

اثرات سیکلوفسفامید بر تکثیر و بقای سلول‌های رده سرطانی بدخیم HNS و مقایسه آن با سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۶ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

الهام حویزی*

طیبه محمدی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

زمینه و هدف: سرطان از مهمترین عوامل مرگ‌ومیر در دنیا می‌باشد و بنابراین هرگونه مطالعه در زمینه بیولوژی سرطان از اهمیت خاصی برخوردار است. سرطان‌های سروگردن ۵-۲٪ سرطان‌های بدن را در بر می‌گیرند که در برخی کشورها حتی بالاتر است. القای آپوپتوز یکی از مناسب‌ترین درمان‌های سرطان است. سیکلوفسفامید، ماده آلکیله‌کننده‌ای است که باعث توقف تکثیر DNA و در نتیجه توقف تکثیر و بقای سلولی می‌گردد. بنابراین سیکلوفسفامید برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه مقایسه اثر ضد تکثیری سیکلوفسفامید بر بقای سلول‌های HNS و فیبروبلاست‌ها بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در آزمایشگاه سلولی تکوینی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز در بهار ۱۳۹۵ انجام گرفت و سلول‌های HNS و فیبروبلاست‌های جنینی در محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) حاوی ۱۰٪ سرم و پنسیلین/استرپتومایسین در ۳۷ درجه کشت و رقت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر بقای سلول‌ها با روش MTT بررسی شد. رنگ DAPI برای تعیین هسته‌های پیکنوتیک در سلول‌های آپوپتوزی انجام گرفت. فیبروبلاست‌ها بر اساس روش‌های استاندارد از جنین‌های ۱۳ روزه موش‌های نژاد NMRI استخراج شدند. در این مطالعه سلول‌های HNS و فیبروبلاست‌ها به مدت ۷۲ ساعت در معرض سیکلوفسفامید قرار گرفتند.

یافته‌ها: غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر مرگ سلول‌های HNS و فیبروبلاستی اثرگذارند. غلظت ۱ μg/ml بیشترین درصد کاهش حیات سلولی را در روز سوم با میانگین ۵۰٪ و با $P < 0.001$ در بر داشت. به‌طور جالبی سیکلوفسفامید در غلظت‌های پایین‌تر اثرات توکسیک بیشتری در مقایسه با غلظت‌های بالاتر داشت. **نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی سیکلوفسفامید اثرات سیتوتوکسیک پایینی بر سلول‌ها داشته اما به‌طور معناداری اثرات سیتوتوکسیک آن بر سلول‌های HNS بیشتر از فیبروبلاست‌ها بود. این نتایج نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید می‌تواند به‌عنوان عامل ضد سرطان استفاده شود.

کلمات کلیدی: سرطان، سیکلوفسفامید، بقای سلولی، HNS.

* نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۱۰۴۵

E-mail: e.hoveizi@yahoo.com

مقدمه

و مطالعات فراوانی در جهت شناسایی و ارزیابی داروهای مختلف در مورد این بیماری انجام شده است.^۱ سرطان‌های سر و گردن که در دهان، لب، بینی، سینوس‌ها، حنجره و گلو بروز می‌کنند. بیش از ۹۰٪ این سرطان‌ها از نوع کارسینومای سلول سنگفرشی هستند که از اپیتلیوم

یکی از معضلات جامعه بشری در قرن حاضر بیماری سرطان می‌باشد. به‌دلیل آمار بالای مرگ‌ومیر انواع مختلف سرطان، پژوهش‌ها

منشأ می‌گیرند. راه انتشار این سرطان‌ها به صورت کلی از غدد لنفاوی گردن است و بیشتر بدخیم هستند.

همانند سایر سرطان‌ها از سه روش جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی جهت مداوا استفاده می‌شود. چون بیشتر این سرطان‌ها بدخیم هستند و در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند در مجموع پیش‌آگهی بلندمدت بالا نیست. توده‌های خوش‌خیم شامل توده‌های التهابی، توده‌های مادرزادی، توده‌های چربی و غیره می‌باشند. توده‌های بدخیم شامل سرطان‌های مختلف مانند لنفوم، سرطان‌های تیروئید، سرطان‌های غدد بزاقی و غیره هستند. بر اساس آمار در آمریکا سالیانه حدود ۵۵۰۰۰ مورد جدید سرطان سر و گردن تشخیص داده می‌شوند که حدود ۱۳۰۰۰ مورد آن‌ها منجر به مرگ خواهند شد.^۲

هنوز روند کامل فرآیند شکل‌گیری سرطان شناخته شده نیست ولی عوامل گوناگونی هستند که در سطح سلولی اثر می‌کنند و موجب صدمه ژن‌های کنترل‌کننده سلول می‌شوند که برآیند نهایی عملکرد آن‌ها تکثیر خارج از کنترل سلول‌ها است.^۳

امروزه بیماری سرطان در جهان به شدت در حال گسترش است، افزون بر شیوه زندگی، عوامل خطرآفرین ذاتی در عملکرد اندام‌های بدن خودمان نیز وجود دارد. محصولات جانبی سوخت‌وساز بدن و خطاهایی که در طول همانندسازی DNA رخ می‌دهند در سرطان‌زایی دخیل هستند. متابولیسم هواز، محصولات جانبی رادیکال‌های اکسیژن تولید می‌کند که جهش‌زا هستند. چندین بیماری متابولیسی ارثی نیز، محصولات جانبی جهش‌زا تولید می‌کنند.^۴

توجه به مفهوم سلول‌های بنیادی سرطانی در طراحی و آزمایش داروهای جدید سرطان دارای اهمیت است. از آن‌جا که سلول‌های بنیادی سرطانی باعث رشد و مهاجرت تومور می‌شوند، داروهای مورد نیاز است که این جمعیت سلولی کوچک در تومور را هدف قرار می‌دهند. بسیاری از داروهای سنتی موجود، در ابتدا پاسخ‌های امیدوارکننده‌ای نشان می‌دهند که با بازگشت دوباره و عود بیماری همراه هستند، ممکن است بتوانند از بازگشت دوباره بیماری جلوگیری کرده و به طور واقعی سرطان متاستازی شده را درمان کنند. البته بهترین راه حل، یافتن داروهایی است که سلول‌های بنیادی سرطانی را بدون تأثیر بر سلول‌های بنیادی طبیعی همان بافت، هدف قرار می‌دهند.^۵

سیکلوفسفامید یک داروی ضد سرطان است که در بدن به یک متابولیت فعال آلکیل‌کننده تبدیل می‌گردد و یک جز اساسی و مهم در بسیاری از ترکیبات دارویی موثر می‌باشد. سیکلوفسفامید به راحتی از دستگاه گوارش جذب می‌گردد و از سد خونی مغزی عبور کرده و به طور گسترده در بافت‌ها و مایعات بدن توزیع می‌گردد و در کبد به متابولیت‌های فعال تبدیل شده و سرانجام از طریق کلیه‌ها دفع می‌گردد.^۶

سیکلوفسفامید به گروه داروهای سیتوتوکسیک (آلکیل‌کننده) تعلق دارد که تحت تأثیر آنزیم‌های کبدی به متابولیت‌های فعال فسفرآمید موستارد و آکرلین تبدیل می‌شود. فسفرآمید موستارد مسئول خواص ضدسرطانی سیکلوفسفامید است اما آکرولین با تداخل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها و تولید مقدار زیادی رادیکال آزاد اکسیژن دارای خواص موتاژنی است. سیکلوفسفامید دارویی پرمصرف در درمان سرطان است که اولین بار در سال ۱۹۵۸ تولید شد و نمونه اولیه آن اکسازافسفرین بدون عمل آلکیل‌کننده مستقیم بود. آن یک پیش‌دارو از غیرموستاردها است که به تغییرات زیستی نیاز دارد تا به متابولیت‌های فعال تبدیل شود.^۷

مکانیسم اثر این دارو به طور عمده ناشی از ایجاد اتصال بین دو رشته مولکولی DNA و شکستن DNA و نیز RNA و همچنین مهار سنتز پروتئین است. اثرات آنتی‌نوپلاستیکی سیکلوفسفامید مربوط به فسفرآمید موستارد است. درحالی‌که آکرولین از طریق تداخل با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن کرده و مسئول پیدایش اثرات سمی مانند مرگ سلولی، آپوپتوز، تشکیل تومورهای گوناگون و نکروز می‌باشد.^{۸،۹}

دو هدفی که در سنتز داروهای شیمی‌درمانی در نظر می‌گیرند این است که دارو علاوه بر اینکه جنبه سیتوتوکسیکی داشته و سلول‌های سرطانی را از بین ببرد بر سلول‌های سالم فرد بیمار نیز کمترین تأثیر را داشته باشد. یکی از متداول‌ترین داروهایی که به طور گسترده در شیمی‌درمانی استفاده می‌شود سیس‌پلاتین است ولی برای سلول‌های سالم فرد بیمار به ویژه کلیه سمیت ایجاد می‌کند.

کاهش اثرات سمی داروهای شیمیایی بر سلول‌های سالم یکی از اهداف دانشمندان برای سنتز داروهای جدید و جایگزین کردن آن‌ها با داروهای پیشین است تا ضمن حفظ و افزایش اثر سیتوتوکسیتی بر سلول‌های سرطانی، کمترین تأثیر را نیز بر دیگر بخش‌های سالم فرد

رعایت شد. موش‌های باردار را در روز ۱۳ بارداری به طریق نخاعی کشته و جنین‌ها از رحم خارج شد و در یک ظرف حاوی PBS (Sigma, USA) قرار داده شد و سپس کیسه زرده، آمینون و جفت از آن‌ها جدا شد. با استفاده از یک جفت پنس ظریف سر قطع و کبد خارج گردید. تعداد ۸-۵ جنین قطعه‌قطعه شده و با Trypsin/EDTA (Gibco, USA) هضم آنزیمی انجام گرفت. جنین‌ها به همراه آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه درون انکوباتور انکوبه شد. برای شستن تریپسین از بافت، لوله به مدت دو دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه (RPM) ساتریفورژ و محیط رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها به یک فلاسک بزرگ T75 منتقل شد و ۲۰ ml محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم به آن اضافه گردید و فلاسک به انکوباتور منتقل شد. روز بعد تعویض محیط انجام شد تا ضایعات سلولی و قطعاتی که کف ظرف نجسبیده‌اند حذف شوند. به‌طور تقریبی مجموعه‌های سلولی به‌سرعت به فلاسک چسبیده و طی ۲-۳ روز سلول‌های فیروبلاستی بیشتر ظرف را پوشاندند و تا روز سوم، کف ظرف به‌طور کامل پوشیده شد.

میزان بقای سلول‌های کشت‌داده‌شده با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید با استفاده از 2-(2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) 3-(4, 5-di-methylthiazol-۵ mg/ml ارزیابی شد.

در این مطالعه دو گروه سلولی شامل سلول‌های سرطانی HN5 و سلول‌های غیرسرطانی فیروبلاستی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید قرار گرفتند و برای هر گروه سلول‌های بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

تست MTT در روزهای یک، دو و سه پس از قرار دادن سلول‌های سرطانی HN5 و در روز اول پس از قرار دادن سلول‌های فیروبلاستی در معرض غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید انجام شد به‌این‌صورت که در زمان مناسب پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۳۰۰ ml محیط تازه حاوی ۳۰ μl از محلول MTT اضافه شد، پس از سه تا چهار ساعت انکوباسیون با دمای ۳۷ °C محلول MTT خارج و به هر خانه ۲۰۰ μl (Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Merck, USA, 100%) اضافه و سپس جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ با استفاده از دستگاه الیزاریدر خوانده شد.

بیمار گذاشته و روند بهبود را تسریع نماید.^۹

در این پژوهش به بررسی خاصیت ضد سرطانی غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر میزان تکثیر و بقای رده سلولی سرطانی HN5 و مقایسه آن با تاثیر بر سلول‌های غیرسرطانی فیروبلاست جنینی پرداخته شده است.

روش بررسی

این آزمایش به‌صورت تجربی بر روی سلول‌های سرطانی سر و گردن، رده HN5 و سلول‌های غیرسرطانی فیروبلاست‌های جنینی در آزمایشگاه سلولی تکوینی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز در بهار ۱۳۹۵ و با رعایت کامل آیین‌نامه‌های اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. جامعه پژوهش رده سلولی سرطانی HN5 تهیه‌شده از انستیتو پاستور و سلول‌های فیروبلاست‌های جنینی استخراج شده از جنین‌های ۱۳ روزه موش‌های نژاد NMRI بود. متغیرهای مطالعه دوز و زمان مصرف سیکلوفسفامید بود. بر اساس استاندارد برای گروه کنترل و ماده‌ی ارزیابی‌شونده حداقل سه چاهک باید تهیه شود که در پژوهش کنونی از شش چاهک استفاده شد.

سیکلوفسفامید (Endoxan, Baxter, USA) با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ μg/ml در محیط کشت تهیه شد. سپس نمونه‌هایی با غلظت‌های مختلف جهت حذف آلودگی‌های باکتریایی و قارچی با فیلتر ۰/۲۲ μm فیلتر شد و در شرایط دمایی مناسب نگهداری شدند. سلول‌های سرطانی رده سلولی HN5 از موسسه پاستور تهران خریداری شد. سلول‌های HN5 در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) با FBS ۱۰٪ (Gibco, USA) در انکوباتور (Galaxy, USA) حاوی ۵٪ CO2 با ۹۰٪ رطوبت و در دمای ۳۷ °C نگهداری شد. پس از اینکه حدود ۸۰٪ فلاسک پر شد سلول‌ها پاساژ و حدود ۵×۱۰^۴ cells/cm² سلول در ظروف کشت سلول ۲۴ خانه در محیط معمول قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید تیمار و به‌مدت سه روز در این شرایط نگهداری شدند.

در این پژوهش از موش‌های نژاد NMRI به این منظور استفاده شد (خریداری‌شده از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز) و تمامی ملاحظات اخلاقی در ارتباط با کار با حیوانات آزمایشگاهی

متفاوتی شدند به طوری که در غلظت‌های پایین‌تر اثر توکسیک بیشتری مانند چروکیدگی، گرد شدن، قطعه‌قطعه شدن کروماتین، برآمدن غشا و همچنین پررنگ شدن رنگ آبی فلورسنت در مورد سلول‌های آسیب‌دیده رخ داد درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر سیکلوفسفامید اثرات توکسیک کمتری مشاهده شد (شکل ۱).

برای بررسی تأثیر سیتوتوکسیته غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بر سلول‌های HN5 و فیروبلاستی، از روش MTT assay استفاده شد. نمودار ۱ نشان‌دهنده تأثیر سیکلوفسفامید با غلظت‌های مختلف بر رده سلولی سرطانی HN5 در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و مقایسه بین سلول‌های سرطانی HN5 و سلول‌های فیروبلاستی پس از ۲۴ ساعت می‌باشد.

برای کنترل از کشت سلول هم زمانی استفاده شد که هیچ تیماری روی آن صورت نگرفته بود. نتایج نشان داد که سیکلوفسفامید با غلظت‌های بالاتر تأثیر سیتوتوکسیک چشمگیری بر سلول‌ها نداشته اما در غلظت‌های پایین باعث کاهش بقای سلولی در هر سه بازه زمانی شده است. البته در بازه زمانی ۷۲ ساعت کاهش بقای سلولی نسبت به دو زمان دیگر شدیدتر بوده و از نظر آماری معنادار بود. این نتایج نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید در غلظت‌های پایین باعث القای فرآیند آپوپتوز در سلول‌های HN5 و سلول‌های فیروبلاستی می‌شود و همچنین به طور معناداری اثرات سیتوتوکسیک سیکلوفسفامید بر رده سرطانی HN5 بیشتر از رده سلول‌های فیروبلاستی بوده است (جداول ۱ و ۲).

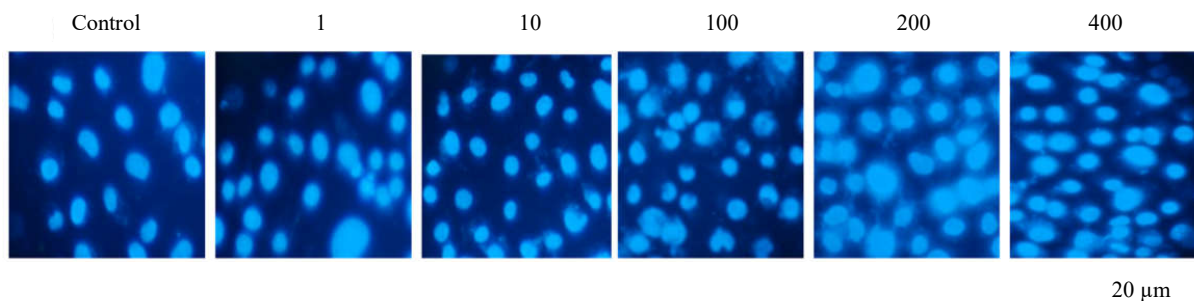
برای بررسی مرگ سلولی، سلول‌های HN5 به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید کشت شدند و سپس محیط رویی سلول‌ها خارج و سلول‌ها با PBS شسته و سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت و با استفاده از رنگ 300 nM, DAPI (Sigma, USA) رنگ‌آمیزی شد.

برای شمارش سلولی در هر روز خاص سلول‌های ۲۰ منطقه (با ابعاد 1 mm²) به صورت اتفاقی انتخاب و شمارش و میانگین سلولی به دست آمد. سلول‌های آپوپتوز شده با مورفولوژی هسته چروکیده، قطعه‌قطعه شده و با شدت فلورسانس بالا به عنوان سلول‌های آپوپتوز شده گزارش شد.

نتایج با استفاده از SPSS software, version 12 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) two-way analysis of variance (ANOVA) به صورت (Mean±SE) مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) انجام و تفاوت‌ها با $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات مورفولوژی سلول‌های HN5 با استفاده از میکروسکوپ نوری و همچنین رنگ‌آمیزی فلئورسنت DAPI بررسی شد. سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید، دچار تغییرات



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ معکوس و رنگ‌آمیزی فلئورسنت با رنگ DAPI برای سلول‌های رده سرطانی HN5 در مواجهه با سیکلوفسفامید با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ μg/ml

جدول ۱: مقایسه میزان بقای سلول‌های HN5 کشت داده شده با استفاده از روش MTT در روزهای ۱، ۲ و ۷ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید

گروه‌های آزمایش (غلظت)	درصد بقا		
	روز ۱ پس از کشت	روز ۲ پس از کشت	روز ۳ پس از کشت
۱ µg/ml	۷۴±۱	۶۷±۲	۴۹±۳
۱۰ µg/ml	۸۲±۲	۷۵±۱	۶۶±۲
۱۰۰ µg/ml	۱۰۰±۳	۹۶±۱	۸۹±۳
۲۰۰ µg/ml	۱۴۲±۴	۱۳۳±۴	۱۰۰±۱
۴۰۰ µg/ml	۱۴۸±۲	۱۴۰±۲	۱۱۰±۲

(Mean±SE)

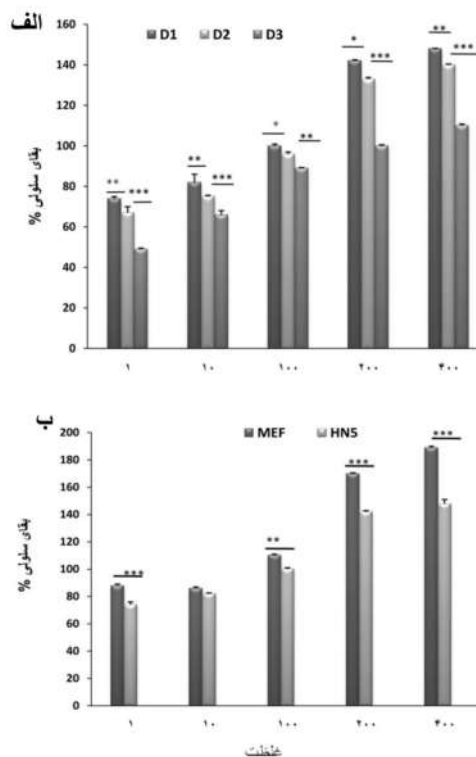
جدول ۲: مقایسه میزان بقای سلول‌های HN5 و سلول‌های فیروبیلاست کشت داده شده با استفاده از روش MTT در روز ۱ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید

گروه‌های آزمایش (غلظت)	درصد بقا روز ۱ پس از کشت	
	سلول‌های HN5	سلول‌های فیروبیلاست
۱ µg/ml	۷۴±۱	۸۸±۲
۱۰ µg/ml	۸۲±۲	۸۶±۲
۱۰۰ µg/ml	۱۰۰±۳	۱۱۰±۱
۲۰۰ µg/ml	۱۴۲±۴	۱۸۰±۱
۴۰۰ µg/ml	۱۴۸±۲	۱۸۹±۲

(Mean±SE)

بررسی اثر آپوپتوزی سیکلوفسفامید به همراه کورکامین بر رده سرطانی سلول‌های سرطانی رکتوم موش پرداختند و اعلام کردند که سیکلوفسفامید دارای خواص ضد سرطانی بوده و سبب القای آپوپتوز در این سلول‌های سرطانی می‌گردد.^{۱۲}

نتایج پژوهش کنونی نشان داد که سیکلوفسفامید اثرات متفاوتی بر سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی دارد. به نظر می‌رسد به دلیل مواجهه سلول‌های سرطانی با تنش‌های مختلف، بین سلول‌های سرطانی و سالم تفاوت اساسی در وضعیت فعال‌سازی کاسپاز، وجود دارد. تفاوت در این است که سلول‌های سرطانی دارای کاسپازهای فعال‌شده‌ای هستند که به واسطه‌ی افزایش بیان *IAP*ها (مهارکننده‌های



نمودار ۱: بررسی بقای سلول‌های HN5 و سلول‌های فیروبیلاستی با روش MTT. الف- نمودار بقای سلول‌های HN5 در مواجهه با سیکلوفسفامید با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/ml در روزهای ۱ (D1)، ۲ (D2) و ۳ (D3) پس از تیمار. ب- نمودار مقایسه بقای سلول‌های HN5 و سلول‌های فیروبیلاستی در مواجهه با سیکلوفسفامید با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/ml پس از ۲۴ ساعت تیمار.

بحث

یافته‌های پژوهش کنونی نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید سبب القای مرگ سلولی می‌گردد. همچنان‌که Zhang و همکاران اشاره کردند که سیکلوفسفامید به همراه برخی تغییرات در مسیرهای متابولیکی گلوکز در سلول‌های سرطانی پستان منجر به افزایش مرگ سلولی در این سلول‌های سرطانی می‌گردد.^{۱۱} افزون بر این Trebunova و همکاران به بررسی اثر هم‌زمان سیکلوفسفامید و چند داروی دیگر بر رده سلول‌های سرطان سینه انسانی (سلول‌های MCF-7) پرداختند و اعلام کردند که سیکلوفسفامید با غلظت معین و به همراه داروهای دیگر به صورت موثری سبب کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های سرطان پستان در انسان می‌گردد.^{۱۱} همچنین Bakirel و همکاران به

سلول‌های سرطانی می‌گردد.^{۱۶} افزون بر این Majzner و همکاران سیکلوفسفامید را به‌عنوان دارویی مناسب بر علیه سلول‌های سرطانی معرفی کردند و اعلام داشتند تزریق این دارو به بیمارانی که تحت سلول درمانی می‌باشند از بروز سرطان در آن‌ها جلوگیری می‌کند.^{۱۷}

همسو با پژوهش کنونی مبنی بر تاثیر آپوپتوزی سیکلوفسفامید بر سلول‌های غیرسرطانی Kemp و همکاران اثرات منفی سیکلوفسفامید را روی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان انسان گزارش کردند. آن‌ها همچنین بیان کردند که سیکلوفسفامید مهاجرت و جمعیت سلول‌های بنیادی خونساز در مغز استخوان را دستخوش تغییر می‌کند. البته آن‌ها اثر سیکلوفسفامید بر این سلول‌ها را با اثر آن بر سلول‌های غیرسرطانی مقایسه نکردند.^{۱۸} بنابراین سیکلوفسفامید به‌صورت وابسته به غلظت می‌تواند به‌عنوان یک داروی ضد سرطانی در از بین بردن و القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی در سرطان سر و گردن مفید واقع شود و با توجه به این‌که در سلول‌های غیرسرطانی اثرات توکسیک کمتری دارد پس اثرات مضر جانبی کمتری متوجه بیمار خواهد شد. البته به‌منظور تکمیل نتایج به‌دست‌آمده، مطالعه بر روی تعداد بیشتری از رده‌های سلولی سرطانی و غیرسرطانی و غلظت‌های متنوع‌تر پیشنهاد می‌گردد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، سیکلوفسفامید با غلظت ۱ $\mu\text{g/ml}$ نسبت به سایر غلظت‌ها تا حدودی فعالیت سایتوتوکسیک بیشتری روی رده سلول سرطانی HN5 و سلول‌های فیروبلاستی نشان داد و همچنین به‌طور معناداری اثرات سایتوتوکسیک سیکلوفسفامید بر رده سرطانی HN5 بیشتر از رده سلول‌های فیروبلاستی بوده است. سپاسگزاری: این مطالعه حاصل فعالیت پژوهشی نویسندگان در بخش سلولی تکوینی گروه زیست‌شناسی می‌باشد که با حمایت دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است.

آپوپتوزی، مهار می‌گردند اما سلول‌های سالم نیازمند شکست پروتئولیتیکی پیش کاسپازهای کاملاً غیرفعال هستند. بنابراین، سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم، در راه‌اندازی پاسخ آپوپتوزی در مرحله‌ی جلوتری قرار دارند. در حمایت از این مطلب کاسپاز سه پردازش شده در سلول‌های توموری شناسایی شده است. در فرآیند آپوپتوز در سلول‌های طبیعی دروزوفیلا، کاسپازهای فعال‌شده توسط IAP ها مهار شده و القای آپوپتوز، نیازمند رهایی از مهار IAP است. سلول‌های توموری در این ویژگی با سلول‌های طبیعی دروزوفیلا، وجه مشترک دارند. به‌عبارت دیگر پیام‌های آپوپتوزی، پردازش پیش کاسپازها را در سلول‌های سالم تحریک می‌کنند، درحالی‌که پیام‌های آپوپتوزی در سلول سرطانی، توقف اثر مهار IAP بر کاسپازهای پردازش‌شده را فعال می‌کنند.^{۱۴،۱۳}

در پژوهش کنونی بررسی هسته با رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که سیکلوفسفامید به‌واسطه ایجاد آسیب در کروماتین سبب ایجاد آپوپتوز می‌گردد همچنان که مطالعات پیشین نیز تاییدکننده این مهم می‌باشند. به‌طوری‌که Tsai-turton و همکاران در مطالعه‌ای اعلام کردند که سیکلوفسفامید افزون بر آسیب DNA سلول، باعث القای استرس اکسیداتیو نیز می‌شود، سیکلوفسفامید باعث تخلیه گلوکاتایون در سلول‌های توموری گرانولوزای انسان می‌شود که منجر به مرگ آپوپتیک این سلول‌ها می‌گردد.^{۱۵}

همچنین Chakraborty و همکاران اعلام کردند که سیکلوفسفامید به‌همراه سایر داروها می‌تواند با ایجاد آسیب در DNA سلول‌های سرطانی سبب القای مرگ این سلول‌ها گردد و پیشنهاد کردند این عامل احتمالاً به‌واسطه القای استرس اکسیداتیو می‌باشد که سبب آزادسازی ROS و فعالیت P53 که با افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 سبب آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری می‌گردد. در نهایت تولید کاسپاز سه به‌همراه سایر عوامل سبب القای آپوپتوز در این

References

1. Rundberg Nilsson A, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and murine hematopoietic stem cell aging is associated with functional impairments and intrinsic megakaryocytic/erythroid bias. *PLoS One* 2016;11(7):e0158369.
2. Welsh L, Panek R, Riddell A, Wong K, Leach MO, Tavassoli M, et al. Blood transfusion during radical chemo-radiotherapy does not reduce tumour hypoxia in squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* 2017;116(1):28-35.
3. Wang VE, Grandis JR, Ko AH. New Strategies in Esophageal Carcinoma: Translational Insights from Signaling Pathways and Immune Checkpoints. *Clin Cancer Res* 2016;22(17):4283-90.
4. Wu C, Zhang J, Liu T, Jiao G, Li C, Hu B. Astaxanthin inhibits proliferation and promotes apoptosis of A549 lung cancer cells via blocking JAK1/STAT3 pathway. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2016;32(6):784-8.

5. Ganz PA. Survivorship: adult cancer survivors. *Prim Care* 2009;36(4):721-41.
6. Janelsins MC, Heckler CE, Thompson BD, Gross RA, Opanashuk LA, Cory-Slechta DA. A clinically relevant dose of cyclophosphamide chemotherapy impairs memory performance on the delayed spatial alternation task that is sustained over time as mice age. *Neurotoxicology* 2016;56:287-293.
7. Mauro FR, Carella AM, Molica S, Paoloni F, Liberati AM, Zaja F, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and lenalidomide in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. A multicenter phase I-II GIMEMA trial. *Leuk Lymphoma* 2016:1-8.
8. Hill BT, Rybicki L, Carlstrom KD, Jagadeesh D, Gerds A, Hamilton B, et al. Daily weight-based busulfan with cyclophosphamide and etoposide produces comparable outcomes to four-times-daily busulfan dosing for lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(9):1588-95.
9. Oka N, Soeda A, Noda S, Iwama T. Brain tumor stem cells from an adenoid glioblastoma multiforme. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2009;49(4):146-50; discussion 150-1.
10. Zhang F, Aft RL. Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells. *J Cancer Res Ther* 2009;5 Suppl 1:S41-3.
11. Trebunova M, Laputkova G, Slaba E, Lacjakova K, Verebova A. Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 2012;32(7):2849-54.
12. Bakirel T, Alkan FÜ, Üstüner O, Çınar S, Yildirim F, Erten G, et al. Synergistic growth inhibitory effect of deracoxib with doxorubicin against a canine mammary tumor cell line, CMT-U27. *J Vet Med Sci* 2016;78(4):657-68.
13. Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(3):483-93.
14. Kim S, Lee JH, Kang I, Hyun S, Yu J, Shin C. An amphiphilic peptide induces apoptosis through the miR29b-p53 pathway in cancer cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016;5(7):e330.
15. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol Sci* 2007;98(1):216-30.
16. Chakraborty A, Kumar P, Ghosh K, Roy P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur J Pharmacol* 2010;647(1-3):1-12.
17. Majzner RG, Mogri H, Varadhan R, Brown P, Cooke KR1, Bolaños-Meade J, et al. Post-transplantation cyclophosphamide after bone marrow transplantation is not associated with an increased risk of donor-derived malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017:S1083-8791(17)30065-4.
18. Kemp K, Morse R, Sanders K, Hows J, Donaldson C. Alkylating chemotherapeutic agents cyclophosphamide and melphalan cause functional injury to human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* 2011;90(7):777-89.

Effects of cyclophosphamide on proliferation and viability of malignant HN5 cell line and comparing with embryonic fibroblast cells

Elham Hoveizi Ph.D.*
Tayebeh Mohammadi Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Tel: +98 61 33331045
E-mail: e.hoveizi@yahoo.com

Abstract

Received: 06 Sep. 2016 Revised: 07 Feb. 2017 Accepted: 17 Feb. 2017 Available online: 18 Feb. 2017

Background: One of the major causes of death in the world is cancer and therefore any study in the field of cancer biology is of great importance. Head and neck cancers represent approximately 2-5% of neoplasms which is higher in some countries. The most appropriate therapy for various cancers is identifying effective and efficient ways that contribute to initiation of apoptosis. Cyclophosphamide is an alkylating agent that stops the replication of DNA and then, it stops the cell proliferation and viability. Therefore, cyclophosphamide is used to treat various types of cancer. In this study we evaluate the cytotoxic effects of cyclophosphamide on viability of (head and neck cancer cells) HN5 cell line and compare it with fibroblast cells as noncancerous cells.

Methods: This experimental study was done in cell and developmental laboratory in faculty of science, Shahid Chamran University of Ahvaz in Spring of 2016. HN5 cell line and embryonic fibroblast cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) at 37 °C, then the effects of different concentrations of cyclophosphamide on cell viability was evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was performed to determine the proportion of apoptotic cells by manually counting pyknotic nuclei. According to standard procedures from day 13 embryos of outbred strains naval medical research institute (NMRI), fibroblast cells were isolated. In this study HN5 cell line and fibroblasts were exposed to cytostatics for 72 hours.

Results: Various concentrations of cyclophosphamide were effective in cytotoxicity of HN5 cancer and fibroblast cells. A significant cytotoxicity was observed with the examined concentration of 1 µg/ml of cyclophosphamide with 50% in 3th day and $P < 0.001$. Interestingly, at low concentrations, cyclophosphamide was more toxic than at higher concentrations.

Conclusion: Totally cyclophosphamide had low toxicity effects on both of the cell lines but the toxicity effects of cyclophosphamide on HN5 were significantly greater than fibroblast cells. These results indicate that cyclophosphamide can be a potential anticancer agent.

Keywords: cancer, cell viability, cyclophosphamide, HN5.