

بررسی اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزیسی داروی اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ توسط روش Real Time PCR

بهنام یونسی، M.Sc. Student^۱، امیر میرزایی، Ph.D.^{۲*}، الهه علی عسگری، Ph.D.^۱

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: A.mirzaie@riau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۹

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین بر رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ابتدا سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی HT29 با استفاده از روش MTT در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد و غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50) آن تعیین شد. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت IC50، RNA سلول‌ها استخراج شده و به cDNA تبدیل شد و میزان بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ نسبت به ژن مرجع β -actin با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد.

نتایج: تیمار سلول‌ها در غلظت‌های مختلف نشان داد که داروی اگزالی پلاتین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشترین اثر سمیت سلولی را دارد که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد و میزان IC50 $6 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. همچنین، نسبت بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ به ژن مرجع در رده سلولی HT29 تیمار شده با اگزالی پلاتین به ترتیب به میزان $(p < 0/001)$ $2/69 \pm 0/72$ و $(p < 0/001)$ $3/26 \pm 0/56$ افزایش یافت.

نتیجه گیری: با توجه به سمیت سلولی و القای فرایند آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان کولون توسط داروی اگزالی پلاتین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که داروی اگزالی پلاتین گزینه مناسب جهت درمان سرطان کولون می‌باشد.

واژگان کلیدی: اگزالی پلاتین، سرطان کولون، سمیت سلولی، آپوپتوزیس

مقدمه

سرطان یک بیماری پیچیده است که توسط تکثیر سلولی کنترل نشده و فرار سلول‌ها از سیستم ایمنی ایجاد می‌شود و سبب هموار کردن راه‌های تهاجم سلولی و متاستاز می‌شود. سرطان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در همه جهان است و از هر ۴ مورد مرگ، ۱ مورد مربوط به سرطان است (۱). سرطان روده بزرگ یا سرطان کولون سومین سرطان شایع در دنیا می‌باشد، به طوری که در ایالات متحده درصد بالایی از مرگ و میر را به خود اختصاص داده است. بر طبق آمار سازمان بهداشت جهانی سرطان کولون سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان رایج در زنان در سال ۲۰۱۶ بوده است (۲). میزان زنده ماندن افراد دارای متاستاز سرطان کولون به مدت ۵ سال است، به طوری که این بیماران به داروهای ضدسرطان نیز مقاومت پیدا می‌کنند (۳). در سال‌های اخیر به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیو درمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود (۴). انتخاب نوع روش درمانی براساس مرحله بندی بیماری انجام می‌شود و جراحی درمان قطعی در مراحل اولیه بیماری می‌باشد. امروزه از روش‌های شیمی درمانی و گاه رادیوتراپی در مراحل خاصی از بیماری سرطان کولون استفاده می‌شود (۵). در خصوص نوع رژیم درمانی و داروهای مصرفی و نیز زمان استفاده از آن تحقیقات مختلفی در مراکز جراحی سرطان در سرتاسر دنیا در حال انجام است (۶). داروی اگزالی پلاتین داروی نسل سوم پلاتینوم ضدسرطان است که جهت درمان سرطان کولون پیشرفته استفاده می‌شود. اگزالی پلاتین با از بین بردن سلول‌های سرطانی و کند کردن رشد تومور عمل می‌کند اما مکانیسم دقیق مرگ سلول‌های سرطانی به طور کامل مشخص نیست (۷). برخی مطالعات نشان می‌دهد که اگزالی پلاتین تحت واکنش‌های غیرآنزیمی در محلول‌های فیزیولوژیک از

طریق لیگاند اگزالات ناپایدار به مشتقات فعال تبدیل می‌شود. چندین گونه ناپایدار شامل Monoaquo و diaquo DACH پلاتینوم با پیوند کووالانسی به ماکرومولکول‌ها متصل می‌شوند و سبب مرگ سلول‌ها می‌شوند (۸). همچنین این دارو پیوند متقاطع داخل زنجیره‌ای و بین زنجیره‌ای با DNA تشکیل می‌دهند. پیوندها بین موقعیت N7 و دو گوانین مجاور (GG)، آدنین-گوانین مجاور (AG) و گوانین‌های جدا شده توسط نوکلئوتید (GNG) تشکیل می‌شود. این پیوندها باعث مهار تقسیم و رونویسی DNA می‌شوند. اگزالی پلاتین به طور انتخابی مانع سنتز دئوکسی ریبونوکلئوتید اسید (DNA) می‌شود، به طوری که مقدار گوانین و سیتوزین بستگی به مقدار اگزالی پلاتین تجویزی دارد (۹).

مطالعات نشان می‌دهد که یکی از مکانیسم‌هایی که داروی اگزالی پلاتین رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ را مهار می‌کند، آپوپتوزیس است. آپوپتوزیس مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستازی بافتی ضروری است. آپوپتوزیس در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنش‌گر نقش دارد (۱۰). هرگونه اختلال در روند آپوپتوزیس، منجر به بیماری می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌شود (۱۱). به طور معمول داروهای شیمی‌درمانی سبب القای آپوپتوزیس و تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شوند. آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است و در طی تحریکات خاصی اتفاق می‌افتد، در حالی که نکروز مرگ پاتولوژیک سلول بوده و در طی آسیب‌های شدید به سلول از قبیل هیپوکسی و هیپرترمی این نوع مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. در فرایند آپوپتوزیس سلول چروکیده و کوچک می‌شود در حالی که در نکروز سلول متورم و بزرگ

شرایط CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شد. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر ایلیزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب}$

$\text{نوری سلول‌های تیمار شده}) = \text{میزان بقای سلولی}$
هم‌چنین میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های HT29 تیمار شده با داروی اگزالی پلاتین با استفاده از روش Real Time PCR کمی نسبی (qRT-PCR) سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول‌های تیمار شده و نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (کیژن، آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت آن به وسیله دستگاه فتونانومتر (IMPLEN GmbH، آلمان) اندازه‌گیری شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل با کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، لیتوانی) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگو dT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) (Fermentas، لیتوانی) بود. برنامه دمایی - زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰

می‌شود. ارگانل‌های سیتوپلاسمی در فرایند آپوپتوزیس دست نخورده باقی می‌مانند در حالی که در نکرورز تخریب می‌شوند (۱۲).

گسترش روز افزون سرطان کولون و مشکلات فراوان ناشی از آن از یک سو و عدم موفقیت کافی روش‌های درمانی رایج و سنتی در مبارزه اختصاصی با آن موجب توجه ویژه محققین نسبت به روش‌های درمانی هدفمند گشته است (۱۳). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

داروی اگزالی پلاتین و کشت سلول

داروی اگزالی پلاتین (Eloxatin®; Sanofi, France) با مشخصات وزن مولی $397/2858 \text{ g/mol}$ با فرمول شیمیایی $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ تهیه شد. هم‌چنین، رده سلولی سرطان کولون (HT29 cell line) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد NCBI C135 خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (Biosera, USA) غنی شده با ۱ (v/v) پنی‌سیلین - استرپتومايسين و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum:) (FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد رطوبت قرار داده شدند.

بررسی سمیت سلولی

به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی داروی اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی HT29 از روش رنگ سنجی MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی HT29 تیمار شد. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Microculture Tetrazolium Test) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت

(4mg/mL) اضافه شد و سپس در دور g 18000 در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی را جمع آوری کرده و به آن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد و مجدداً در دور g 18000 به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و رسب حاصله با ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. رسوب حاصل را در دمای اتاق خشک کرده و در ۲۰۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA 10mM حل گردید. به دنبال آن DNA حاصله در ژل آگارز ۲ درصد در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و با دستگاه Gel document مشاهده شد.

آنالیز آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. اطلاعات به صورت $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ (SD) نمایش داده شده و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تیمار سلول های HT29 با داروی اگزالی پلاتین در مدت زمان ۲۴ ساعت

تیمار سلول های HT29 با غلظت‌های مختلف $0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 \mu\text{g/ml}$ اگزالی پلاتین با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد که داروی اگزالی پلاتین در غلظت‌های $100 \mu\text{g/ml}$ بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته اند که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p < 0.001$). میزان IC50 برای داروی اگزالی پلاتین در مدت زمان ۲۴ ساعت $6 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. بر اساس تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه گروه‌های تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفته است. نتایج حاصل از

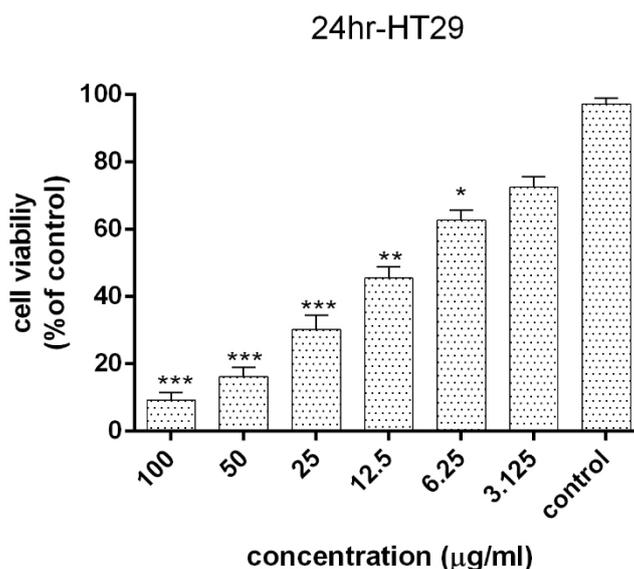
دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف کاسپاز ۳ و ۹ بوده و ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف کاسپاز ۳ به صورت- 5'- ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC 3'- جلویی، دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد و برگشتی، دمای ۶۵/۳ درجه سانتی‌گراد بود. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف کاسپاز ۹ به صورت- 5'-

3'- GGCGGAGCTCATGATGTCTGTG 3'- جلویی، دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد و 5'- TTCCGGTGTGCCATCTCCATCA 3'- برگشتی، دمای ۶۶/۳ درجه سانتی‌گراد و برای ژن مرجع β -actin به صورت- 5'- 3'- TCCTCCTGAGCGCAAGTAC 3'- جلویی، دمای ۶۶/۹ درجه سانتی‌گراد و 5'- 3'- CCTGCTTGCTGATCCACATCT 3'- برگشتی، دمای ۶۳/۴ درجه سانتی‌گراد است. در نهایت واکنش Light cycler Real Time PCR با استفاده از دستگاه (Bioneer، کره) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه انجام گرفت.

بررسی قطعه قطعه شدن DNA

جهت بررسی آزمون قطعه قطعه شدن DNA که نشان دهنده آپوپتوزیس است، ابتدا سلول‌های سرطانی HT29 با غلظت IC50 داروی اگزالی پلاتین تیمار شدند و پس از ۲۴ ساعت با محلول PBS سلول‌ها شستشو داده شدند و سپس تریپسینه شدند. سوسپانسیون سلولی را در g 400 سانتریفیوژ کرده و به رسوب حاصله ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (400mM NaCl, 100mM EDAT, 10mM Tris-Hcl) و ۱۰ میکرولیتر محلول RNAase

بقای سلول‌ها در مدت زمان ۲۴ ساعت در شکل ۱ نشان داده شده است.



HT29 در برابر غلظت‌های

شکل ۱: درصد بقای سلول‌های

مختلف داروی اگزالی پلاتین در مدت زمان ۲۴ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (*: $p < 0.05$ ،

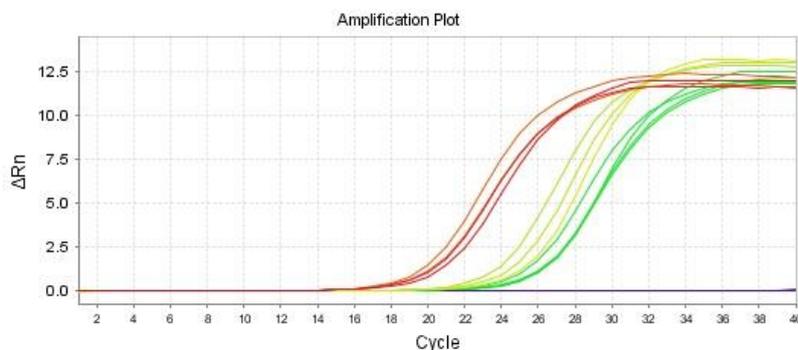
***: $p < 0.001$ ، **: $p < 0.01$ ، n=3).

استفاده از منحنی ذوب تعیین شد، به طوری که رنگ سبز متعلق به ژن بتا-اکتین، رنگ زرد متعلق به ژن کاسپاز ۳ و رنگ قرمز متعلق به ژن کاسپاز ۹ می باشد (شکل ۲ و ۳).

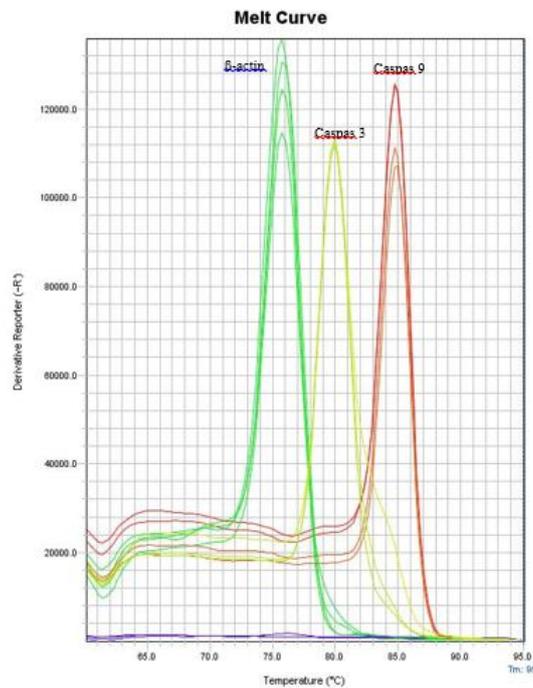
پروفایل (*mRNA*) بیان ژن‌های مورد مطالعه در

سلول‌های HT29 تیمار شده با داروی اگزالی پلاتین

آنالیز تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ در سلول HT29 تیمار شده با غلظت ۵۰ درصد (IC_{50}) بعد از ۲۴ ساعت با روش Real Time PCR انجام شد. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با



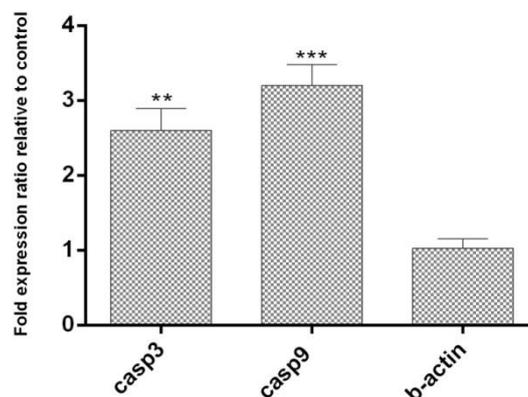
شکل ۲: نمودار حاصل از تکثیر ژن‌های β -actin، کاسپاز ۳ و ۹. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود تکثیر و میزان فلورسنت نمونه‌ها از سیکل ۱۴ به بعد به صورت لگاریتمی افزایش یافته است.



شکل ۳: آنالیز منحنی ذوب ژنهای β -actin، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹. رنگ سبز متعلق به ژن بتا-اکتین، رنگ زرد متعلق به ژن کاسپاز ۳ و رنگ قرمز متعلق به ژن کاسپاز ۹ می‌باشد.

مرجع β -actin در رده سلولی سرطانی HT29 تیمار شده با دارو به ترتیب به میزان $2/69 \pm 0/72$ ($p < 0/001$) و $3/26 \pm 0/56$ ($p < 0/001$) طی ۲۴ ساعت افزایش یافت (شکل ۴).

در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با دارو) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو) محاسبه و میزان بیان ژن با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ (نسبت ژن هدف به ژن مرجع (β -actin) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه شد. نسبت بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ به ژن

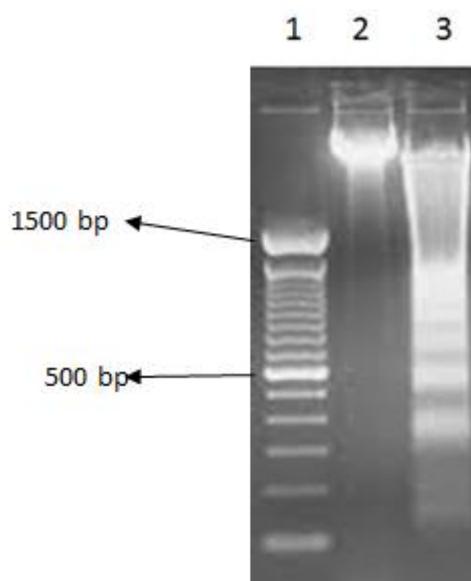


شکل ۴: نمودار بیان ژن‌های بتا-اکتین، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ نسبت به ژن مرجع بتا-اکتین معنی‌دار می‌باشد. ($n=3$; $p < 0/001$ ***، $p < 0/01$ **، $p < 0/05$ *).

آزمون قطعه قطعه شدن DNA

نتایج حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی HT29 با غلظت IC50 داروی اگزالی پلاتین نشان داد که این دارو موجب القا قطعه قطعه شدن DNA ژنومی سلول‌های سرطانی می‌شود. قطعه قطعه شدن DNA ژنومی که از خصوصیت سلول‌های آپوپتوتیک است، بر روی ژل آگارز

۲ درصد تایید شد (شکل ۵). همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود داروی اگزالی پلاتین قادر به القا برش DNA در نواحی بین کروموزومی است که در مقایسه با نمونه کنترل (سلول تیمار نشده) اثری بر روی DNA ژنومی نداشته است.



شکل ۵: تصویر ژل الکتروفورز از تست قطعه قطعه شدن DNA برای نشان دادن آپوپتوزیس. ۱: مارکر DNA، ۲: نمونه DNA کنترل، ۳: نمونه DNA تیمار شده با دارو. همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه DNA تیمار شده با دارو اگزالی پلاتین قطعه قطعه شده است که نشانگر القا فرایند آپوپتوزیس می‌باشد.

دارد که جلوی فرایند متاستازی که علت اصلی مرگ و میر بیماران سرطانی می‌باشد، گرفته شود (۱۶-۱۹). سلول‌های سرطانی از مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوزیس فرار می‌کنند که یکی از دلایل آن تغییر در بیان ژن‌هایی است که در تنظیم این فرآیند دخیل می‌باشند. بیشتر عوامل ضدسرطانی آثار درمانی خودشان را با القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده اعمال می‌کنند (۲۰-۲۱). القای مرگ برنامه ریزی شده یکی از مهم‌ترین روش‌ها در از بین بردن بدون عارضه سلول‌های سرطانی است (۲۲). در این مطالعه، با استفاده از روش رنگ سنجی MTT نشان داده شد که داروی اگزالی پلاتین دارای اثر کشندگی وابسته به دوز در سلول‌های سرطانی

بحث

خاصیت ضد سرطانی داروهای ضدسرطانی از چندین سال قبل مشخص شده است و به همین دلیل استفاده از داروهای مناسب جهت درمان سرطان از اهمیت بالایی برخوردار شده است (۱۴-۱۵). با توجه به این که تغییرات ژنتیکی زیادی مورد نیاز است تا فرم سرطانی یک سلول ایجاد شود و به علت اینکه ایجاد بسیاری از سرطان‌ها جنبه ارثی دارد، استفاده از موادی که بتوانند فرایند متاستازی را مهار کنند مورد توجه می‌باشد. یعنی اگرچه نمی‌توان از ایجاد تومور اولیه جلوگیری کنیم، ولی این امکان وجود

کولون می‌باشد. امروزه مراکز مطالعات سرطان در جستجوی عوامل ضد سرطان با ضریب اطمینان بالاتر و قابلیت پذیرش بیشتر برای بیماران می‌باشند. در این میان درمان‌های هدف‌دار شده با اهداف مولکولی که در رشد و یا پیشرفت تومور مداخله می‌کنند اختصاصیت بالایی به سلول‌های توموری دارند و پنجره درمانی جدیدی با کاهش سمیت را به روی علم باز کرده اند (۲۳). علاوه بر این می‌توان در ترکیب با عوامل شیمی درمانی سایتوتوکسیک برای فعالیت ضد سرطانی بیشتر از عوامل سینرژیسیم و یا مازاد استفاده کرد (۲۴). تاکنون مطالعات مختلفی در جهت استفاده از داروی اگزالی پلاتین در درمان انواع سرطان‌ها انجام شده است که نتایج این مطالعات با مطالعات ما همسو بوده است. Shisheng Tan و همکاران (۲۵) اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین را به‌همراه ترکیب ۳-متیل آدنین مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه با استفاده از روش MTT اثرات سمیت سلولی داروی فوق‌الذکر را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که داروی اگزالی پلاتین قابلیت سمیت سلولی قابل توجهی در رده سلولی سلولی CT26 (سرطان کولون) دارد. همچنین نتایج نشان داد که این دارو فرایند آپوپتوز و اتوفاژی را القا می‌کند. Teixeira SF و همکاران (۲۶) اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین را به‌همراه پیریدینیل کربوکساماید را بر روی رده سلولی سرطان ریه (NCI-H1299) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سمیت سلولی ترکیب فوق‌وابسته به دوز است و توانایی القا آپوپتوز را دارد. همچنین مطالعه دیگری، ارزیابی آنتی اکسیدانته و ضد سرطانی نانوزل‌های حاوی داروی اگزالی پلاتین روی سلول‌های سرطان کولون (HT29) را نشان دادند. نتایج این پژوهش پتانسیل بالای نانوزل‌ها در کاهش ۱۶/۳۹ درصدی زنده ماندن رده سلولی سرطان کولون را نشان داد (۲۷).

همان‌طور که اشاره شد نتایج این مطالعه نشان داد که اثر کشندگی دارو بر روی سلول‌ها، بستگی به غلظت دارو دارد. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که داروی اگزالی پلاتین اثرات مهاری بر روی سلول‌های سرطانی از خود نشان می‌دهند که این پدیده به دلیل اثر مستقیم آن‌ها بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری می‌باشد. به‌طور کلی القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در حوزه پزشکی به شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزاد سازی سیتوکروم C از آن آغاز می‌شود. علاوه بر این اثرات داروی اگزالی پلاتین در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است. بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرایند تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، بستر مناسبی برای داروی اگزالی پلاتین جهت تخریب سلول‌های سرطانی فراهم می‌شود (۲۸). یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ بود. نتایج این مطالعه نشان داد که بعد از تیمار سلول‌های HT29 با داروی اگزالی پلاتین، بیان ژن‌های آپوپتوزیسی نسبت به ژن مرجع افزایش بیان چشم‌گیری داشتند که نشان دهنده القای پدیده آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان کولون می‌باشد. از آنجاکه فعالیت ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در اثر تیمار با داروی اگزالی پلاتین افزایش می‌یابد، به‌نظر می‌رسد که سیتوکروم C رها شده به‌درون سیتوزول به همراه کاسپاز ۳ و ۹ کمپلکس پروتئینی آپوپتوزوم را تشکیل می‌دهد و موجب القای آپوپتوزیس شده است. بدیهی است که شناسایی اهمیت الگوی بیان این ژن در پاسخ به‌فعالیت متاستازی داروهای ضد سرطانی حائز اهمیت است. بنابراین بررسی‌های بیشتری برای اثبات این که آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن می‌تواند مدرکی باشد

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه که سمیت سلولی و الفا فرایند آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان کولون توسط داروی اگزالی پلاتین نشان داده شد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که داروی اگزالی پلاتین گزینه مناسب جهت درمان سرطان کولون می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تلاش همکاران دانشگاه آزاد اسلامی و جناب آقای آرین رحیمی و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Fass L. Imaging and cancer: a review. *Mol Oncol*. 2008; 2(2): 115-52.
2. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A. Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Res*. 2017; 37(9): 4759-4766.
3. Dahan L, Sadok A, Formento JL, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *Br J Pharmacol*. 2009; 158(2): 610-620.
4. Valdivieso M, Kujawa AM, Jones T, Baker LH. Cancer survivors in the United States: a review of the literature and a call to action. *Int J Med Sci*. 2012; 9(2): 163-73.
5. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F, Capellá G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(1): 3-10.
6. Shannon AM1, Williams KJ. Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(8): 1029-36.
7. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*. 2011; 18(1): 18-25.
8. Raez LE, Kobina S, Santos ES. Oxaliplatin in first-line therapy for advanced non-small-

برای نقش آن در پیش‌گویی دقیق‌تر و اختصاصی پاسخ سرطان به درمان ضروری است (۲۹). نتایج به‌دست آمده از این مطالعه استفاده درمانی داروی اگزالی پلاتین را در سلول‌های سرطانی کولون نشان داد. طبق این بررسی‌ها مطالعات بالینی روی مدل حیوانی و انسانی برای تایید اثر دارو ضروری می‌باشد. بنابراین استفاده از نانوذلهای حاوی دارو در افزایش بیان برخی ژن‌های پروآپوپتوزیسی می‌تواند موثر باشد. می‌توان براساس این تحقیق و تحقیقات پیشین نتیجه گرفت که داروی اگزالی پلاتین اثرات ضد سرطانی قدرتمندی بر سلول‌های سرطانی دارد و مشتقات این ترکیب در آینده می‌تواند نقش مهمی در درمان این نوع از سرطان‌ها بازی کنند. بنابراین در صورتی که پروسه بالینی این دارو تایید شود، این دارو می‌تواند در موارد بالینی برای بیماران مبتلا به سرطان کولون به‌کار گرفته شوند. مطالعه حاضر در مدل آزمایشگاهی از سلول‌های رده سرطانی کولون انجام گرفت که اثرات ضد سرطان را نشان داد. پیشنهاد می‌شود برای تایید اثرات ضد سرطان داروی اگزالی پلاتین در بدن موجود زنده، مطالعه تاثیر آن روی مدل حیوانی و انسانی انجام گیرد. به‌دلیل خواص ضدسرطانی داروی اگزالی پلاتین، مطالعه اثرات ضد سرطانی در سطح پروتئوم از رده سرطانی کولون برای اکتشافات بیشتر پیشنهاد می‌شود. قابلیت طراحی لیگندهای اختصاصی در سطح نانوذرات بارگذاری شده با دارو، برای گیرنده‌های خاص با بیان زیاد در سطح سلول‌های سرطانی، توانایی هدف‌گیری نانوذرات را در رسیدن به محل تومور افزایش می‌دهد و امکان آزادسازی دارو در ناحیه سرطانی مورد نظر را بالا خواهد برد. بنابراین تغییرات سطحی نانوذرات قابلیت هدف‌گیری اختصاصی و دقیق‌تر آن‌ها را میسر می‌سازد. لذا اعمال این تغییرات بر سطح نانوذره و بررسی میزان اثر بخشی آن‌ها در سیستم‌های انتقال دارو، قابلیت تحقیق و پیگیری دارند.

cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2010; 11(1): 18-24.

9. Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33(4): 347-57.

10. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.

11. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000; 45(3): 528-37.

12. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(4): 603-19.

13. Hopkins BD, Goncalves MD, Cantley LC. Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism. *J Clin Oncol*. 2016; 10; 34(35): 4277-4283.

14. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015; 34(3): 1087-96.

15. Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*. 2011; 15; 85(5): 2265-89.

16. Ali I, Haque A, Wani WA, Saleem K, Al Za'abi M. Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review. *Biomed Chromatogr*. 2013; 27(10): 1296-311.

17. Kratz F, Müller IA, Ryppa C, Warnecke A. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *Chem Med Chem*. 2008; 3(1): 20-53.

18. Leah M. Cook, Douglas R. Hurst, Danny R. Welch. Metastasis Suppressors and the Tumor Microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(2): 113-122.

19. Toni Celià-Terrassa, Yibin Kang. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev*. 2016; 15; 30(8): 892-908.

20. Darren F, Peter T, Mitchell V, Nicholas DP, Cosford KV. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Res*. 2017; 6: 587.

21. Carl D. Bortner, John A. Cidlowski. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014; 19; 369(1638).

22. Zhenyi S, Zuozhang Y, Yongqing X, Yongbin C, Qiang Y. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015; 14(1): 14: 48.

23. Li-Xia Feng, Min Li, Yong-Jun Liu, Shao-Mei Yang, Na Zhang. Synergistic enhancement of cancertherapy using a combination of ceramide and docetaxel. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3): 4201-4220.

24. Zhang N. Ceramide: Therapeutic potential in combination therapy for cancer treatment. *Curr Drug Metab*. 2015; 17(1): 37-51.

25. Shisheng T, Xingchen P, Wen P, Yinglan Z, Yuquan W. Enhancement of oxaliplatin-induced cell apoptosis and tumor suppression by 3-methyladenine in colon cancer. *Oncol Lett*. 2015; 9(5): 2056-2062.

26. Teixeira SF, de Azevedo RA, Silva AC, Braga RC. Evaluation of cytotoxic effect of the combination of a pyridinyl carboxamide derivative and oxaliplatin on NCI-H1299 human non-small cell lung carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*. 2016; 84: 1019-1028.

27. Zeng C, Yu F, Yang Y, Cheng X. Preparation and evaluation of oxaliplatin thermosensitive liposomes with rapid release and high stability. *PLoS One*. 2016 14; 11(7): e0158517.

28. MacKenzie SH, Clark AC. Targeting cell death in tumors by activating caspases. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008; 8(2): 98-109.

29. Leah M. Cook, Douglas R. Hurst, Danny R. Welch. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(2): 113-122.

Cytotoxicity and apoptotic effect of oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) and analysis of caspase 3 and caspase 9 gene expression using Real Time PCR method

Yonesi, B, M.Sc. Student.¹, Mirzaie, A, Ph.D.^{2*}, Aliasgari E, Ph.D.¹

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

* Email corresponding author: A.mirzaie@riau.ac.ir

Received: 20 Dec. 2017

Accepted: 25 Feb. 2018

Abstract

Aim: The aim of this study is investigation of cell toxicity of oxaliplatin on colon cancer cell line and analysis of caspase 3 and 9 apoptotic genes.

Material and methods: In this experimental study, cytotoxicity of oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) was evaluated using MTT method in different concentrations including 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$ and the IC50 value was determined. After treatment of HT29 cells with IC50 value, the cells RNA was extracted and converted to cDNA. Subsequently, the expression level of *caspase 3* and *caspase 9* apoptotic genes comparing to house-keeping gene (*β -actin*) was measured using Real Time PCR.

Results: Treatment of HT29 cells with various concentrations of oxaliplatin including show that oxaliplatin has the highest cytotoxic effect in 100 $\mu\text{g/mL}$, which is statistically significant ($P < 0.05$). In addition to, the IC50 value of oxaliplatin was 6 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the expression ratio of caspase 3 and 9 genes comparing to β -actin gene in HT29 cells treated with oxaliplatin were up-regulated (2.69 ± 0.72 ($P < 0.001$), 3.26 ± 0.56 ($P < 0.001$), respectively).

Conclusion: According to cell toxicity and apoptosis induction in HT29 cells by oxaliplatin, it can be concluded that this drug is an appropriate choice for treating of colon cancer.

Key words: Oxaliplatin, Colon cancer, Cytotoxicity, Apoptosis