



Assessing the Impact of Calcium Channel Blockers on Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cell Lines

Ghaderi E^a, Shakeri R^{b*}

^a MSc, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

^b Assistant Professor, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Ghaderi E, Shakeri R, Assessing the Impact of Calcium Channel Blockers on Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cell Lines. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(2):132-155.

<https://doi.org/10.61882/JCT.16.2.132>

KEYWORDS

Amlodipine
Breast Cancer
Calcium Channel Blockers
Chemotherapy
Diltiazem

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the second leading cause of cancer-related mortality in women. Breast cancer is a multi-step process involving various types of cells, and its prevention remains a global challenge. One of the best ways to prevent breast cancer is through early detection. The upregulation of calcium channels is associated with the proliferation and progression of cancer cells, including breast cancer. The calcium channel blockers are a chemically heterogeneous group that prevents the entry of calcium into the muscle cells of blood vessels and the heart. It has been demonstrated that calcium channel blockers exhibit cytotoxic effects on various types of cancer. Doxorubicin is a well-established chemotherapeutic agent used in the treatment of cancer. Two commonly used calcium channel blockers are amlodipine and diltiazem. However, their interactions with common chemotherapeutic agents such as doxorubicin, which face limitations of cardiotoxicity and cellular resistance, have not been fully investigated.

Aims: This study aimed to evaluate the combined effects of two calcium channel blockers, including amlodipine and diltiazem, on doxorubicin cytotoxicity in breast cancer cell lines.

Materials and Methods: Different concentrations of amlodipine and diltiazem were prepared. Their effects were evaluated both alone and in combination with low concentrations of doxorubicin (which showed minimal cytotoxic effects) on cell proliferation and survival of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines at 48 and 72 hours using the MTT assay. The MTT assay is a colorimetric test that assesses cell metabolic activity. It measures the reduction of MTT, a yellow tetrazole, to purple formazan by

* Corresponding author. +98-8733664600; Fax: +98-8733622702

E-mail address: r.shakeri@uok.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.16.2.97> |

Received: 28. Aug. 2024; Received in revised form: 13 May. 2025; Accepted: 17 May. 2025

Original Article

© Author



mitochondrial enzymes in viable cells. The amount of formazan produced is directly proportional to the number of living cells, making it a useful method for evaluating cell viability and proliferation. Apoptosis is a programmed cell death process that plays a critical role in maintaining tissue homeostasis and eliminating damaged or unwanted cells. Caspase-3/7 activity in drug-treated cell lysates was evaluated to assess apoptosis. All tests were performed at least three times. Differences between samples were analyzed using the t-test and one-way ANOVA, and curves were plotted using Microsoft Excel.

Results: The results of this study demonstrated that both amlodipine and diltiazem inhibited the proliferation of MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cells in a concentration- and time-dependent manner. Evaluation of caspase-3/7 activity in the cells treated with amlodipine revealed an increase in caspase-3/7 activity in both cell lines, indicating the induction of apoptosis. In cells treated with diltiazem, caspase-3/7 activity was observed only in MCF-7 cells, while the activity of caspase-3/7 in MDA-MB-231 cells was lower than the control group. Investigating the cytotoxic effect of doxorubicin in the presence of amlodipine and diltiazem showed that these drugs interfered with most cytotoxic concentrations of doxorubicin.

Discussion: The results of this study showed that increasing the concentration of amlodipine and diltiazem, as well as extending the treatment duration, caused cell death in both MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. Caspase-3 and -7 act as executioner enzymes in apoptosis (programmed cell death). The increased activity of caspase 3/7 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells treated with amlodipine suggests that amlodipine can induce apoptosis through caspase-dependent pathways. Similarly, increased caspase 3/7 activity was observed in MCF-7 cells treated with diltiazem. However, in MDA-MB-231 cells treated with diltiazem, caspase activity was significantly lower compared to the control group. This unexpected result may indicate that diltiazem induces cell death independently of caspase 3/7 in this cell line, but further experiments are needed to definitively confirm this hypothesis. Calcium is an important regulator of many essential cellular functions and generally acts as a mitogen to stimulate growth in most proliferating cells. It has been reported that tumors typically have abnormally high calcium levels, due to excessive influx of extracellular calcium or the ability of cancerous mitochondria to maintain higher calcium concentrations. The high levels of intracellular calcium production may activate the calcium second messenger cascade, promoting the overgrowth of certain malignant cells. Human breast cancer cell lines HT-39 and MCF-7, the human promyelocytic leukemia cell line HL-60, and the leukemia cell line L1210, have shown calcium-dependent proliferation. Okazaki et al. confirmed these findings and demonstrated that the HL-60 cells grow in a manner dependent on extracellular calcium. Additionally, Yonda et al. showed that the growth of a breast cancer cell line (VX2) is tightly regulated by extracellular calcium levels. However, other studies have that removing calcium from the growth medium of some tumorigenic cell lines, such as transformed fibroblasts, hepatic hematomas, mouse embryonic 3T3 cells, and human ovarian cells, does not affect their growth. Therefore, the role of calcium in cell death and proliferation is complicated. Doxorubicin is a widely used chemotherapy drug for breast cancer. Given the high prevalence of hypertension worldwide, cancer patients undergoing chemotherapy often use calcium channel blockers like amlodipine and diltiazem to control blood pressure. Given that amlodipine and diltiazem can induce cancer cell death by blocking calcium channels, this study investigated the cytotoxic effect of doxorubicin in the presence of low concentrations of these drugs on both cell lines. The results showed that amlodipine significantly affected the cytotoxic effect of doxorubicin. This

effect depends on concentration and treatment duration. At lower concentrations, amlodipine reduced doxorubicin-induced cell death, and at higher concentrations, due to increased doxorubicin levels, it could not inhibit the drug's toxic effects. Diltiazem is another calcium channel blocker used to lower blood pressure. It has been reported that diltiazem is less potent in lowering blood pressure than amlodipine. Diltiazem also had similar effects to amlodipine. It had antagonistic effects on doxorubicin cytotoxicity at different concentrations and depending on the duration of treatment. Diltiazem, a calcium channel blocker, is known as a P-gp (P-glycoprotein) inhibitor, which reduces cardiotoxicity caused by chemotherapeutic agents. Further studies are needed to explore the underlying mechanisms and therapeutic implications of these findings.

Conclusion: Amlodipine and diltiazem not only induce cell death in cancer cells but also interfere with the cytotoxic effects of doxorubicin at low concentrations. These results highlight the importance of investigating drug interactions between calcium channel blockers and chemotherapeutic agents.



بررسی تاثیر مسدودکننده‌های کانال کلسیم بر سمیت سلولی دوکسوروبیسین در رده‌های سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 و MCF-7

الهام قادری^۱، راحله شاکری^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، elhamghaderi8@gmail.com
^۲ استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، r.shakeri@uok.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
آملودیپین سرطان پستان مسدودکننده‌های کانال کلسیمی شیمی‌درمانی دیلتiazم	<p>هدف: هدف این مطالعه ارزیابی تاثیر ترکیبی دو داروی مسدودکننده‌ی کانال کلسیمی شامل آملودیپین و دیلتiazم بر سمیت دوکسوروبیسین در رده‌های سلولی سرطان پستان است. مواد و روش‌ها: سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 با غلظت‌های مختلف آملودیپین، دیلتiazم به صورت تکی و در ترکیب با دوکسوروبیسین به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. بقای سلولی با تست MTT بررسی شد. مقادیر IC₅₀ از منحنی دوز-پاسخ، محاسبه شد. اثر ترکیبی داروها با محاسبه شاخص ترکیبی (CI) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت کاسپاز-۷/۳ به عنوان نشانگر القای آپوپتوزیس با روش سنجش آنزیمی مبتنی بر سوپسترای رنگ‌زا (Ac-DEVE-pNA) در لیز سلول‌های تیمار شده اندازه‌گیری شد. نتایج: نتایج نشان داد که آملودیپین و دیلتiazم با برابر با اثر مهارى بر تکثیر سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 و MCF-7 به صورت وابسته به غلظت و زمان دارند. ارزیابی فعالیت کاسپاز-۷/۳ در لیز سلول‌های تیمار شده با داروها نشان داد که آملودیپین باعث افزایش فعالیت کاسپاز-۷/۳ در هر رده‌ی سلولی می‌شود که نشان‌دهنده القای آپوپتوزیس است. در سلول‌های تیمار شده با دیلتiazم، فعالیت کاسپاز-۷/۳ تنها در سلول‌های MCF-7 مشاهده شد، در حالی که فعالیت کاسپاز-۷/۳ در سلول‌های MDA-MB-231 کم‌تر از کنترل بود که نتیجه‌گیری در این خصوص نیازمند مطالعات بیشتر است. مقدار CI، در اکثر غلظت‌ها بزرگ‌تر از یک بود که نشان‌دهنده تداخل آملودیپین و دیلتiazم با اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین در طیف وسیعی از غلظت‌ها است. نتیجه‌گیری: آملودیپین و دیلتiazم نه تنها قادر به القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی هستند، بلکه در غلظت‌های پائین در اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین تداخل ایجاد می‌کنند. این نتایج اهمیت بررسی تعاملات دارویی مسدودکننده‌های کانال کلسیمی با شیمی‌درمانی را برجسته می‌سازد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۲۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷	

۱- مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است و در بین علل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان، رتبه دوم را دارد. تصمیمات درمانی که در گذشته عمدتاً براساس ویژگی‌های آناتومیک بیماری مانند محل و اندازه‌ی تومور بود، اکنون در حال تغییر به مکانیسم‌های بیولوژیکی زمینه‌ای است (۱). انواع اصلی درمان سرطان سینه عبارتند از: جراحی، پرتودرمانی (Radio therapy)،

شیمی‌درمانی (Chemo therapy)، هورمون‌درمانی (Endocrin therapy) و درمان هدفمند (۲). مسدودکننده‌های کانال کلسیم یک گروه ناهمگن از نظر ساختاری و عملکردی هستند که به‌طور گسترده‌ای برای کنترل فشار خون و مدیریت علائم آنژین (Angina) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳، ۴). کانال‌های کلسیمی منافذ ریزی بر روی سطح سلول هستند که اجازه‌ی عبور یون کلسیم را به داخل سلول می‌دهند. کانال‌های کلسیمی حساس به ولتاژ نوع L از زیر واحدهای α_1 ، β ، $\alpha_2\delta$ و γ تشکیل شده است که این زیر واحدها همگی توالی‌یابی شده و ژن‌های آن‌ها شناسایی شده است. زیر واحد α_1 جز مهم از کانال کلسیمی است که حاوی منافذ برای عبور یون کلسیم است و در حال حاضر به‌عنوان جایگاه اتصال برای مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی می‌باشد (۵). تحقیقات نشان داده است که بیان و فعالیت کانال‌های کلسیمی نوع L فقط به سلول‌های تحریک‌پذیر محدود نمی‌شود و در سلول‌های سرطانی هم بیان می‌شوند. این کانال‌ها در سلول‌های رده MDA-MB-231 و PDACp53R172H دارای عملکرد هستند، زیرا کلسیم درون سلولی آن‌ها افزایش می‌یابد (۶). آپوپتوزیس نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. کلسیم به‌عنوان یونی که به‌طور گسترده در فعالیت‌های سلولی نقش دارد، نقش مناسبی در تعدیل آپوپتوزیس هم دارد. در واقع مروری بر مقالات نشان می‌دهد که نقش کلسیم در آپوپتوزیس پیچیده است. آپوپتوزیس به‌دنبال افزایش و کاهش کلسیم داخل سلولی مشاهده شده است با وجود این تظاهرات ظاهراً متناقض، پیشنهاد شده است که افزایش کلسیم ممکن است اندونوکلتازهای وابسته به کلسیم را فعال کند که در تکه‌تکه شدن DNA مرتبط با آپوپتوزیس نقش دارند. یک فرضیه جایگزین این است که کلسیم ممکن است ساختار کروماتین هسته‌ای را به گونه‌ای تغییر دهد که دسترسی آن به اندونوکلتازها را بیشتر کند. مروری بر متون علمی نشان می‌دهد که تاثیر مسدودکننده‌های کانال کلسیم بر آپوپتوزیس پیچیده و اغلب متناقض است، اگرچه نشان داده شده است که مسدودکننده‌های کانال کلسیم در برخی رده‌های سلولی آپوپتوزیس را مهار می‌کنند. گزارشات زیادی هم وجود دارد که نشان می‌دهد این مسدودکننده‌ها تقویت‌کننده‌ی آپوپتوزیس در برخی رده‌های سلولی هستند. علاوه بر این نشان داده شده است که مسدودکننده‌های کانال کلسیم از رشد سلول‌ها و متاستاز در مدل‌های مختلف نئوپلازی از جمله کارسینومای پستان جلوگیری می‌کنند (۷). افزایش کلسیم داخل سلولی با القای آپوپتوزیس و آزادسازی انتقال‌دهنده عصبی مرتبط است. با این حال، هر بار که یک انتقال‌دهنده عصبی توسط سلول آزاد می‌شود، نورون‌ها دچار آپوپتوزیس نمی‌شوند. در واقع نقش کلسیم در آپوپتوزیس تابعی از بستر سلول و شرایط فیزیولوژیک آن است (۸). با توجه به تأیید استفاده از داروهای مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی در مصارف انسانی و نقش کلسیم در مسیرهای رشد و بقای سلولی، هدف از این مطالعه بررسی اثرات مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی دیلتیازم و آملودیپین بر روی سلول‌های سرطانی رده‌های MDA-MB-231 و MCF-7 در حضور و در غیاب دوکسوروبیسین است.

۲- مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 از شرکت بن‌یاخته، محیط کشت سلولی DMEM High Glucose، تریپسین، سرم جنین گاوی (FBS)، بافر فسفات سالین (PBS) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین از شرکت ایده زیست نوترکیب، پلیت ۹۶ خانه‌ی کف صافِ مختص کشت سلول از Nunc، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و متانول از Carlo Ebra، پودر MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) و بافر فسفات از شرکت سیگما خریداری شدند.

کشت سلولی: سلول‌های سرطانی در محیط کشت DMEM با غلظت بالای گلوکز، حاوی حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین در فلاسک‌های T-75 کشت شدند و سپس در انکوباتور حاوی دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفتند. پس از رسیدن سلول‌ها به ۸۰ درصد تراکم، محیط کشت موجود در فلاسک تخلیه و سلول‌ها با PBS شسته شد. با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. سپس محیط کشت سلولی حاوی سرم به فلاسک اضافه شد تا تریپسین غیرفعال شود. سلول‌ها از فلاسک جمع‌آوری و به لوله سانتریفیوژ منتقل شد. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. این کار باعث می‌شود سلول‌ها به صورت رسوب در انتهای لوله جمع شوند. محلول رویی به آرامی دور ریخته شد و به رسوب سلولی، یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم اضافه شد. با پیتاژ، رسوب سلولی به صورت سوسپانسیون درآمد. شمارش سلولی انجام شد و در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ی مختص کشت سلولی، ۱۵۰۰۰ سلول در ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی حاوی سرم قرار گرفت. جهت چسبیدن سلول‌ها به بستر و گرفتن مورفولوژی، پلیت به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور حاوی CO₂ قرار گرفت. سپس محیط کشت هر چاهک از پلیت با محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف داروها تعویض و دوباره به انکوباتور منتقل شد.

تست MTT: تست MTT، یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای بررسی بقای سلول‌های تیمار شده با ترکیبات دارویی، مولکول‌های زیستی و غیره است. اساس این تست، احیای کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به کریستال بنفش رنگ فورمازان توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده است (۹). پس از اتمام انکوباسیون داروها با سلول، محیط کشت هر چاهک دور ریخته شد و به هر چاهک، ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پلیت به مدت ۳ ساعت به انکوباتور منتقل شد. سپس محلول هر چاهک دور ریخته شد و کریستال‌های فورمازان ته‌نشین شده در هر چاهک در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد. در نهایت جذب هر چاهک، در دستگاه میکروپلیتریدر (مد Epoch ساخت شرکت بیوتک) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای تفسیر نتایج، ابتدا درصد مهار محاسبه شد:

$$100 \times ((\text{جذب کنترل منفی}) / (\text{جذب تست} - \text{جذب کنترل منفی})) = \text{درصد مهار}$$

سپس مقدار IC₅₀ (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد سلول‌ها را از بین می‌برد) با استفاده از ترسیم منحنی درصد مهار در برابر غلظت‌های مختلف دارو تعیین گردید. درصد بقای سلولی از رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{درصد مهار} - 100 = \text{درصد بقای سلولی}$$

برای ارزیابی اثر ترکیبی دو دارو (هم‌افزایی، تداخل یا بی‌اثری)، ابتدا درصد مهار پیش‌بینی‌شده (PI) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۱۰):

$$PI (\text{درصد}) = (E_1 + E_2) - (E_1 \times E_2)$$

که در آن E_1 و E_2 به ترتیب درصد مهار تجربی هر یک از داروها به صورت مجزا هستند. سپس Combination Index (CI) از تقسیم درصد مهار پیش‌بینی شده (PI) بر درصد مهار تجربی ترکیب داروها به دست آمد. مقادیر CI در بازه ۰/۹ تا ۱/۱ به عنوان بی‌اثری، مقادیر بیشتر از ۱/۱ به عنوان اثر تداخلی و مقادیر کم‌تر از ۰/۹ به عنوان اثر هم‌افزایی در نظر گرفته شدند (۱۱).

سنجش فعالیت کاسپاز-۷/۳: به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز-۷/۳، رده‌های سلولی داخل پتری‌دیش (۵۰۰ هزار سلول در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت) توزیع و داخل انکوباتور به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. پس از چسبیدن سلول‌ها به بستر و گرفتن مورفولوژی، غلظت IC_{50} از هر دارو به پتری‌دیش مربوطه اضافه و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز-۷/۳ در سلول‌های تیمار شده، از کیت سنجش فعالیت آنزیمی کاسپاز-۷/۳ شرکت کیازیست (KCAS96) استفاده شد. مطابق دستور کار کیت، ابتدا اتصال سلول‌ها به کف پتری‌دیش توسط تریپسین قطع شد و سلول‌های شناور توسط سانتریفیوژ رسوب داده شدند و با بافر لیز سلولی موجود در کیت لیز شدند. لیز سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با نیروی گریز از مرکز g ۱۷۱/۳۶ سانتریفیوژ و محلول رویی جمع‌آوری شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۵۰ میکرولیتر محلول بافر کاسپاز، ۰/۵ میکرولیتر DTT و ۵ میکرولیتر سوبسترای کاسپاز-۷/۳ (Ac-DEVD-pNA) مخلوط شد. پس از ۱/۵ تا ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، جذب نمونه در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. براساس دستورالعمل مندرج در کیت، منحنی استاندارد pNA ترسیم و فعالیت آنزیمی محاسبه شد. هم‌چنین میزان کل پروتئین موجود در لیز سلول هم با استفاده از روش برادفورد تعیین شد (۱۲).

۳- آنالیز آماری

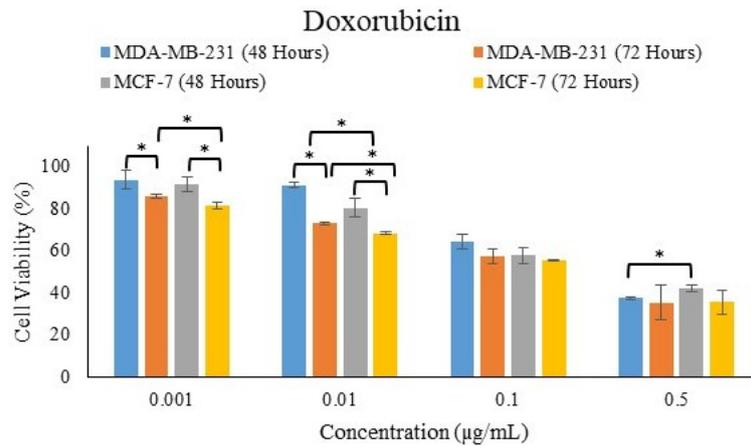
همه‌ی تست‌ها حداقل سه بار تکرار شد. از آزمون T و تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه‌ی اختلاف بین نمونه‌ها استفاده شد. برای ترسیم منحنی‌ها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. P-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

۱- نتایج

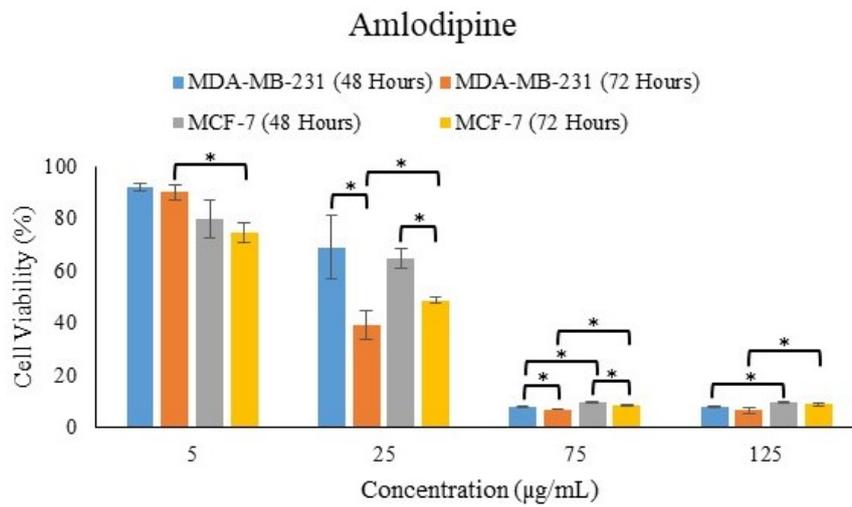
بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 در حضور آملودیپین و دیلتیازم

اثر غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین ($0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 125$ $\mu\text{g/mL}$)، آملودیپین ($5, 25, 75, 125$ $\mu\text{g/mL}$) و دیلتیازم ($5, 100, 500, 1000$ $\mu\text{g/mL}$) بر تکثیر و زنده‌مانی دو رده‌ی سلول سرطان سینه‌ی انسانی شامل MDA-MB-231 و MCF-7 در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت با تست MTT ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۱ (الف تا ج) قابل مشاهده است با افزایش غلظت داروها و زمان درصد بقای سلول‌ها کاهش می‌یابد. IC_{50} (غلظتی از دارو که سبب مرگ ۵۰ درصد از جمعیت سلولی می‌شود) محاسبه شده برای هر دارو در جدول ۱ درج شده است.

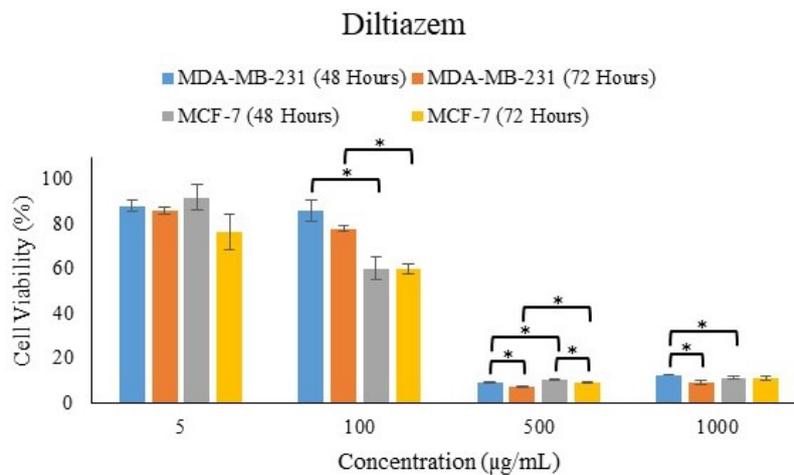
الف



ب



ج



شکل ۱: نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین (الف)، املودیپین (ب) و دیلتازم (ج). نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. p-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شده است (* $p < 0.05$).

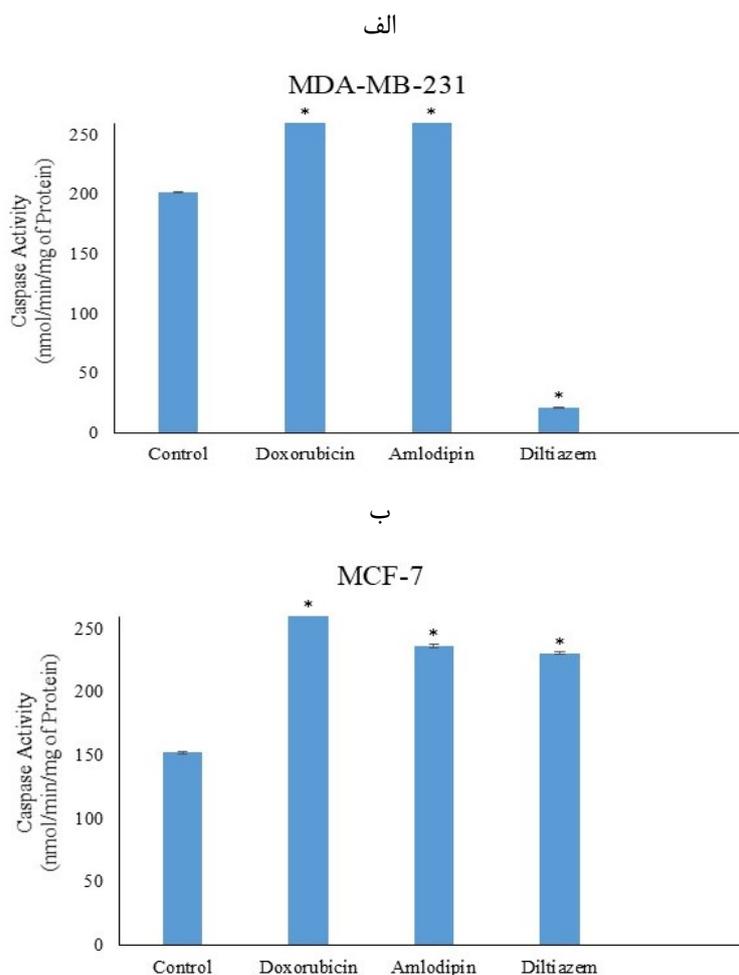
جدول ۱: IC₅₀ داروهای مسدودکننده‌ی کانال‌های کلسیمی و دوکسوروبیسین به‌عنوان کنترل مثبت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است.

دارو	IC ₅₀ (µg/mL)			
	MDA-MB-231		MCF-7	
	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
دوکسوروبیسین	۰/۳۹ ± ۰/۰۱	۰/۲۶ ± ۰/۰۲	۰/۳۹ ± ۰/۰۲	۰/۲۳ ± ۰/۰۲
آملودیپین	۳۷/۹ ± ۱۱	۳۰/۷۴ ± ۸/۵	۲۳/۹۵ ± ۶/۶۸	۱۱/۸۴ ± ۱/۸۳
دیلتیازم	۱۱۵/۷۳ ± ۷۹/۱۳	۶۹/۲ ± ۴۸/۸۰	۱۰۵/۰۴ ± ۴۹/۶۴	۷۷/۹۲ ± ۳۸/۹۵

بررسی فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ و ۷ در سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 تیمار شده با آملودیپین و دیلتیازم

کاسپازها خانواده‌ای از سیستمین پروتئازهای داخل سلولی به‌عنوان عوامل اجرایی آپوپتوزیس هستند. کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز ۳ و ۷ توسط کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز ۹ از طریق برش پروتئولیتیک فعال می‌شوند. کاسپازهای اجرایی پس از فعال شدن، با ایجاد برش پروتئولیتیک در پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی منجر به بروز تغییرات آپوپتوزیسی در سلول می‌شوند. در این پژوهش، به‌منظور بررسی نوع مرگ سلولی القا شده توسط آملودیپین و دیلتیازم، فعالیت کاسپاز-۳/۷ به‌عنوان یکی از شاخص‌های القای آپوپتوزیس در سلول بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲ الف قابل مشاهده است فعالیت کاسپاز-۳ و ۷ در سلول MDA-MB-213 تیمار شده با آملودیپین مانند دوکسوروبیسین نسبت به کنترل افزایش یافته است ولی در سلول تیمار شده با دیلتیازم فعالیت کاسپاز نسبت به کنترل به شدت کاهش یافته است که یافتن علت این امر نیازمند آزمایش‌های بیشتر است.

بررسی فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ و ۷ در این پژوهش با استفاده از سوبسترای کروموزنیک Ac-DEVED-pNA بود که سوبسترای مشترک هر دو کاسپاز است. مطالعات مقایسه‌ای بین کاسپاز-۳ و ۷ در سلول‌های انسانی نشان داده است که کاسپاز-۳ در شرایط *in vitro* فعالیت پروتئولیتیک قوی‌تری نسبت به کاسپاز-۷ در تجزیه سوبسترای DEVD-pNA دارد (۱۶). بنابراین فعالیت آنزیمی مشاهده شده در لیز سلولی MDA-MB-231 مربوط به فعالیت ترکیبی هر دو کاسپاز-۳ و ۷ (البته با کارایی‌های متفاوت) است. به دلیل اینکه سلول‌های MCF-7 فاقد کاسپاز-۳ هستند (۱۷)، ارزیابی فعالیت آنزیمی در این رده‌ی سلولی با استفاده از سوبسترای Ac-DEVE-pNA مربوط به کاسپاز-۷ است. طبق نتایج مندرج در شکل ۲ ب، آملودیپین و دیلتیازم سبب افزایش فعالیت کاسپاز-۷ در سلول MCF-7 می‌شوند.

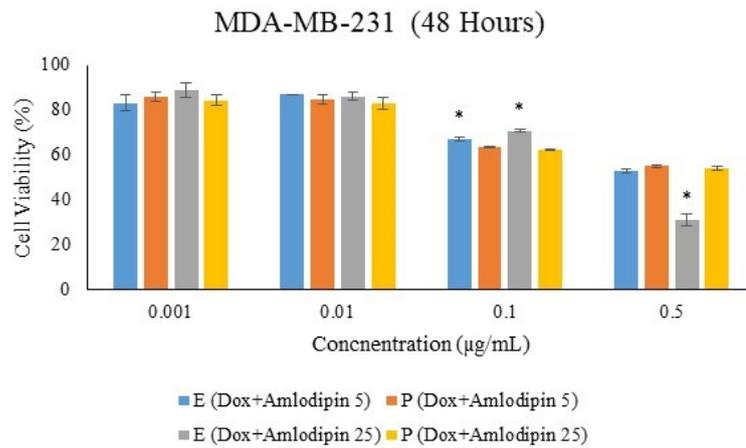


شکل ۲. نمودار درصد فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در سلول MDA-MB-231 و کاسپاز-۷ در سلول MCF-7 در حضور داروی دوکسوروبیسین، دیتلیازم و آملودیپین. اختلاف معنادار فعالیت کاسپاز در مقایسه با کنترل با * نشان داده شده است. p value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شده است (*p<0.05).

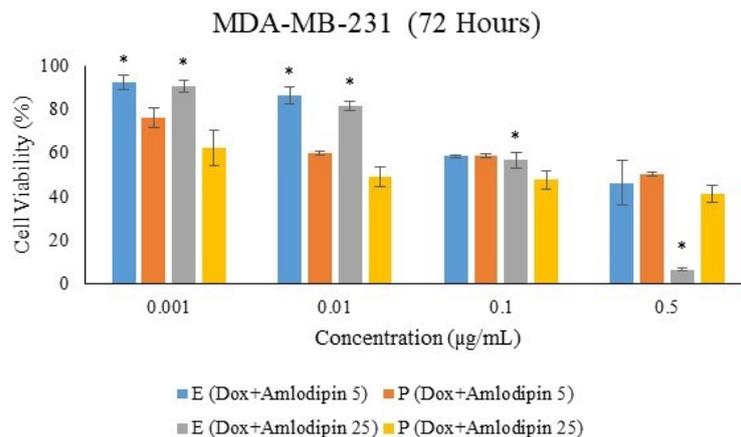
ارزیابی اثر داروهای مسدودکننده‌ی کانال‌های کلسیمی بر سمیت سلولی دوکسوروبیسین

دوکسوروبیسین یکی از داروهای معمول برای شیمی‌درمانی بیماران سرطانی است. در این مطالعه، فعالیت سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین در حضور دو غلظت از آملودیپین و دیتلیازم (با اثر سیتوتوکسیک کم) به صورت جداگانه بررسی شد. نمودارهای درصد بقای سلول‌ها در شکل‌های ۳ تا ۱۰ آمده است. نتایج اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین به تنهایی و در ترکیب با آملودیپین در جدول ۲ ارائه شده است. درصد مهار سلولی برای هر یک از داروها به صورت جداگانه، درصد مهار تجربی ترکیب دو دارو، درصد مهار پیش‌بینی‌شده و همچنین مقادیر CI در این جدول قابل مشاهده است. مطابق شکل ۳، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۵ یا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی‌شده است. براساس مقادیر CI به دست آمده، این اثر تداخلی است. در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمتر از درصد بقای پیش‌بینی‌شده است. براساس مقادیر CI به دست آمده، این اثر هم‌افزایی است.

درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و آملودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت در شکل ۴ آمده است. درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۰۱)، (۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۵ یا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و همچنین درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر تداخلی است. در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کم‌تر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر هم‌افزایی است.



شکل ۳: نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و آملودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت آملودیپین با * نشان داده شده است. P-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شده است (* $p < 0.05$).



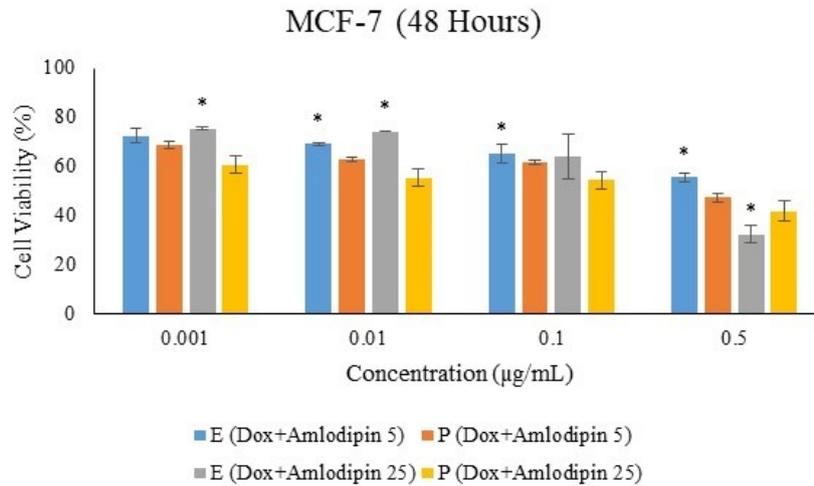
شکل ۴: نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و آملودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت آملودیپین با * نشان داده شده است. P-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شده است (* $p < 0.05$).

جدول ۲: شاخص‌های اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین و آملودیپین در ترکیب با یکدیگر بر رده سلولی MDA-MB-231 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. ($\sqrt{\text{CI}}$ (هم‌افزایی): $\text{CI} < 0.9$ - (بی‌اثر): $0.9 \leq \text{CI} \leq 1.1$ × (تداخلی): $\text{CI} > 1.1$)

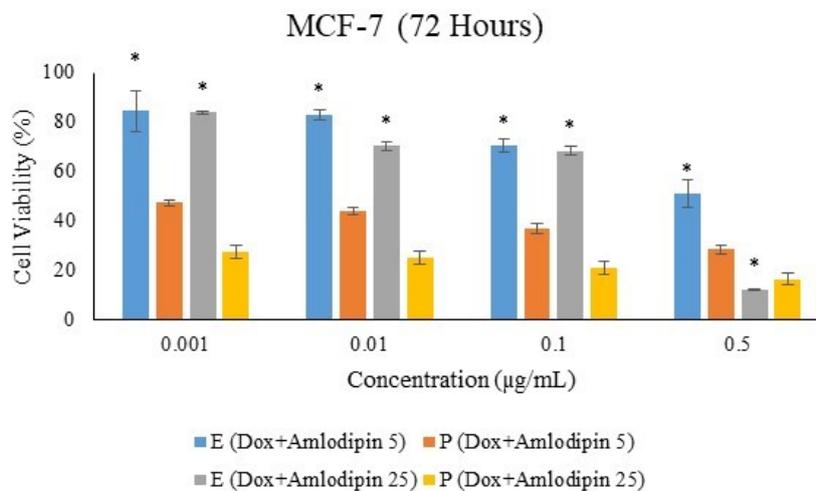
اثر	درصد مهار ترکیبی (پیش‌بینی شده)	درصد مهار ترکیبی (تجربی)	درصد مهار آملودیپین	درصد مهار دوکسوروبیسین	نام ترکیب		زمان	رده سلولی
					دوکسوروبیسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	آملودیپین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		
-	۰/۱۸۹ ± ۰/۳۷	۱۴/۰۱ ± ۲/۱۶	۱۶/۱۸ ± ۳/۷۳	۵/۱۵ ± ۲/۳۷	۰/۰۰۱		۴۸ ساعت	MDA-MB-231
-	۱/۱۱۶ ± ۰/۱۱۷	۱۵/۳۲ ± ۲/۲۷	۱۳/۱۸ ± ۰/۱۰۰	۶/۹۵ ± ۲/۵	۰/۰۱	۵		
×	۱/۱۱۱ ± ۰/۰۲	۳۶/۵۹ ± ۰/۳۹	۳۲/۹۳ ± ۱/۰۵	۳۰/۳۲ ± ۰/۴۳	۰/۱			
-	۰/۱۹۵ ± ۰/۰۱	۴۵ ± ۰/۷۶	۴۷/۳۴ ± ۰/۹۶	۳۹/۵۶ ± ۰/۸۳	۰/۵			
-	۱/۴۹ ± ۰/۵۵	۱۵/۵۸ ± ۲/۴۴	۱۱/۱۳ ± ۳/۲۵	۵/۵ ± ۲/۳۷	۰/۰۰۱		۷۲ ساعت	
-	۱/۲۴ ± ۰/۳۵	۱۶/۸۷ ± ۲/۵۴	۱۳/۸۶ ± ۱/۶۵	۶/۹۵ ± ۲/۵	۰/۰۱	۲۵		
×	۱/۳ ± ۰/۰۳	۳۷/۷۵ ± ۰/۱۱	۲۹/۱۶ ± ۰/۷۷	۳۰/۳۲ ± ۰/۴۳	۰/۱			
√	۰/۱۶۷ ± ۰/۰۴	۴۶/۰۱ ± ۱/۰۹	۶۸/۹۳ ± ۲/۸۹	۳۹/۵۶ ± ۰/۸۳	۰/۵			
×	۳/۴۴ ± ۱/۵۷	۲۳/۸۱ ± ۴/۷۵	۷/۸۲ ± ۳/۳	۱۳/۱۱ ± ۴/۸۶	۰/۰۰۱		۷۲ ساعت	
×	۳/۰۸ ± ۰/۱۶۶	۴۰/۱۱۷ ± ۰/۹۲	۱۳/۵۷ ± ۳/۶۸	۳۱/۷۵ ± ۰/۶	۰/۰۱	۵		
-	۱ ± ۰/۰۴	۴۱/۳۹ ± ۰/۹۲	۴۱/۴۷ ± ۰/۶۳	۳۳/۱۴ ± ۰/۶۷	۰/۱			
-	۰/۱۹۵ ± ۰/۲۲	۴۹/۵۹ ± ۰/۹۳	۵۳/۵۸ ± ۹/۹۷	۴۲/۴۹ ± ۱/۲۹	۰/۵			
×	۴/۴۵ ± ۱/۸۸	۳۷/۶۳ ± ۷/۸۹	۹/۲۶ ± ۲/۸۸	۱۳/۱۱ ± ۴/۸۶	۰/۰۰۱		۷۲ ساعت	
×	۲/۷۸ ± ۰/۱۱۳	۵۱/۰۸ ± ۴/۵۷	۱۸/۴۵ ± ۲/۱۷	۳۱/۷۵ ± ۰/۶	۰/۰۱	۲۵		
×	۱/۲۲ ± ۰/۱۱۹	۵۲/۰۹ ± ۴/۲۲	۴۳/۰۹ ± ۳/۵۷	۳۳/۱۴ ± ۰/۶۷	۰/۱			
√	۰/۱۶۳ ± ۰/۰۴	۵۸/۷۷ ± ۴/۰۲	۹۳/۴ ± ۰/۶۴	۴۲/۴۹ ± ۱/۲۹	۰/۵			

درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و آملودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت در شکل ۵ آمده است. مطابق شکل ۵، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۱)، ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. هم‌چنین، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۱ و ۰/۰۰۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، هر دو اثر تداخلی است (جدول ۳). در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کم‌تر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر هم‌افزایی است (جدول ۳).

درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و آملودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت در شکل ۶ آمده است. درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و هم‌چنین درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر تداخلی است (جدول ۳). در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آملودیپین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کم‌تر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر هم‌افزایی است (جدول ۳).



شکل ۵: نمودار درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و املودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی‌شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت املودیپین با * نشان داده‌شده است. p-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته‌شده است (* $p < 0.05$).



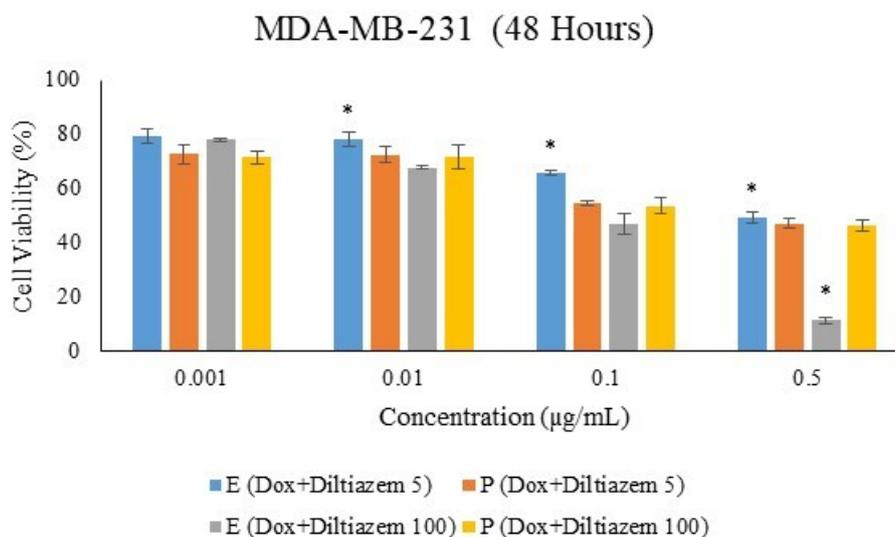
شکل ۶: نمودار درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و املودیپین با دو غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی‌شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت املودیپین با * نشان داده‌شده است. p-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته‌شده است (* $p < 0.05$).

جدول ۳: شاخص‌های اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین و آملودیپین در ترکیب با یکدیگر بر رده سلولی MCF-7 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. (√ (هم‌افزایی): $CI < 0.9$ - (بی‌اثر): $0.9 \leq CI \leq 1.1$ × (تداخلی): $CI > 1.1$

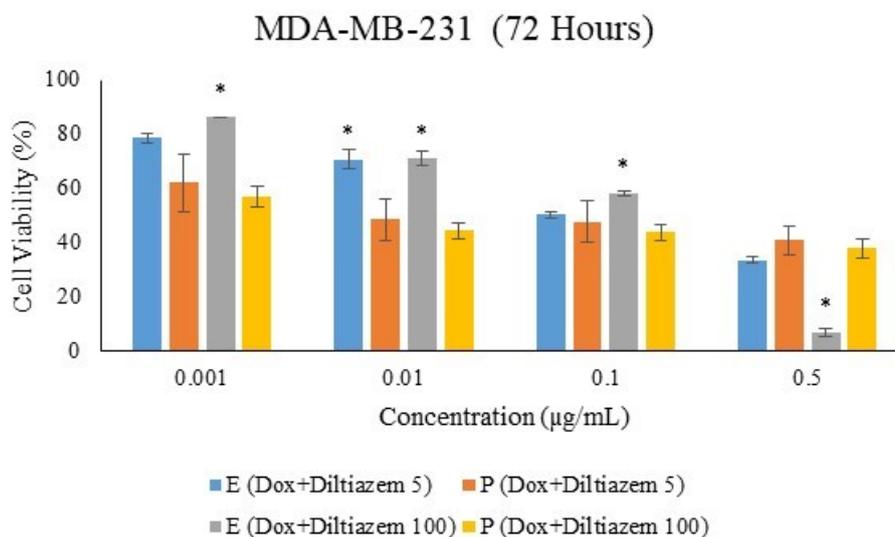
اثر	CI	درصد مهار ترکیبی (پیش-بینی شده)	درصد مهار ترکیبی (تجربی)	درصد مهار آملودیپین	درصد مهار دوکسوروبیسین	نام ترکیب		زمان	رده سلولی
						دوکسوروبیسین	آملودیپین		
-	۱/۱۵ ± ۰/۱۴	۳۱/۱۷ ± ۱/۳	۲۷/۴۴ ± ۲/۹۴		۸/۶۴ ± ۰/۵۳	۰/۰۰۱			MCF-7
×	۱/۲ ± ۰/۰۳	۳۷/۱۵ ± ۰/۹۸	۳۰/۸۵ ± ۰/۳۹	۲۴/۷۷ ± ۱/۰۳	۱۶/۵۷ ± ۰/۰۴	۰/۰۱	۵	۴۸	
×	۱/۱ ± ۰/۰۹	۳۸/۱۲ ± ۰/۹۱	۳۴/۷۸ ± ۳/۶۶		۱۷/۸۶ ± ۰/۵۶	۰/۱			
×	۱/۱۹ ± ۰/۰۲	۵۲/۷۴ ± ۱/۶	۴۴/۴۳ ± ۱/۷۳		۳۷/۲۵ ± ۲/۵۷	۰/۵			
×	۱/۶۱ ± ۰/۱۴	۳۹/۴۱ ± ۳/۵۷	۲۴/۴۷ ± ۰/۵۱		۸/۶۴ ± ۰/۵۳	۰/۰۰۱		۲۵	
×	۱/۷۳ ± ۰/۱۳	۴۴/۶۶ ± ۳/۴۵	۲۵/۸۷ ± ۰/۰۱	۳۳/۴۷ ± ۳/۹۹	۱۶/۵۷ ± ۰/۰۴	۰/۰۱			
-	۱/۳ ± ۰/۲۹	۴۵/۵۱ ± ۳/۶۳	۳۶/۱۲ ± ۹/۰۶		۱۷/۸۶ ± ۰/۵۶	۰/۱			
√	۰/۸۶ ± ۰/۰۲	۵۸/۳۲ ± ۴/۰۹	۶۷/۵۳ ± ۳/۴۲		۳۷/۲۵ ± ۲/۵۷	۰/۵			
×	۴/۰۳ ± ۱/۷۳	۵۲/۶ ± ۱/۱۵	۱۵/۴۹ ± ۸/۴۷		۲۸/۸۵ ± ۱/۸	۰/۰۰۱		۷۲	
×	۳/۳۱ ± ۰/۳۳	۵۶/۰۵ ± ۱/۶۳	۱۷/۰۵ ± ۱/۸۱	۳۳/۲۵ ± ۳/۴	۳۴/۰۴ ± ۱/۲۳	۰/۰۱	۵		
×	۲/۱۴ ± ۰/۰۲	۶۳/۱ ± ۲/۳۳	۲۹/۶۹ ± ۲/۶۴		۴۴/۶۸ ± ۱/۰۴	۰/۱			
×	۱/۴۷ ± ۰/۱۹	۷۱/۴ ± ۱/۷۸	۴۹/۰۵ ± ۵/۵۲		۵۷/۰۷ ± ۲/۴۸	۰/۵			
×	۴/۵۳ ± ۰/۱۸	۷۲/۷۷ ± ۲/۶۷	۱۶/۰۶ ± ۰/۴		۲۸/۸۵ ± ۱/۸	۰/۰۰۱		۲۵	
×	۲/۵۳ ± ۰/۱۸	۷۴/۷۵ ± ۲/۵۱	۲۹/۶۱ ± ۱/۹۳	۳۳/۲۵ ± ۳/۴	۳۴/۰۴ ± ۱/۲۳	۰/۰۱			
×	۲/۵ ± ۰/۲۳	۷۸/۷۸ ± ۲/۶۶	۳۱/۵۸ ± ۱/۷۶		۴۴/۶۸ ± ۱/۰۴	۰/۱			
√	۰/۹۵ ± ۰/۰۲	۸۳/۵۴ ± ۲/۲۷	۸۷/۶۹ ± ۰/۳۸		۵۷/۰۷ ± ۲/۴۸	۰/۵			

درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دیلتیازم با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت در شکل ۷ آمده است. مطابق شکل ۷، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دیلتیازم (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش-بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر تداخلی است (جدول ۴). در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر با دیلتیازم (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر هم‌افزایی است (جدول ۴). در سایر غلظت‌ها، درصد بقای تجربی برابر با درصد بقای پیش‌بینی شده بود.

درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دیلتیازم با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت در شکل ۸ آمده است. درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دیلتیازم (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و هم‌چنین درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دیلتیازم (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، هر دو اثر تداخلی هستند (جدول ۴). در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر با دیلتیازم (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کم‌تر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر هم‌افزایی است (جدول ۴).



شکل ۷: نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دیلتiazم با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی‌شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت دیلتiazم با * نشان داده‌شده است. p-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته‌شده است (* $p < 0.05$).



شکل ۸: نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دیلتiazم با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی‌شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت دیلتiazم با * نشان داده‌شده است. p-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته‌شده است (* $p < 0.05$).

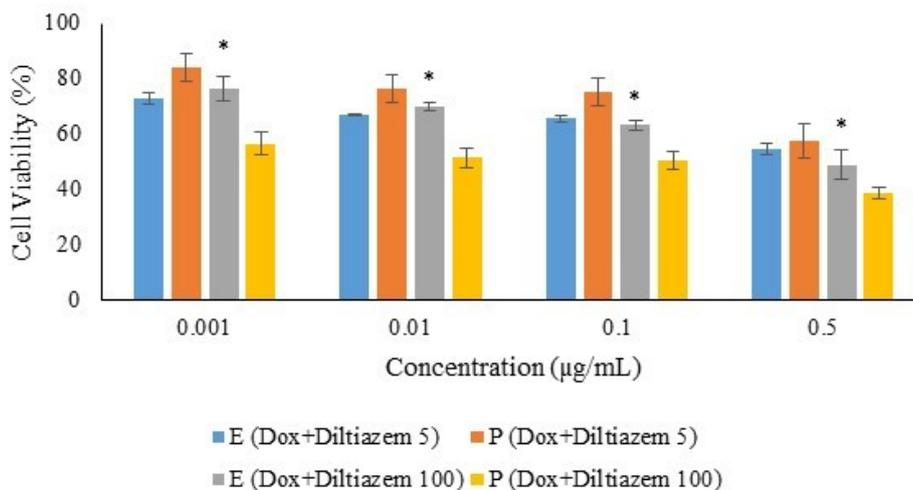
جدول ۴: شاخص‌های اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین و دپلیتازم در ترکیب با یکدیگر بر رده سلولی MDA-MB-231 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. \sqrt{CI} (هم‌افزایی): $CI < 0.9$ ، - (بی‌اثر): $0.9 \leq CI \leq 1.1$ ، \times (تداخلی): $CI > 1.1$

اثر	درصد مهار ترکیبی (پیش‌بینی شده)	درصد مهار ترکیبی (تجربی)	درصد مهار دپلیتازم	درصد مهار دوکسوروبیسین	نام ترکیب		زمان	رده سلولی
					دوکسوروبیسین	دپلیتازم		
-	$1/35 \pm 0/33$	$27/33 \pm 3/49$	$20/6 \pm 2/87$	$6/87 \pm 2/37$	$0/01$		۴۸ ساعت	MDA-MB-231
\times	$1/28 \pm 0/15$	$27/41 \pm 3/09$	$21/59 \pm 2/54$	$6/95 \pm 2/5$	$0/01$	۵		
\times	$1/33 \pm 0/03$	$45/65 \pm 0/88$	$34/32 \pm 0/81$	$30/32 \pm 0/43$	$0/1$			
\times	$1/05 \pm 0/08$	$52/85 \pm 1/69$	$50/5 \pm 2/13$	$39/56 \pm 0/83$	$0/5$			
-	$1/29 \pm 0/12$	$28/35 \pm 2/34$	$21/99 \pm 0/46$	$6/87 \pm 2/37$	$0/01$		۷۲ ساعت	
-	$0/88 \pm 0/13$	$28/35 \pm 4/24$	$32/19 \pm 0/44$	$6/95 \pm 2/5$	$0/01$	۱۰۰		
-	$0/88 \pm 0/08$	$46/34 \pm 3/02$	$52/96 \pm 3/86$	$30/32 \pm 0/43$	$0/1$			
$\sqrt{}$	$0/6 \pm 0/03$	$53/48 \pm 2/01$	$88/5 \pm 1/18$	$39/56 \pm 0/83$	$0/5$			
-	$1/81 \pm 0/59$	$27/95 \pm 10/74$	$21/23 \pm 1/7$	$13/11 \pm 4/86$	$0/01$		۷۲ ساعت	
\times	$1/76 \pm 0/08$	$51/56 \pm 7/74$	$29/19 \pm 3/49$	$32/16 \pm 0/66$	$0/01$	۵		
-	$1/05 \pm 0/16$	$52/28 \pm 7/54$	$49/79 \pm 1/01$	$33/14 \pm 0/67$	$0/1$			
-	$0/89 \pm 0/1$	$59/05 \pm 5/33$	$66/51 \pm 1/29$	$42/49 \pm 1/29$	$0/5$			
\times	$3/12 \pm 0/26$	$43/04 \pm 3/67$	$13/77 \pm 0/07$	$13/11 \pm 4/86$	$0/01$		۷۲ ساعت	
\times	$1/93 \pm 0/2$	$55/47 \pm 2/95$	$28/97 \pm 2/71$	$32/16 \pm 0/66$	$0/01$	۱۰۰		
\times	$1/35 \pm 0/1$	$56/12 \pm 2/9$	$41/73 \pm 0/95$	$33/14 \pm 0/67$	$0/1$			
$\sqrt{}$	$0/67 \pm 0/03$	$62/19 \pm 3/64$	$93/22 \pm 1/32$	$42/49 \pm 1/29$	$0/5$			

درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دپلیتازم با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت در شکل ۹ آمده است. مطابق شکل ۹، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین در همه‌ی غلظت‌های مورد مطالعه، با دپلیتازم (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر تداخلی است (جدول ۵). در سایر غلظت‌ها، درصد بقای تجربی با درصد بقای پیش‌بینی شده برابر بود.

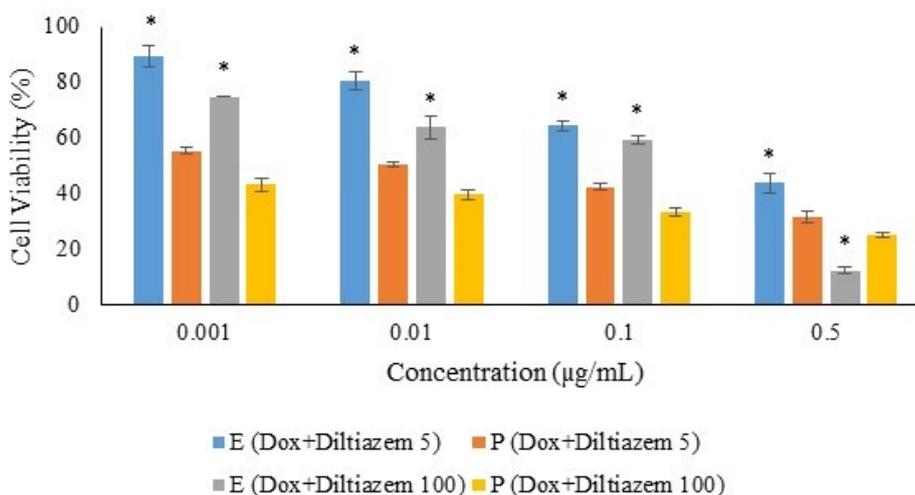
درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دپلیتازم با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت در شکل ۱۰ آمده است. درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین در همه‌ی غلظت‌های مورد مطالعه با دپلیتازم (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و هم‌چنین درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دپلیتازم (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، هر دو اثر تداخلی هستند (جدول ۵). در مقابل، درصد بقای تجربی ترکیب دوکسوروبیسین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دپلیتازم (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کم‌تر از درصد بقای پیش‌بینی شده است. براساس مقادیر CI به‌دست‌آمده، این اثر هم‌افزایی است (جدول ۵).

MCF-7 (48 Hours)



شکل ۹: نمودار درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دiltiazem با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی‌شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت دiltiazem با * نشان داده‌شده است. p-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته‌شده است (* $p < 0.05$).

MCF-7 (72 Hours)



شکل ۱۰: نمودار درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین و دiltiazem با دو غلظت ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت. E: درصد بقای تجربی و P: درصد بقای پیش‌بینی‌شده. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. اختلاف‌های معنادار درصد بقای سلولی P و E با غلظت ثابت دiltiazem با * نشان داده‌شده است. p-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته‌شده است (* $p < 0.05$).

جدول ۵: شاخص‌های اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین و دپلتیازم در ترکیب با یکدیگر بر رده سلولی MCF-7 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است. ($\sqrt{\text{هم‌افزایی}}$: $CI < 0.9$ ، - (بی‌اثر): $0.9 \leq CI \leq 1.1$ ، \times (نداخلی): $CI > 1.1$)

اثر	درصد مهار ترکیبی (پیش- بینی شده)	درصد مهار ترکیبی (تجربی)	درصد مهار دپلتیازم	درصد مهار دوکسوروبیسین	نام ترکیب		زمان	رده سلولی
					دوکسوروبیسین	دپلتیازم		
-	۰/۶ ± ۰/۲۲	۱۵/۹۸ ± ۵/۰۸	۲۷/۱۴ ± ۲/۱۲	۸/۳۳ ± ۰/۵۳	۰/۰۰۱		MCF-7	
-	۰/۷۱ ± ۰/۱۴	۲۳/۵ ± ۴/۸۸	۳۳/۰۳ ± ۰/۱۵	۱۶/۵۵ ± ۰/۰۴	۰/۰۰۱	۵		
-	۰/۷۲ ± ۰/۱۸	۲۴/۶۹ ± ۵/۲۷	۳۴/۴۱ ± ۱/۰۹	۱۷/۸۶ ± ۰/۵۶	۰/۰۰۱	۵		
-	۰/۹۳ ± ۰/۱۶	۴۲/۳۷ ± ۵/۹۵	۴۵/۵۲ ± ۲/۰۱	۳۷/۲۵ ± ۲/۵۷	۰/۰۰۱	۵		
×	۱/۹۳ ± ۰/۵۹	۴۳/۴۶ ± ۴/۰۲	۲۳/۴۱ ± ۴/۳۵	۸/۳۳ ± ۰/۵۳	۰/۰۰۱	۱۰۰		
×	۱/۶۱ ± ۰/۰۹	۴۸/۵۴ ± ۳/۳۶	۳۰/۰۸ ± ۱/۳۹	۱۶/۵۵ ± ۰/۰۴	۰/۰۰۱	۱۰۰		
×	۱/۳۵ ± ۰/۱۵	۴۹/۳۵ ± ۳/۲۳	۳۶/۶۶ ± ۱/۶۳	۱۷/۸۶ ± ۰/۵۶	۰/۰۰۱	۱۰۰		
×	۱/۲۱ ± ۰/۱۲	۶۱/۳۴ ± ۲/۰۴	۵۰/۹۸ ± ۵/۱	۳۷/۲۵ ± ۲/۵۷	۰/۰۰۱	۱۰۰		
×	۴/۵۸ ± ۱/۲۹	۴۴/۶۶ ± ۱/۲۳	۱۰/۴۶ ± ۳/۸۱	۲۷/۸۱ ± ۱/۸	۰/۰۰۱	۵		
×	۲/۶۳ ± ۰/۵۱	۴۹/۴۳ ± ۰/۷۷	۱۹/۲۳ ± ۳/۱۶	۳۴/۰۴ ± ۱/۲۳	۰/۰۰۱	۵		
×	۱/۶۲ ± ۰/۰۵	۵۷/۵۸ ± ۱/۰۸	۳۵/۵ ± ۱/۸۳	۴۴/۶۸ ± ۱/۰۴	۰/۰۰۱	۵		
×	۱/۲۲ ± ۰/۱	۶۸/۱۸ ± ۲/۰۴	۵۶/۱۸ ± ۳/۳۹	۵۸/۵ ± ۲/۴۸	۰/۰۰۱	۵		
×	۲/۲۶ ± ۰/۱	۵۶/۶۶ ± ۲/۴۳	۲۵/۰۶ ± ۰/۰۹	۲۷/۸۱ ± ۱/۸	۰/۰۰۱	۱۰۰		
×	۱/۶۹ ± ۰/۲۲	۶۰/۴۱ ± ۱/۹۴	۳۶/۱۶ ± ۴/۳۶	۳۴/۰۴ ± ۱/۲۳	۰/۰۰۱	۱۰۰		
×	۱/۶۴ ± ۰/۰۳	۶۶/۱۸ ± ۱/۵۵	۴۰/۷۳ ± ۱/۴۱	۴۴/۶۸ ± ۱/۰۴	۰/۰۰۱	۱۰۰		
√	۰/۸۶ ± ۰/۰۲	۷۵/۱۳ ± ۰/۸۵	۸۷/۶۷ ± ۱/۳۴	۵۸/۵ ± ۲/۴۸	۰/۰۰۱	۱۰۰		

۵- بحث

سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان است (۱۸). از جمله داروهای رایج برای درمان سرطان سینه، دوکسوروبیسین است که به دلیل قدرت ضدسرطانی بالای خود شناخته شده است. با این حال، استفاده از دوکسوروبیسین با مشکلاتی نظیر سمیت قلبی و مقاومت دارویی همراه است که این دارو را در درمان سرطان محدود می‌کند (۱۹). تحقیقات زیادی برای درک مکانیسم‌های سمیت قلبی دوکسوروبیسین انجام شده که از جمله آن‌ها می‌توان به تشکیل رادیکال‌های آزاد و اختلال در مدیریت کلسیم اشاره کرد (۲۰). در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی برای یافتن ترکیبات ضد سرطانی صورت گرفته است. بسیاری از این ترکیبات با داشتن سازوکارهای مختلف مانند استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، ایمنی درمانی در درمان سرطان هنوز جهت کاربردهای بالینی مورد تأیید قرار نگرفته‌اند و تأیید نهایی آن‌ها به سرمایه‌گذاری و تحقیقات بیشتر نیاز دارد که مسیری طولانی است. یکی از مسیرهای کوتاه برای یافتن داروهای ضد سرطانی جدید، جستجوی این ترکیبات در میان داروهای تأیید شده برای بیماری‌های غیرسرطان است (۲۱، ۲۲). آملودیپین و دپلتیازم از داروهای کاهنده‌ی فشار خون هستند که با انسداد کانال‌های کلسیمی مانع ورود کلسیم به‌داخل سلول و انقباض عضلانی می‌شوند. این فرآیند سبب شل شدن رگ‌های خونی و در نهایت کاهش فشار خون می‌شود. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف آملودیپین و دپلتیازم هرکدام به تنهایی بر روی دو رده‌ی سلول سرطان سینه انسانی MDA-MB-231 و MCF-7 در دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. از دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج نشان داد افزایش غلظت داروها و زمان باعث القای مرگ در دو رده‌ی سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 می‌شود. سلول‌های MDA-MB-231 سلول‌هایی با قدرت تهاجمی بالا و فاقد گیرنده‌ی استروژن می‌باشند

ولی سلول‌های MCF-7 دارای گیرنده استروژن با قدرت تهاجمی پایین هستند (۲۳). نشان داده شده است که سلول‌های MCF-7 تکثیر وابسته به کلسیم را دارند (۲۴، ۲۵). همچنین در این پژوهش، فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ به‌عنوان عوامل اجرایی آپوپتوزیس در لیز سلول‌های تیمار شده با آملودیپین و دیلتیازم بررسی شد. افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در هر دو رده‌ی سلولی تیمار شده با آملودیپین و سلول‌های MCF-7 تیمار شده با دیلتیازم مشاهده شد، اما در سلول MDA-MB-231 تیمار شده با دیلتیازم فعالیت کاسپاز به‌شدت نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که ممکن است به‌دلایل مختلفی باشد. یکی از فرضیه‌ها، القای مرگ سلولی مستقل از کاسپاز-۷/۳ توسط دیلتیازم است. اظهار نظر قطعی در این زمینه نیازمند انجام آزمایش‌های بیشتر است.

تایلور و همکاران (۲۶) نشان دادند که مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی (CCBs) شامل آملودیپین، دیلتیازم و وراپامیل تکثیر سلول‌های سرطان پستان انسانی HT-39 را به شیوه‌ای وابسته به غلظت مهار کردند (۲۶). کلسیم به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهم بسیاری از عملکردهای ضروری سلولی شناخته می‌شود و در اکثر سلول‌های در حال تکثیر کلسیم به‌عنوان یک میتوزن عمومی برای تحریک رشد عمل می‌کنند. سایر پیام‌رسان‌های مرتبط با اثرات میتوزنیک شامل فسفولیپیدهای تولید شده و دی‌آسیل گلیسرول هستند. نشان داده شده است که در حضور دی‌آسیل گلیسرول، پروتئین کیناز C با افزایش کلسیم آزاد سیتوزولی فعال می‌شود. علاوه بر این، نشان داده شده است که افزایش گذرا در کلسیم سیتوزولی باعث فعال شدن گیرنده کلسیم کالمودولین می‌شود که ممکن است نقش مهمی در تنظیم تکثیر داشته باشد. متکالف و همکاران (۲۷) گزارش کردند که تومورها به‌طور کلی دارای سطوح غیرعادی کلسیم بالایی هستند. پیشنهاد شده است که سطح بالای کلسیم به‌دلیل هجوم بیش از حد کلسیم خارج سلولی یا توانایی میتوکندریایی نتوپلاستیک برای حفظ غلظت‌های بالاتر کلسیم است. این احتمال وجود دارد که سطوح بالای تولید کلسیم درون سلولی باعث افزایش فعال شدن سیستم پیام‌رسان دوم کلسیم شده و در نتیجه افزایش رشد بیش از حد برخی از سلول‌های بدخیم ایجاد شود (۲۵، ۲۷). نشان داده شده است که رده‌های سلولی سرطان سینه انسانی HT-39 و MCF-7 و رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک انسانی HL-60 و رده سلولی لوسمی L1210 تکثیر وابسته به کلسیم را نشان می‌دهند (۲۴، ۲۵). اوکازاکی و همکاران (۲۸) این نتایج را تایید کرده‌اند و نشان دادند که رده سلولی HL-60 رشد وابسته به کلسیم خارج سلولی را نشان می‌دهد. علاوه بر این، یوندا و همکاران (۲۹) نشان دادند که رشد یک رده سلولی سرطان پستان (VX2) به‌شدت توسط غلظت کلسیم خارج سلولی تنظیم می‌شود. با این حال، سایر مطالعات نشان داده‌اند که حذف کلسیم از محیط رشد سلولی برخی از رده‌های سلولی تومورزا که از فیبروبلاست‌های تغییر یافته، هماتوم کبدی، سلول‌های 3T3 جنین موش، و سلول‌های تخمدان انسان به دست می‌آیند، تغییری در رشد سلولی ایجاد نمی‌کند (۳۰، ۳۱).

دوکسوروبیسین از داروهای پرمصرف در شیمی‌درمانی افراد مبتلا به سرطان سینه است. با توجه به شیوع بالای بیماری فشار خون در جهان، افراد مبتلا به سرطان و تحت درمان با شیمی‌درمانی ممکن است از داروهای مسدودکننده‌ی کانال‌های کلسیمی برای کنترل فشار خون استفاده کنند. با توجه به این‌که آملودیپین و دیلتیازم با انسداد کانال‌های کلسیمی قادر به القای مرگ در سلول‌های سرطانی هستند، در این پژوهش اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین در حضور غلظت‌های پائین آملودیپین و دیلتیازم بر روی هر دو رده‌ی سلولی مورد بررسی قرار گرفت. از آملودیپین با غلظت‌های ۵ و ۲۵ برای بررسی اثر آن در حضور غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین استفاده شد.

یافته‌ها نشان داد که آملودیپین به‌طور معناداری اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این تاثیر بسته به غلظت و مدت زمان تیمار متغیر است. آملودیپین در غلظت‌های پایین‌تر، توانایی کاهش مرگ سلولی ناشی از دوکسوروبیسین را داشته و در غلظت‌های بالاتر، به علت افزایش غلظت دوکسوروبیسین، قادر به مهار اثرات سمی آن نیست. آملودیپین یک عضو

از زیرگروه دی‌هیدروپیریدینی مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیم است. دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی غشایی - لیپیدی قوی است که کاملاً مستقل از مدولاسیون کانال کلسیم است (۳۲). ساتوشی یاماناکا و همکاران (۲۰) نشان دادند که آملودیپین به طور قابل توجهی آپوپتوزیس ناشی از دوکسوروبیسین را در سلول‌های قلبی با سرکوب مسیر آپوپتوزیس میتوکندری از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی خود مهار می‌کند. محمد القودا (۳۳) همسو با نتایج ما گزارش کردند که آملودیپین به طور قابل توجهی رشد سلول‌های سرطان سینه انسان MDA-MB-231 و MCF-7 را به روشی وابسته به غلظت مهار می‌کند و از تشکیل کلونی در سلول‌های MCF-7 جلوگیری می‌کند. مطالعات اخیر همچنین اثرات مهار آملودیپین و سایر CCBها را بر مسیر 2/ERK1 در سرطان معده، کبد، تخمدان و پوست نشان داده است. روی هم رفته، پژوهش‌ها اثرات سرکوب‌کننده آملودیپین را بر تکثیر سلولی، مقاومت به آپوپتوزیس و پتانسیل تومورزایی از طریق مهار پروتئین‌های سیگنال‌دهنده اصلی مانند 2/ERK1 و Bcl-2 برجسته می‌کنند. علاوه بر این، درمان با آملودیپین منجر به افزایش سطح کاسپاز ۳ و ۷ در سلول‌های MDA-MB-231 شد که با کاهش پروتئین ضدآپوپتوزیس Bcl-2 همراه بود. آملودیپین با کاهش بیان اینترگرین $\beta 1$ قدرت تهاجمی سلول‌های MDA-MB-231 کم می‌کند (۳۳). علاوه بر این، وونگ و همکاران (۳۴) گزارش کردند که تیمار سلول‌های سرطانی با مهارکننده‌های کانال کلسیم در غلظت‌های بالا سبب القای آپوپتوزیس مستقل از کاسپاز در سلول‌های سرطان سینه می‌شوند. در مطالعه لی لین لیو و همکاران (۳۵) مقایسه نقش آنتاگونیست‌های کلسیم دی‌هیدروپیریدین نیفیدیپین، نیترنیدیپین، آملودیپین بر سمیت کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین در موش صحرایی با استفاده از رویکردهای بیوشیمیایی، هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی بررسی کردند. نتایج این مطالعه به وضوح نشان داد که آملودیپین سمیت کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش می‌دهد در حالی که نیفیدیپین و نیترنیدیپین هیچ تاثیری نداشتند.

دیلتیازم از دیگر داروهای مسدودکننده‌ی کانال‌های کلسیمی است که برای کاهش فشار خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. گزارش شده است که قدرت دیلتیازم در کاهش فشار خون کم‌تر از آملودیپین است (۳۶). دیلتیازم نیز اثرات مشابهی با آملودیپین داشته است. این دارو در غلظت‌های مختلف و بسته به مدت زمان تیمار، اثرات متقابلی بر سمیت سلولی دوکسوروبیسین داشت. همدان المالکی و همکاران (۳۷) گزارش کردند دیلتیازم با برگرداندن مقاومت دارویی در سلول‌های سرطان سینه سمیت سلولی دوکسوروبیسین را برای سلول‌ها افزایش می‌دهد و در عین حال سمیت قلبی دوکسوروبیسین را کاهش می‌دهد. یکی از نکات قابل توجه در گزارش فوق این است که ارزیابی سمیت قلبی دوکسوروبیسین در آن، با اندازه‌گیری سطح آنزیمی کراتین کیناز و مالون دی‌آلدهید و همچنین سطح گلوکوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موش‌های تحت تیمار با دوکسوروبیسین در حضور دیلتیازم بود در حالی که ارزیابی توانایی دیلتیازم در برگرداندن مقاومت دارویی دوکسوروبیسین با استفاده از سلول‌های MCF-7 مقاوم به دوکسوروبیسین بود. دیلتیازم یک مسدودکننده کانال‌های کلسیمی به‌عنوان یکی از مهارکننده‌های P-gp (P) - گلیکوپروتئین شناخته می‌شود که باعث کاهش سمیت قلبی ناشی از عوامل شیمی‌درمانی می‌شود. هشام المهدی و همکاران (۳۸) نشان دادند که دیلتیازم به‌طور هم‌افزایی سمیت سلولی جمسیتابین یا FU-5 (۵ فلوئورواوراسیل) را در برابر سلول‌های سرطانی پانکراس، احتمالاً از طریق مهار بیان P-gp، افزایش می‌دهد. بنابراین، درمان هم‌زمان دیلتیازم با جمسیتابین یا FU-5 ممکن است برای بهبود نتیجه درمانی سرطان پانکراس مفید باشد. ظرفیت دیلتیازم برای القای آپوپتوزیس و ژن‌های پروآپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی قبلاً گزارش شده است. به‌عنوان مثال مسون و همکاران (۷) گزارش کردند که اختلال در

سطح کلسیم داخل سلولی توسط مسدودکننده‌های کانال کلسیم با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مرتبط است. همچنین، کادور و همکاران (۳۹)، بیان کردند که اختلال در سطح کلسیم درون سلولی، چندین فرآیند آسیب‌رسان به سلول مانند آپوپتوزیس را به کار می‌گیرد. مسدودکننده‌های کانال کلسیم می‌توانند باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و ژن پروآپوپتوزیس Bax شوند که با نتایج پژوهش ما همسو است (۳۸). رده سلولی HL-60 یک رده سلولی لوسمی انسانی است که برای تحقیقات آزمایشگاهی در مورد تشکیل سلول‌های خونی و فیزیولوژی استفاده شده است. اثرات مسدودکننده‌های کانال کلسیم (CCBs) وراپامیل و دیلتیازم بر سمیت روبراتوکسین B در سلول‌های HL-60 مورد بررسی قرار گرفت. هیتوشی ناگاشیما و همکاران (۴۰) گزارش کردند تیمار سلول‌های HL-60 با روبراتوکسین B باعث جوانه‌زدن، تکه‌تکه شدن و متراکم شدن سلول‌ها شد. میزان این تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌هایی که هم‌زمان با روبراتوکسین B و CCBs (دیلتیازم یا وراپامیل) تیمار شده بودند بسیار کمتر از سلول‌هایی بود که فقط با روبراتوکسین B تیمار شده بودند. CCBها سمیت روبراتوکسین B را بر روی زنده ماندن سلولی به دلیل عملکرد محافظتی خود کاهش دادند. چن و همکاران (۳۶) گزارش کردند که دیلتیازم متاستاز را در سلول‌های سرطان سینه مهار می‌کند (۳۶).

۶- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که آملودیپین و دیلتیازم، علاوه بر اثرات کاهشنده فشار خون، توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی را دارند. این داروها با مهار کانال‌های کلسیمی، قادر به القای مرگ سلولی در رده‌های سلولی سرطان سینه هستند. از طرفی، تأثیر این داروها به غلظت و مدت زمان تیمار بستگی دارد که نیازمند تحقیقات بیشتر برای تعیین دوزهای بهینه در درمان سرطان است. هم‌چنین بررسی اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین در حضور داروهای مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی (آملودیپین و دیلتیازم) نشان داد که این داروها نه تنها می‌توانند مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی سینه القا کنند بلکه می‌توانند سمیت سلولی دوکسوروبیسین را تحت تأثیر قرار دهند (جدول ۶). بنابراین، استفاده هم‌زمان از مسدودکننده‌های کانال کلسیمی با دوکسوروبیسین ممکن است اثربخشی درمانی آن را تحت تأثیر قرار دهد و لزوم بررسی دقیق‌تر این تعاملات دارویی در مطالعات آینده را برجسته می‌سازد.

جدول ۶: نتایج اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین در حضور مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی (×: اثر تداخلی، -: بی‌اثر، √: اثر هم‌افزایی).

دارو	MCF-7								MDA-MB-231							
	۷۲ ساعت				۴۸ ساعت				۷۲ ساعت				۴۸ ساعت			
	۰.۵ (µg/mL)		۰.۱ (µg/mL)		۰.۰۱ (µg/mL)		۰.۰۰۱ (µg/mL)		۰.۵ (µg/mL)		۰.۱ (µg/mL)		۰.۰۱ (µg/mL)		۰.۰۰۱ (µg/mL)	
آملودیپین (5 µg/mL)	×	×	×	×	×	×	×	-	-	-	×	×	-	×	-	-
آملودیپین (25 µg/mL)	√	×	×	×	√	-	×	×	√	×	×	×	√	×	-	-
دیلتیازم (5 µg/mL)	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	×	-	×	×	×	-
دیلتیازم (100 µg/mL)	√	×	×	×	×	×	×	×	√	×	×	×	√	-	-	-

۷- تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی‌ارشد تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام شد. از دانشگاه کردستان کمال تشکر و قدردانی می‌شود. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

۸- منابع

1. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(6): 408-18.
2. Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast cancer: conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. Breast cancer: basic and clinical research. 2015; 9: BCBCR. S29420.
3. Azoulay L, Soldera S, Yin H, Bouganim N. Use of calcium channel blockers and risk of breast cancer: a population-based cohort study. Epidemiology. 2016; 27(4): 594-601.
4. Eisenberg MJ, Brox A, Bestawros AN. Calcium channel blockers: an update. The American journal of medicine. 2004; 116(1): 35-43.
5. WM Yousef WM, Omar AH, Morsy MD, Abd El-Wahed MM, Ghanayem NM. The mechanism of action of calcium channel blockers in the treatment of diabetic nephropathy. International Journal of Diabetes and Metabolism. 2005; 13(2): 76-82.
6. Jacquemet G, Baghirov H, Georgiadou M, Sihto H, Peuhu E, Cettour-Janet P, et al. L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. Nature communications. 2016; 7(1): 1-17.
7. Mason RP. Calcium channel blockers, apoptosis and cancer: is there a biologic relationship? Journal of the American College of Cardiology. 1999; 34(7): 1857-66.
8. Mason RP. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential. Cancer. 1999; 85(10): 2093-102.
9. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: methods and protocols. 2011: 237-45.
10. Duarte D, Vale N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. Current research in pharmacology and drug discovery. 2022; 3: 100110.
11. Wang S, Zhang H, Cheng L, Evans C, Pan CX. Analysis of the cytotoxic activity of carboplatin and gemcitabine combination. Anticancer Res. 2010; 30(11): 4573-8.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976; 72: 248-54.
13. Guerriero E, Sorice A, Capone F, Storti G, Colonna G, Ciliberto G, et al. Combining doxorubicin with a phenolic extract from flaxseed oil: Evaluation of the effect on two breast cancer cell lines. International journal of oncology. 2017; 50(2): 468-76.

14. Alqudah MAY, Al-Samman R, Azaizeh M, Alzoubi KH. Amlodipine inhibits proliferation, invasion, and colony formation of breast cancer cells. *Biomedical reports*. 2022; 16(6): 50.
15. Taylor JM, Simpson RU. Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. *Cancer research*. 1992; 52(9): 2413-8.
16. Nakatsumi H, Yonehara S. Identification of functional regions defining different activity in caspase-3 and caspase-7 within cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285(33): 25418-25.
17. Twiddy D, Cohen GM, MacFarlane M, Cain K. Caspase-7 is directly activated by the ~ 700-kDa apoptosome complex and is released as a stable XIAP-caspase-7 ~ 200-kDa complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(7): 3876-88.
18. Toğaçar M, Ergen B, Cömert Z. Application of breast cancer diagnosis based on a combination of convolutional neural networks, ridge regression and linear discriminant analysis using invasive breast cancer images processed with autoencoders. *Medical hypotheses*. 2020; 135: 109503.
19. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012; 52(6): 1213-25.
20. Yamanaka S, Tatsumi T, Shiraishi J, Mano A, Keira N, Matoba S, et al. Amlodipine inhibits doxorubicin-induced apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003; 41(5): 870-8.
21. Rojas EA, Corchete LA, San-Segundo L, Martínez-Blanch JF, Codoner FM, Paíno T, et al. Amiloride, an old diuretic drug, is a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2017; 23(21): 6602-15.
22. Wuerth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T, Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug discovery today*. 2016; 21(1): 190-9.
23. Marinello PC, Panis C, Silva TNX, Binato R, Abdelhay E, Rodrigues JA, et al. Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 5864.
24. Cory JG, Carter GL, Karl RC. Calcium ion-dependent proliferation of L1210 cells in culture. *Biochemical and biophysical research communications*. 1987; 145(1): 556-62.
25. Simpson RU, Arnold AJ. Calcium antagonizes 1, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of breast cancer cell proliferation. *Endocrinology*. 1986; 119(5): 2284-9.
26. Taylor J, Simpson R. Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. *Cancer research*. 1992; 52(9): 2413-8.
27. Metcalfe JC, Pozzan T, Smith GA, Hesketh TR. A calcium hypothesis for the control of cell growth. *Biochem Soc Symp*. 1980; 45: 1-26.
28. Okazaki T, Mochizuki T, Tashima M, Sawada H, Uchino H. Role of intracellular calcium ion in human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation. *Cancer research*. 1986; 46(12_Part_1): 6059-63.
29. Yoneda T, Kitamura M, Ogawa T, Aya S-I, Sakuda M. Control of VX2 carcinoma cell growth in culture by calcium, calmodulin, and prostaglandins. *Cancer research*. 1985; 45(1): 398-405.

30. Balk SD, Polimeni PI, Hoon BS, LeSturgeon DN, Mitchell RS. Proliferation of Rous sarcoma virus-infected, but not of normal, chicken fibroblasts in a medium of reduced calcium and magnesium concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979; 76(8): 3913-6.
31. Swierenga S, Whitfield J, Morris H. The reduced extracellular calcium requirement for proliferation by neoplastic hepatocytes. *In vitro*. 1978; 14: 527-35.
32. Packer M, O'Connor CM, Ghali JK, Pressler ML, Carson PE, Belkin RN, et al. Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. *New England Journal of Medicine*. 1996; 335(15): 1107-14.
33. Alqudah MA, Al-Samman R, Azaizeh M, Alzoubi KH. Amlodipine inhibits proliferation, invasion, and colony formation of breast cancer cells. *Biomedical reports*. 2022; 16(6): 50.
34. Wong B-S, Chiu L-Y, Tu D-G, Sheu G-T, Chan T-T. Anticancer effects of antihypertensive L-type calcium channel blockers on chemoresistant lung cancer cells via autophagy and apoptosis. *Cancer Management and Research*. 2020: 1913-27.
35. Liu L-L, Li Q-X, Xia L, Li J, Shao L. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology*. 2007; 231(1): 81-90.
36. Horwitz LD, Weinberger HD, Clegg L. Comparison of amlodipine and long-acting diltiazem in the treatment of mild or moderate hypertension. *American journal of hypertension*. 1997; 10(11): 1263-9.
37. Al-malky HS, Damanhoury ZA, Al Aama JY, Al Qahtani AA, Ramadan WS, AlKreathy HM, et al. Diltiazem potentiation of doxorubicin cytotoxicity and cellular uptake in human breast cancer cells. *Breast Cancer Management*. 2019; 8(4): BMT31.
38. El-Mahdy HA, El-Husseiny AA, Kandil YI, El-Din AMG. Diltiazem potentiates the cytotoxicity of gemcitabine and 5-fluorouracil in PANC-1 human pancreatic cancer cells through inhibition of P-glycoprotein. *Life sciences*. 2020; 262: 118518.
39. Kaddour-Djebbar I, Lakshmikanthan V, Shirley RB, Ma Y, Lewis RW, Kumar MV. Therapeutic advantage of combining calcium channel blockers and TRAIL in prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2006; 5(8): 1958-66.
40. Nagashima H, Goto T. Calcium channel blockers verapamil and diltiazem impaired rubratoxin B-caused toxicity in HL60 cells. *Toxicology letters*. 2000; 118(1-2): 47-51.