدیم نشان داده شده است.

بحث

از جمله مهمترین فرایندهای سلولی که در زمان بررسی سازوکار داروهای ضد سرطان مورد توجه قرار می گیرد فرایندهای آپاتوزیس و چرخه ی تقسیم سلولی می باشد. داروهای ضد سرطان بطور معمول با القاء آپاتوزیس و یا توقف در چرخه ی تقسیم سلولی باعث مهار رشد و تکثیر سلولی می گردند. به همین دلیل هم در این پژوهش، جهت تعیین سازوکار اثر داروی سدیم سولفابنزامید به دو فرایند سلولی یادشده توجه گردیده است. همانگونه که می دانیم یکی از مهمترین روشهای بررسی وقوع آپاتوزیس در سلول ها، بررسی الگوی شکست نردبانی DNA می باشد که در صورت مشاهده ی آن می توان وقوع آپاتوزیس را در یک جمعیت سلولی بسیار محتمل دانست. مطالعات ما نشان داد که انکوباسیون سلول های T-47D با داروی سدیم سولفابنزامید، الگوی مشخصی از شکست نردبانی DNA را در قیاس با سلول های تیمار نشده (شاهد منفی) نشان نمی دهد (شکل ۳). این موضوع در زمان انکوباسیون با داروی دوکسوروبیسین نیز علی رغم گزارشهای متعدد در مورد آپاتوتیک بودن این دارو، مصداق عینی پیدا نمود (شکل ۳). در واقع هدف اولیه ی ما از انتخاب دوکسوروبیسین، استفاده از این دارو به عنوان کنترل مثبت (وقوع حتمی آپاتوزیس) بود که عدم مشاهده ی الگوی شکست نردبانی DNA در زمان مجاورت سلول ها با دوکسوروبیسین این انتخاب را انتخابی نه چندان مناسب نشان می داد. اما نکته ی جالب توجه در انتخاب دوکسوروبیسین آن بود که اگر سایر روشهای تشخیصی در بروز آپاتوزیس نیز می توانست نتایج حاصل از الگوی شکست نردبانی DNA را تأیید نماید آنگاه این موضوع که سلول های T-47D احتمالاً به ترتیبی قادرند در برابر وقوع آپاتوزیس مقاومت نمایند، قوت می گرفت. بدیهی است که اگر فرض

می تواند به عنوان مهمترین و اصلی ترین سازوکار اثرگذاری دوکسوروبیسین به روی سلول های T-47D مطرح گردد. در کل، بر اساس یافته های فوق می توان گفت که نحوه ی اثرگذاری سدیم سولفانزامید بر خلاف دوکسوروبیسین توانایی توقف چرخه ی سلولی را در مرحله ی S (و به میزان کمتر در مرحله ی G₂/M) دارد (جدول ۱). نکته ی جالب توجه آن بود که سدیم سولفانزامید بر خلاف دوکسوروبیسین توانایی توقف چرخه ی سلولی را به میزان شدید نداشت (اندکی کاهش از جمعیت سلولی در مرحله ی G₁ و انتقال به مراحل S و G₂/M) و لذا کاهش ۵۰ درصدی تعداد سلول ها در قیاس با شاهد منفی که در غلظت ۱۰/۸ mM و مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت حاصل آمده بود (شکل ۲) می بایست صرفنظر از توقف اندک پدید آمده در چرخه ی تقسیم سلولی (مجموعاً ۱۸٪) از طریق دیگری (به عنوان یک طریق اصلی) اعمال شده باشد. در این راستا، شاید بتوان به تأثیر منفی داروهای ضدسرطان به روی تشکیل رشته های دوک و یا تأثیر سولفونامیدها در ممانعت از فعالیت آنزیم کربونیک انیدراز غشائی تأکید نمود (Chegwidden & Spencer, 1995; Schafer, 1998; Pietenpol & Stewart, 2002). این در حالی است که توقف در چرخه ی سلولی

می تواند به عنوان مهمترین و اصلی ترین سازوکار اثرگذاری دوکسوروبیسین به روی سلول های T-47D مطرح گردد. در کل، بر اساس یافته های فوق می توان گفت که نحوه ی اثرگذاری سدیم سولفانزامید بر خلاف دوکسوروبیسین توانایی توقف چرخه ی سلولی را به میزان کمتر در مرحله ی S (و به میزان کمتر در مرحله ی G₂/M) دارد (جدول ۱). نکته ی جالب توجه آن بود که سدیم سولفانزامید بر خلاف دوکسوروبیسین توانایی توقف چرخه ی سلولی را به میزان شدید نداشت (اندکی کاهش از جمعیت سلولی در مرحله ی G₁ و انتقال به مراحل S و G₂/M) و لذا کاهش ۵۰ درصدی تعداد سلول ها در قیاس با شاهد منفی که در غلظت ۱۰/۸ mM و مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت حاصل آمده بود (شکل ۲) می بایست صرفنظر از توقف اندک پدید آمده در چرخه ی تقسیم سلولی (مجموعاً ۱۸٪) از طریق دیگری (به عنوان یک طریق اصلی) اعمال شده باشد. در این راستا، شاید بتوان به تأثیر منفی داروهای ضدسرطان به روی تشکیل رشته های دوک و یا تأثیر سولفونامیدها در ممانعت از فعالیت آنزیم کربونیک انیدراز غشائی تأکید نمود (Chegwidden & Spencer, 1995; Schafer, 1998; Pietenpol & Stewart, 2002). این در حالی است که توقف در چرخه ی سلولی

تقدیر و تشکر:

اعتبارات این کار توسط حوزه ی پژوهشی دانشگاه تهران، صندوق حمایت از پژوهشگران و دانشگاه آزاد قم فراهم شده است که بدینوسیله مراتب تشکر از آنها اعلام می گردد.

منابع:

محمدزاده ن. ۱۳۸۰: راهنمای دارویی و پزشکی برای خانواده ها، ناشر: دانشگاه هرمزگان، انتشارات مزایر، چاپ دوم.

- Alnemri E.S.1997: Mammalian cell death proteases: A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases, *J. Cell. Biochem.* **64**: 33-42.
- Casciola-Rosen L., Nicholson D.W., Chong T., Rowan K.R., Thornberry N.A., Miller D.K., Rosen A. 1996: Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: A fundamental principle of apoptotic death, *J. Exp. Med.* **183**: 1957-1964.
- Chegwidden WR, Spencer I.M. 1995: Sulfonamide inhibitors of carbonic anhydrase inhibit the growth of human lymphoma cells in culture, *Inflammopharmacology.* **3**: 231-239.
- Davis J.W., Melendez K., Salas V.M., Lauer F.T., Burchiel S.W. 2000: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits growth factor withdrawal-induced apoptosis in the human mammary epithelial cell line, MCF-10A, *carcinogenesis.* **21**: 881-886.
- Denizot, F., Lang, R. 1986: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods.* **89**: 271-277.
- DeSantis C., Siegel R., Jemal A., 2007: *Breast Cancer Facts & Figures*. Publication of American Cancer Society. Atlanta, Georgia.
- Dowjko A., Bauer R.J., Muller-Richter U.D.A., Reichert T.E., 2009: The human homolog of the Drosophila headcase protein slows down cell division of head and neck cancer cells, *Carcinogenesis.* **30**: 1678-1685.
- Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M. 1992: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J. Immunology.* **148**: 2207- 2216.
- Fukuoka K., Usuda J., Iwamoto Y., Fukumoto H., Nakamura T., Yoneda T., Narita N., Saijo N., Kazuto. 2001: 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.* **19**: 219-227.
- Guichard C., Pedruzzi E., Fay M., Marie J.C., Braut-Boucher F., Daniel F., et al. 2006: Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells, *Carcinogenesis.* **27**: 1812-1827.
- Hsu C.L., Yen G.C. 2006: Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity, *Mol. Nutr. Food Res.* **50**: 1072-1079.
- Hughes D., Mehmet H. 2003: *Cell proliferation & Apoptosis: Advanced Methods*. BIOS Scientific Publishers Ltd, UK.
- LaPensee E.W., Schwemberger S.J., LaPensee C.R., Bahassi E., Afton S.E., Ben-Jonathan N. 2009: Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase, *Carcinogenesis.* **30**: 1298-1304.
- Nagata S. 2000: Apoptotic DNA fragmentation, *Exp. Cell Res.* **256**: 12-18.
- Nicholson D.W., Thornberry N.A. 1997: Caspases: killer proteases. *TIBS.* **22**: 299-306.

- Owa T., Yoshino H., Okauchi T., Yoshimatsu K., Ozawa Y., Sugi N.H., Nagasu T., Koyanagi N., Kitoh K. 1999: Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle, *J. Med. Chem.* **42**: 3789-3799.
- Perry M.C. 1996: *The chemotherapy source book*. pp. 25-26, Williams and Wilkins, New York.
- Pietenpol J.A., Stewart Z.A. 2002: Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis, *Toxicology*. **181-182**: 475-481.
- Rosl F. 1992: A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells, *Nucleic Acids Res.* **20**: 5243.
- Schafer K.A. 1998: The cell cycle: a review, *Vet. Pathol.*, **35**: 461-478
- Smith M.L. Fornace A.J.Jr. 1996: Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis, *Mutat. Res.* **340**: 109-124.
- Supuran C.T., Briganti F., Tilli S, Chegwidde W.R., Scozzafava A. 2001: Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamide as antitumor agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **9**: 703-714.
- ^aSupuran C.T. 2003: Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development, *Expert Opin. Investig. Drugs*. **12**: 283-287.
- ^bSupuran C.T., Casini A., Scozzafava A. 2003: Protease Inhibitors of the Sulfonamide Type: Anticancer, Antiinflammatory, and Antiviral Agents, *Medicinal Research Reviews*. **23**: 535-558.
- Tyagi A., Singh R.P., Agarwal C., Agarwal R. 2006: 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*. **27**: 2269-2280.
- Valley A.W., Balmer C.M. 1999: *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. (4th edition) section 16. Oncologic Disorders, McGraw-Hill, Medical Publishing Division.
- Yokoi A., Kuromitsu J., Kawai T., Nagasu T., Sugi N.H., Yoshimatsu K., Yoshino H. 2002: profiling novel sulfonamide antitumor agents with cell-based phenotypic screens and array-based gene expression analysis, *Molecular cancer therapeutics*. **1**: 275-286.