Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

# Comparison of the effect of topotecan on the activity of nitric oxide synthase in the tumor cell line Hela and normal Hek cell line

**Azampour S[a] , Naji T*[b], Ahmadi R[c]**

[a] Student of pharmacy, Department of Basic Sciences, faculty of pharmacy and pharmaceutical Sciences, Tehran Medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[b] Department of Basic Sciences, faculty of pharmacy and pharmaceutical sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[c]Department of physiology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

**Citation**: Azampour S , Naji T, Ahmadi R. Comparison of the effect of topotecan on the activity of nitric oxide synthase in the tumor cell line Hela and normal Hek cell line. Journal of Cell and Tissue. 13(1) (2022) 1-11.

https://10.52547/JCT/13.1.1

KEYWORDS

Cervical cancer, Nitric oxide synthase, Tumor cell Hela, Topotecan

ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study was the effect of topotecan on the activity of nitric oxide synthase in the tumor cell line Hela in comparison with the normal Hek cell line.

**Material and Methods:** For this purpose, Hela and Hek cells were randomly divided into the control groups and treatment groups exposed to 7.8, 15.6,31.25, 62.5,125, and 250 µg/ml of topotecan for 24,48,72 hr. Then, the data analysis of plate supernatant was evaluated the number of live cells using the MTT method, grease reaction as well as Real-Time PCR method and the data were compared using the one-way ANOVA statistical method between groups.

**Results:** The viability of Hela cells exposed to 250, 125, and 61.5 µg/ml of topotecan significantly decreased in comparison to the control group in 24, 48, and 72 h ($p \leq 0.05$). Also, the level of nitric oxide in Hela cells that were exposed to 250 µg/ml drug increased ½ times in comparison to the control group.

**Conclusion:** Topotecan has an inhibitory effect on cervical cancer cells. Also, topotecan increased the level of nitric oxide in Hela cells and this amount of nitric oxide kills the cells in cervical cancer cells.

* Corresponding author. Tel.: +98-2122602059; ; Fax: +98-2122602059
E-mail address: tnaji2002@gmail.com/naji_t@iaups.ac.ir
DOI: https://10.52547/JCT/13.1.1
Received: January 4, 2020; ; Received in revised form: February 19, 2022; Accepted: February 23, 2022
© Author

سلول و بافت، دوره ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۱ تا ۱۱

سلول و بافت

# مقایسه اثر داروی توپوتکان بر فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در رده سلولی توموری (Hela) و رده سلولی نرمال (Hek)

سمانه اعظم‌پور[۱]، طاهره ناجی[۲*]، رحیم احمدی[۳]

[۱] دانشجوی داروسازی ، گروه علوم پایه ، دانشکده داروسازی و علوم دارویی ، علوم پزشکی تهران ، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران ، ایران.

[۲] دانشیارگروه علوم پایه ، دانشکده داروسازی و علوم دارویی ، علوم پزشکی تهران ، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران ، ایران.

[۳] استادیارگروه فیزیولوژی ، واحد همدان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، همدان ، ایران.

**واژگان کلیدی**

توپوتکان، سرطان دهانه رحم، نیتریک اکساید سنتاز، رده سلول سرطانی هلا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴

**چکیده**

**هدف:** منظور از انجام این پژوهش بررسی اثر داروی توپوتکان بر میزان فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز سلول‌های دهانه رحم (Hela) در مقایسه با سلول‌های نرمال (Hek) بود. **مواد و روش‌ها:** بدین منظور سلول‌های سرطانی دهانه رحم (Hela) و سلول نرمال Hek در گروه‌های کنترل و تیمار دسته‌بندی شدند. گروه‌ها با غلظت‌های ۷/۸ ،۱۵/۶، ۳۱/۲۵ ، ۶۲/۵ ، ۱۲۵و۲۵۰ میکرو گرم در هر میلی‌لیتر از داروی توپوتکان در مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. سپس داده‌های حاصل از آنالیز سوپ رویی پلیت‌ها برای بررسی میزان سلول‌های زنده با استفاده از روش MTT، واکنش گریس و هم‌چنین روش Real Time PCR بررسی و داده‌ها با استفاده از روش آماری واریانس یک‌طرفه بین گروه‌ها مقایسه شد.**نتایج:** نتایج حاصل از تست MTT نشان‌دهنده این مورد است که داروی توپوتکان (در غلظت‌های متفاوت از دارو) باعث مهار رشد و تقسیم سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌شود ($p\leq ۰/۰۵$)، هم‌چنین بیان ژن نیتریک اکساید در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵۰ ماکروگرم در ۱ میلی‌لیتر توپوتکان نسبت به سلول‌های بدون تیمار ۱,۲ برابر افزایش یافته است.**نتیجه‌گیری:** بین اثرات سایتوتوکسیک توپوتکان و میزان نیتریک اکساید رابطه مستقیمی وجود دارد و با افزایش نیتریک اکساید در سلول‌های سرطانی مرگ این سلول‌ها افزایش می‌یابد.

## ۱- مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که در جوامع امروزی دیده می‌شود. سرطان در اثر تقسیم سلولی نا منظم سلول‌ها شروع شده و سلول‌های سرطانی به‌صورت تهاجمی به نقاط دیگر بدن می‌روند که در صورت عدم درمان منجر به مرگ می‌شود. تشخیص زودرس و درمان درست و سریع بسیار حیاتی می‌باشد. سرطان دهانه رحم یکی از سرطان‌های شایع در زنان می‌باشد. هر ساله بیش از ۵۰۰ هزار زن با سرطان دهانه رحم شناسایی شده که منجر به ۳۰۰ هزار مرگ در جهان می‌شود (۱، ۲). عواملی که ممکن است باعث سرطان دهانه رحم شوند شروع ارتباط جنسی در سنین پایین، شرکای جنسی متعدد، سابقه عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (Human papilloma virus) (HPV)، استعمال دخانیات، تعداد زایمان زیاد، ابتلا به بیماری‌های مقاربتی می‌باشد (۳). سرطان دهانه رحم جز معدود سرطان‌هایی است که می‌توان آن را در مرحله پیش از

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱-۲۲۶۰۲۰۵۹؛ فکس: ۰۲۱۲۲۶۰۲۰۵۹

آدرس پست الکترونیک tnaji2002@gmail.com/naji_t@iaups.ac.ir

بدخیمی با انجام تست پاپ اسمیر تشخیص داد (۴). تبدیل بافت پیش سرطانی ناشی از عفونت ویروسی HPV به‌سمت سرطان تهاجمی دهانه رحم سال‌های طولانی وقت نیاز دارد و به‌این‌دلیل تشخیص زود هنگام با انجام تست پاپ اسمیر و انجام تست کولپوسکوپی و درمان اولیه زیر نظر متخصص زنان می‌تواند از تهاجمی شدن و گسترش سرطان دهانه رحم به بافت‌های اطراف ممانعت کند (۵). راه‌های درمان این بیماری جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی است که بستگی به وضعیت بیماری دارد (۶). داروهای ضد التهاب استروئیدی باعث القای آپوپتوزیس در انواع سلول‌های سرطانی مانند سلول‌های سرطانی روده بزرگ، سرطان پستان، سرطان پروستات و سرطان خون می‌شوند (۷). توپوتکان یک داروی ضد سرطان می‌باشد که با رشد و گسترش سلول‌های سرطانی در بدن مقابله می‌کند. این دارو برای درمان سرطان تخمدان، سرطان سلول‌های کوچک ریه، سرطان گردنه رحم پیشرفته استفاده می‌شود. توپوتکان مانند ایرینوتکان یک مشتق نیمه سنتتیک آلکالوئید کامپتوتسین (camptothecin) است که فعالیت آنتی نئوپلاستیک خود را از طریق مهار توپوایزومراز ۱ اعمال می‌کند (۸). توپوایزومراز ۱ یک آنزیم هسته‌ای است که با ایجاد فشار کششی درDNA باعث باز شدن دو رشته DNA شده و به رونویسی دو رشته‌ای کمک می‌کند (۹). اتصال توپوتکان به توپوایزومراز ۱ باعث جلوگیری از عمل‌کرد توپوایزومراز ۱ در رونویسی رشته DNA شده و تجمع کمپلکس‌های توپوایزومراز ۱ باعث واکنش معروف به محرک‌های آپوپتیک می‌شود. این اختلال مانع تکثیر DNA و درنهایت منجر به مرگ سلول سرطانی می‌شود. توپوتکان اغلب در ترکیب با paclitaxel به‌عنوان خط اول درمان در سرطان سلول‌های کوچک ریه استفاده می‌شود (۱۰). نیتریک‌اکسید یک رادیکال آزاد موثر در مهار رشد سلول‌های سرطانی است و e NOS (Endothelial NOS) می‌تواند وقایع مرتبط با سرطان (رگ‌زایی، مرگ خودبه‌خود سلول، چرخه سلولی، تهاجم) را تنظیم و رشد سلول سرطانی را کنترل کند (۱۱). هم‌چنین NO می‌تواند با سوپراکساید واکنش داده و واسطه‌های ثانویه نیرومندی مانند پروکسی نیتریت (Peroxynitrite) و دی اکسید نیتروژن (NO2: Dioxide Nitrogen)را تشکیل دهد که این واسطه‌ها اثرات سیتوتوکسیک (اثر سمی بر سلول)خود را از طریق تاثیر بر آسیب DNA و تغییرات زنجیره پروتئین اعمال می‌کنند و در نتیجه مرگ سلولی ایجاد می‌شود. میزان کم NO که توسط ایزوفرم eNOS تولید می‌شود، بیماری‌زا است و می‌تواند سلول‌های نرمال را تبدیل به سلول‌های سرطانی بکند (۱۲). ایزوفورم eNOS درالتهاب به‌عنوان یک میانجی کلیدی عمل می‌کند، ولی براساس نوع سلول و بافت مورد بررسی، eNOS دارای نقش دوگانه پیش التهابی (شروع کننده التهاب) وضد التهابی(سرکوب کننده التهاب) است. NO در بدن نقش اساسی در التهاب و هم‌چنین تعدیل نفوذپذیری عروق و رگ‌زایی دارد. مشاهدات بالینی متعدد نشان می‌دهند که در هر دو نوع تومور سلول مخاطی و عروقی اختلال در تنظیم بیان ژن eNOS وجود دارد و عوامل پیش‌ساز تومور (به‌عنوان مثال در رحم استروژن عامل محرک رشد سلول‌های سرطانی می‌شود) باعث القای بیان ژن eNOS در سلول‌های تومور می‌شود (۱۳). نیتریک‌اکسید در آپوپتوزیس سلولی (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) می‌تواند به‌عنوان یک عامل آپوپتوتیک و نیز عامل آنتی آپوپتوتیک عمل کند (۱۴). هدف از این تحقیق بررسی اثر نیتریک اکساید در رشد و یا مهار رشد سلول های سرطانی و هم‌چنین بررسی اثر داروی توپوتکان بر افزایش نیتریک اکساید سنتاز و مرگ سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌باشد.

## 2- مواد و روش‌ها

پودر خالص توپوتکان از شرکت دارویی داروهای تک نسخه‌ای تهیه شد. رده سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela و رده سلولی نرمال کلیه جنین Hek از انستیتو پاستور خریداری شده است. این سلول‌ها در تانک نیتروژن در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند .سلول‌های Hek به‌عنوان گروه کنترل استفاده شد. در این مطالعه سلول‌های Hela و Hek در گروه‌های کنترل و تیمار با غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ ماکروگرم در یک میلی‌لیتر از داروی توپوتکان مورد بررسی قرار گرفتند.

با درنظرگرفتن محیط کشت کافی برای رشد سلول‌ها و هم‌چنین درنظر گرفتن هشت بار تکرار بودن تست، داروها به‌پلیت اضافه شد. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور به‌مدت ۴۸ و۷۲ ساعت نگه‌داری شدند. پس از گذراندن دوران معین درون انکوباتور سوپ رویی از پلیت تخلیه شده و رنگ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2- Yl)-(2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) به‌آن اضافه شد. در این روش از پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف استفاده شد. اساس تست MTT بررسی اثر سمیت یک ماده برروی سلول می‌باشد. اصول کار سه روزه است. در روز اول یک فلاسک پر از سلول انتخاب کرده و جداسازی و پاساژ سلول را انجام داده، در چاهک‌ها به‌مقدار مساوی سلول ریخته شده است. برای این کار ابتدا با استفاده از لام نئوبار سلول‌ها Hela و Hek را شمارش کرده سپس باید در هر چاهک ۱۰۰ لاندا سلول ریخته این تعداد معادل ۱۰۰۰۰ سلول‌های می‌باشد. سپس پلیت را درون انکوباتور co2دار به‌مدت ۲۴ ساعت گذاشته تا سلول‌ها به‌کف پلیت بچسبند و ۵۰ درصد حجم چاهک‌ها را پرکنند. در روز دوم ابتدا محیط رویی را از هر چاهک توسط سرنگ استریل خارج کرده و سپس ۱۰۰ لاندا از هر غلظت توپوتکان را روی هر چاهک ریخته شد و برای هر رقت هشت چاهک درنظر گفته شد. سپس دوباره داخل انکوباتور قرار داده برای کار آزمایشگاهی این تحقیق پلیت‌ها را به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت داخل انکوباتور قرار دادیم.

رنگ MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است. اگر این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد حل شود ترکیب زرد رنگی را ایجاد می‌کند. اساس این تست شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده می‌باشد نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورامازان قهوه‌ای رنگ است که توسط دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) به‌صورت محلول در می‌آیند. هرچه سلول‌ها فعال و زنده تعدادشان بیش‌تر باشد میزان رنگ قهوه‌ای ایجاد شده بیش‌تر است. سپس میزان جذب نوری رنگ قهوه‌ای ظاهر شده در سوپ رویی پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ تا ۶۵۰ نانومتر بااستفاده از دستگاه ELISA (BioTec ELx 800) اندازه‌گیری شد. آن‌گاه براساس جذب نوری نمونه‌ها درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر گروه محاسبه شد.

میزان نیتریک اکسید تولید شده سوپ رویی سلول‌های هلا را با واکنش گریس اندازه‌گیری می‌نماییم. ازآن‌جاکه NO یک گاز ناپایدار است به‌سرعت به متابولیت‌های خود یعنی نیتریت و نیترات تجزیه می‌شود در این روش نیتریت نخست با سولفانیلیک اسید واکنش داده و یک نمک ناپایدار دی‌آزونیوم را تشکیل می‌دهند. سپس این واسط با محلول دوم NED واکنش داده و ترکیبات پایدار آزو تولید می‌کند. شدت رنگ صورتی حاصل به‌منظور سنجش مقدار نیتریت با دستگاه الایزا قابل اندازه‌گیری است.

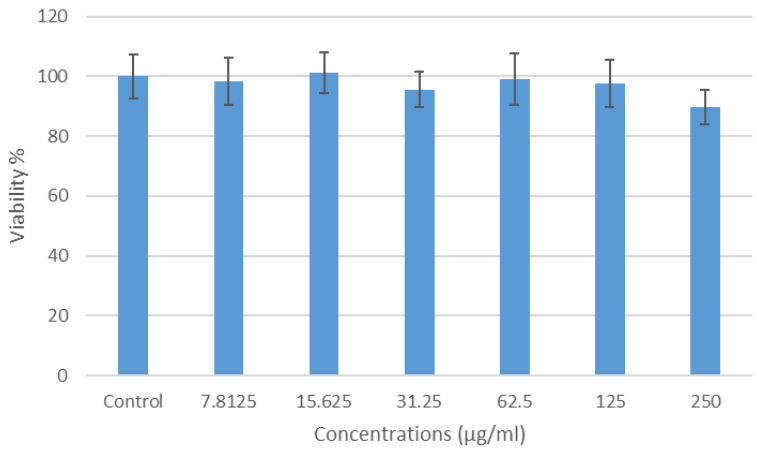
در روش Real time-PCR (دستگاه Applied Biosystem) واکنش به‌صورت دو مرحله‌ای انجام شد. در واکنش دو مرحله‌ای نسخه‌برداری معکوس و تکثیر در تیوب‌های جداگانه صورت گرفت. کیت مورد استفاده در سنتز cDNA کیت تاکارا بوده است. از دیگر مواد به‌کار رفته جهت تولید cDNA می‌توان به‌رندوم هگزامر و یا Oligo dT اشاره نمود که به‌عنوان پرایمری برای آنزیم مربوطه عمل می‌کند. توالی ژن p53 و CAD به‌عنوان ژن هدف و توالی GADPH به‌عنوان ژن رفرنس از نرم‌افزار Beacon designer طراحی شد. پس از انتخاب پرایمر توالی آن‌ها توسط نرم افزار Gen runner طراحی شد. این توالی پرایمری می‌بایست در ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شود. متداول‌ترین رنگ مورد استفاده در این تکنیک سایبرگرین می‌باشد. سایبرگرین یک رنگ اینترکاله و فلورسنت است که به شیارهای کوچک رشته‌های cDNA متصل شده و با جذب طول موج ۴۹۸، نور ۵۲۲ نانومتر ساطع می‌کند که توسط دستگاه الایزا ثبت می‌شود. سایبرگرین به الگوهای تک‌رشته‌ای متصل نمی‌شود. لذا در تک‌رشته‌ای‌ها نور ساطع نمی‌کرده و فقط زمانی‌که الگوهای دو رشته‌ای داشته باشیم متصل شده و نور ساطع می‌کند در طی چرخه‌های PCR محصول دو رشته‌ای تولید می‌شود وبنابراین رنگ سایبرگرین به آن‌ها متصل می‌شود. هرچه شدت تابش فلوروسنت بیش‌تر باشد نشان‌دهنده این موضوع است که میزان DNA دو رشته‌ای ما بیش‌تر است، بنابراین افزایش شدت تابش فلورسنت با غلظت ds DNA (Double strain DNA) متناسب است، سایبرگرین یک رنگ غیراختصاصی است لذا برای تمامی آزمایش‌ها قابل استفاده می‌باشد روش استخراجANR ، استخراج تیانسیانات گانیدینیوم فنل-کلروفرم و لیزسلولی می‌باشد. تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شده است.

## 3- آنالیز آماری

به‌منظور آنالیز آماری با استفاده از نرمافزار آماری SPSS 13 ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها بااستفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها آزمون One- Way ANOVA و هم‌چنین آزمون تعقیبی Post hoc tukey بین گروه‌ها مورد مقایسه قرارگرفت. لازم به‌ذکر است که $p\leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

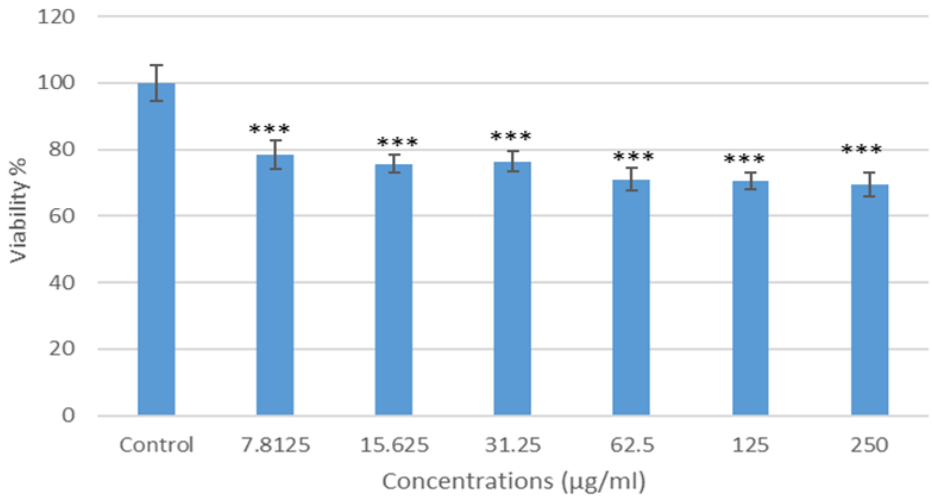
## ۴- نتایج

نتایج به‌دست آمده در تست MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف داروی توپوتکان بر زنده‌مانی سلول‌های HEK در مقایسه با گروه کنترل در محیط کشت سلولی بعد از ۴۸ ساعت داروی توپوتکان هیچ اثر سمی بر رده سلولی Hek نداشته است $p\leq ۰/۰۵$ (نمودار ۱).



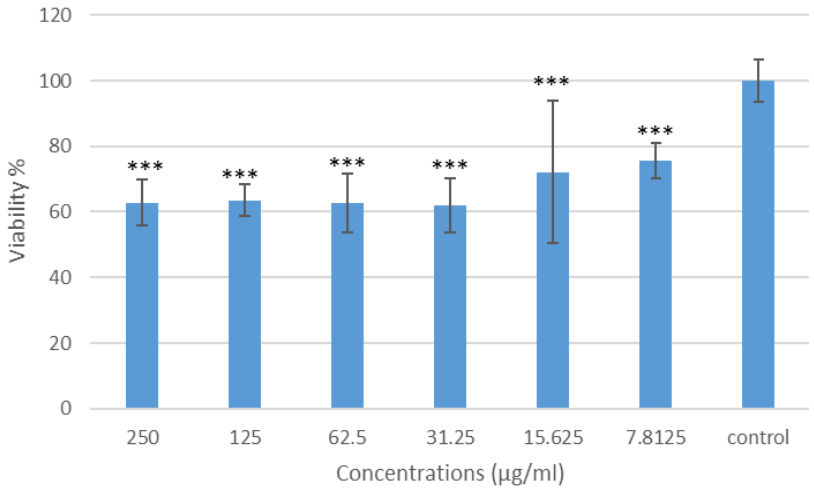

**نمودار ۱: درصد زنده‌مانی سلول‌های HEK در گروه کنترل و گروه‌های تحت تیمار داروی توپوتکان در غلظت‌های ۷/۸ ،۱۵/۶، ۳۱/۲۵ ، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکرو گرم در هر میلی‌لیتر نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری و گروه کنترل وجود ندارد ($p\leq ۰/۰۵$).**

داروی توپوتکان با غلظت ۶۲/۵، ۱۲۵و ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل در بازه زمانی ۴۸ ساعته بر زنده‌مانی سلول‌های Hela دچار تغییر معنی‌دار شده است. به‌بیان‌دیگر در غلظت‌های ذکر شده داروی توپوتکان دارای اثر سمی می‌باشد $p\leq ۰/۰۵$ و نیز در غلظت‌های کم‌تر دارو ۷/۸، ۱۵/۶و ۳۱/۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تغییر معنی‌دار نسبت به گروه کنترل دیده شد ($p\leq ۰/۰۵$) (نمودار۲).



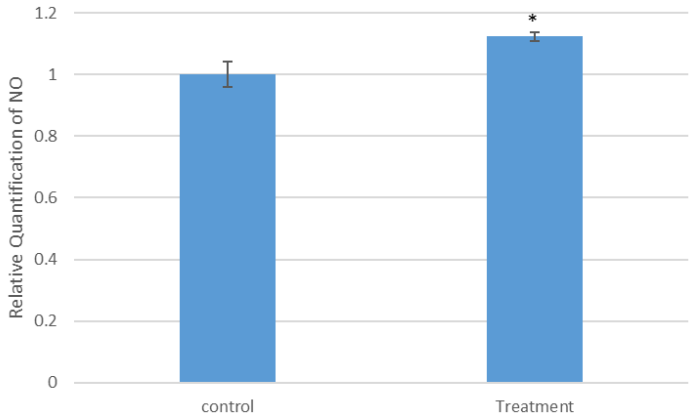

**نمودار ۲: درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela در گروه کنترل و گروه‌های تحت اثر داروی توپوتکان در غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ ، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر.***نشان‌گر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل در $p\leq ۰/۰۵$ است.**

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های Hela در گروه‌های تحت تیمار در زمان ۴۸ ساعته و در غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از داروی توپوتکان نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی‌داری شده است ($p\leq ۰/۰۵$) (نمودار ۳).



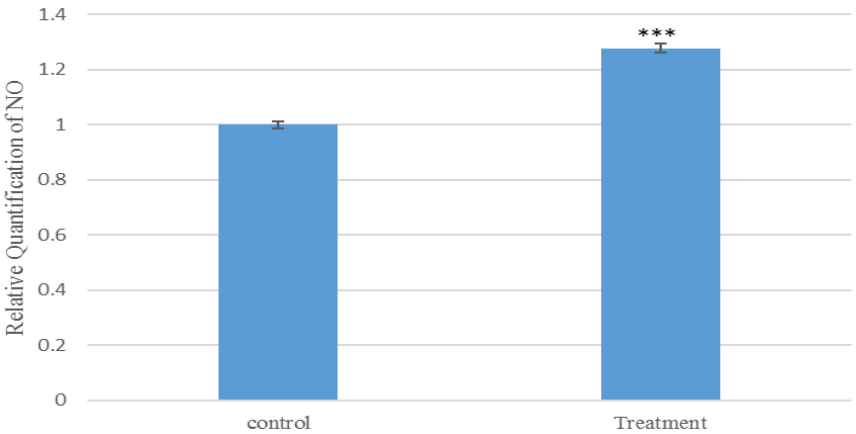

**نمودار ۳: درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela در گروه کنترل و گروه‌های تحت اثر داروی توپوتکان در غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵و ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر. ***نشان‌گر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل در $p\leq ۰/۰۵$ است.**

اثر داروی توپوتکان بر افزایش نیتریک اکساید در محیط کشت سلول‌های Hela در زمان تیمار ۷۲ ساعت و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که مقدار نیتریک اکساید تولید شده در محیط کشت سلول‌های Hela در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ($p\leq ۰/۰۵$) (نمودار ۴).



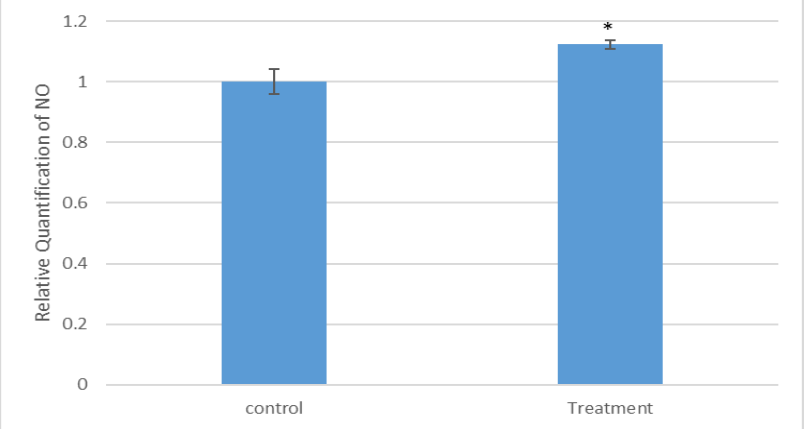

**نمودار ۴: مقدار نسبی افزایش NO در گروه‌های کنترل و تحت درمان با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر توپوتکان. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل در $p\leq ۰/۰۵$ می‌باشد.**

اثر داروی توپوتکان بر افزایش نیتریک اکساید در محیط کشت سلول‌های Hela در زمان تیمار ۷۲ ساعته در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که مقدار نیتریک اکساید تولید شده در سلول‌های Hela که با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر داروی توپوتکان تیمار شده‌اند در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p\leq ۰/۰۵$) (نمودار ۵).




**نمودار۵: مقدار نسبی افزایش NO در گروه‌های کنترل و تحت درمان با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر توپوتکان. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه گنترل در $p\leq ۰/۰۵$ می‌باشد.**

در تست Real time PCR بیان ژن iNOS در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر توپوتکان نسبت به سلول‌های بدون تیمار ۱/۲ برابر افزایش یافته است. (RQ=1.2) (نمودار۶).




**نمودار۶: تاثیر داروی توپوتکان بر میزان بیان ژن iNOS در رده سلولی Hela. *نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل p≤۰/۰۵ می‌باشد.**

## ۵- بحث

نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد موثر در سرطان است و می‌تواند وقایع مرتبط با سرطان آنژیوژنزیس (رگ‌زایی) آپوپتوزیس (مرگ برنامه ریزی شده سلول)، چرخه سلولی، تهاجم و متاستاز (مهاجرت سلول‌های سرطانی از یک بافت به بافت‌های دیگر) را تنظیم کند. نیتریک‌اکسید در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌تواند به‌عنوان یک عامل آپوپتیک (مرگ‌آور سلول) و نیز عامل آنتی آپوپتوتیک (جلوگیری از مرگ سلول) عمل کند. نیتریک اکساید سنتز شده از eNOS می‌تواند نفوذپذیری سد خونی تومور را افزایش داده و در تهاجم تومور نقش داشته باشد. ازآن‌جا که NO انقباض سلول‌های عضلانی صاف و انقباض خودبه‌خود و هم‌چنین اتساع رحم را تنظیم می‌کند، نقش NO در تنظیم پاتوفیزیولوژی و زیست‌شناسی رحم مورد توجه زیادی قرار گرفته است. (۱۵) وجود NOS در اپی‌تلیوم، سلول‌های استرومای آندومتر، سلول‌های عضله صاف میومتر و ماست‌سل‌ها، حاکی از نقش موضعی NO درکنترل عمل‌کرد رحم است. نتایج حاصل از مطالعه در تحقیق ما نشان داد که داروی توپوتکان برروی سلول‌های سالم احتمالا تاثیری نداشته و اثر سمی در حین شیمی درمانی بر سلول‌های سالم نشان نداده است (نمودار ۱). بنابراین احتمالا می‌تواند انتخاب مناسبی برای درمان سلول‌های سرطانی باشد. زیرا سلول‌های سالم فرد دست‌خوش مرگ سلولی نخواهند شد و فرد تحت درمان کم‌ترین میزان آسیب ناخواسته را حین درمان دریافت می‌کند. نتایج حاصل از تست MTT مشخص کرد که داروی توپوتکان باعث مهار سلول‌های سرطانی دهانه رحم در غلظت‌های متفاوت از دارو شده است (نمودار ۲، ۳). هم‌چنین بیان ژن نیتریک اکساید در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۵۰ ماکروگرم در یک میلی‌لیتر توپوتکان نسبت به‌سلول‌های بدون تیمار ۱/۲ برابر افزایش یافت (نمودار ۴، ۵) . بین اثرات سایتوتوکسیک توپوتکان و میزان نیتریک اکساید رابطه مستقیمی وجود دارد یعنی توپوتکان باعث افزایش نیتریک اکساید شده و از آن طریق اثرات سایتوتوکسیک خود را القا می‌کند. و با افزایش نیتریک اکساید در سلول‌های سرطانی باعث مرگ سلول سرطانی می‌شود (نمودار ۶). Matthias و همکاران (۱۶) در مقاله‌ای مروری تحت عنوان القای ژن القایی نیتریک اکسید سنتاز در تومور پی بردند که نیتریک‌اکسید سنتاز (iNOS) (Inducible nitric oxide synthase) یکی از سه آنزیم کلیدی تولیدکننده نیتریک‌اکسید از آمینواسید L-آرژنین است. نیتریک اکسید سنتاز حاصل از نیتریک اکسید نقش مهمی را در حالت‌های فیزیولوژیکی متعدد (برای مثال تنظیم فشار خون، ترمیم زخم و مکانیسم‌های دفاع میزبان) و پاتوفیزیولوژیکی (مانند التهاب، عفونت، بیماری‌های نئوپلاستیکی، سیروز کبدی و دیابت)

ایفا می‌کند. نیتریک اکسید سنتاز، ایزوفرم سنتازی است که در اغلب موارد در رابطه با بیماری‌های بدخیم قرار می‌گیرد. بااین‌حال، نقش iNOS در حین رشد تومور بسیار پیچیده است و به‌طور کامل درک نشده است. به‌طور ویژه توده بدخیم متحرک، آنژیوژنز و متاستاز بااستفاده از iNOS اصلاح می‌شوند. ازطرف‌دیگر نیتریک اکسید حاصل از ماکروفاژها به‌طور بالقوه دارای اثر سیتوتوکسیک/سیتواستاتیک می‌باشد که بر سلول‌های سرطانی اثر می‌کند. بنابراین تداخل دارویی با iNOS از اهمیت بالایی برخوردار است. در این بررسی به اثر دوجانبه ژن iNOS به‌عنوان پروموتور و مهارکننده تومور اشاره شده است. نتایج مطالعات تحقیق حاضر نشان داد که افزایش نیتریک اکساید باعث مهار رشد سلول سرطانی دهانه رحم می‌شود (نمودار ۶). درحالی‌که در مطالعه بالا به اثر دو جانبه در مهار و رشد سلول سرطانی اشاره شده است این نتایج بیان‌گر این است که نیتریک اکساید در بعضی از سلول‌ها باعث رشد و در برخی مهار رشد سلول سرطانی را ایجاد می‌کند. Weiming و همکاران (۱۷) در پژوهشی با عنوان نقش نیتریک اکسید در سرطان دریافتند که نیتریک اکساید یک تنظیم‌کننده پلی‌تروپیک است که در فرایندهای بیولوژیکی متعددی ازجمله وازودیلاسیون، انتقال عصبی و ایمنی ماکروفاژها بسیار حیاتی و مهم است. گروه نیتریک اکسید سنتاز شامل نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS)، نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیال (eNOS) و نیتریک اکسید سنتاز نورونی (nNOS) (Neuronal nitric oxide synthase) می‌باشد. جالب توجه است، مطالعات مختلف نشان داده است که هر سه ایزوفرم در پروموت (رشد) و یا مهار اتیولوژی سرطان نقش دارند. فعالیت NOS در سلول‌های سرطانی ژن‌های مختلف تشخیص داده شده است که به درجه تومور، سرعت تکثیر و بیان مولکول‌های مهم سیگنالینگ مربوط به پیشرفت توده سرطانی مانند گیرنده استروژن بستگی دارد. به‌نظر می‌رسد که سطح بالایی از بیان NOS (برای مثال تولید شده توسط ماکروفاژهای فعال) ممکن است برای سلول‌های سرطانی اثر سیتواستاتیک یا سیتوتوکسیک داشته باشند، درحالی‌که فعالیت سطح پایین آن دارای اثر مخالفی است و رشد و پیشرفت تومور را موجب می‌شود. بنابراین به‌طور متناقضی نیتریک‌اکسید ممکن است دارای خواص ژنوتوکسیک و آنژیوژنیک باشند. درک درست از نقش سطح مولکولی NO در سرطان منجر به اثرات درمانی عمیقی در تشخیص و درمان بیماری به‌همراه دارد. هم‌چنین Korde و همکاران (۱۸) پژوهش خود خود را با تمرکز به نقش نیتریک اکسید بر انواع سرطان به‌اتمام رساندند و دریافتند که اکسید نیتروژن (NO)، یک گاز رادیکال آزاد، محلول در آب است، که نقش کلیدی در بسیاری از انواع فرآیندهای فیزیولوژیکی و هم‌چنین فرایندهای پاتولوژیکی دارد. در دهه‌های گذشته، NO به‌عنوان یک مولکول جالب توجه در فرایند سرطان‌زایی شناخته شده است و در این‌جا درک نقش آن در زیست شناسی سرطان و وجود اختلاف نظرها مورد بحث است. گفته می‌شود که اثرات بازدارندگی و انهدام تومور و هم‌چنین اثرات رشد تومور به زمان‌بندی، سرکوب و غلظت آن بستگی دارد. ON برای پیش‌گیری از وقوع رویدادهای مرتبط با سرطان ازجمله آنژیوژنز، آپوپتوزیس چرخه سلولی، تهاجم و متاستاز پیشنهاد شده است. هم‌چنین ON به‌عنوان یک عامل ضدانکوژن بالقوه ظاهر می‌شود. مکانیزم‌های مختلفی از عمل‌کرد ON در سرطان‌های مختلف سرطان سینه، سرطان دهانه رحم، معده، روده بزرگ و رکتوم و سرطان سر و گردن، مورد توجه قرار گرفته است. هم‌چنین این مقاله ماهیت دوگانه‌ی ON را نشان می‌دهد و در مورد کاربردهای جدید درمانی برای پیش‌گیری و درمان سرطان بحث می‌کند. در این تحقیق نیز به اثر دوجانبه نیتریک اکساید، وابسته به‌میزان تولید آن در سلول سرطانی اشاره شده است. حال‌آن‌که تحقیق ما در این زمینه نشان داد که افزایش میزان تولید نیتریک اکساید در سلول سرطانی دهانه رحم باعث مهار رشد سلول شده و مرگ سلولی را ایجاد کرد (نمودار ۵، ۶ ). در مطالعه دیگری "kawK" و همکاران (۹۱) نشان داد که مرگ سلول‌های توموری را می‌توان با القا SONi درسلول‌های سرطانی ایجاد کرد.

## ۶- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که داروی توپوتکان با افزایش میزان تولید نیتریک اکساید در سلول سرطانی باعث مهار رشد و مرگ سلول سرطانی می‌شود. احتمالا به‌علت این‌که داروی توپوتکان تاثیری بر سلول‌های سالم ندارد برای درمان سرطان رحم مورد توجه می‌باشد.

## 7- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد. بدین‌وسیله از کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

## 8- منابع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries; CA Cancer J Clin. 2018; 68(6):394-424.
2. WHO Cervical cancer. World Health Organization, Geneva2018: http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, et al. Estimate of wordwild burden of cancer in 200; Globocan 2008.Int J Cancer. 2010; 127(12):2893-917.
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tiieulent J, Rosso S, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer. 2013; 49(6):1374-403.
5. Pommier Yves. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006;6 (10): 789–802.
6. Wright Tc JR, Cox Jt, Massed LS, Twiggs LS. Consensus Guidelines for management of woman with cervical cytological abnormalities. JAMA 2002; 287(16):2120-9.
7. Bardia Al, Oslon JE, Vachon CM, Lazovich D, et al. Effect of aspirin and other NSAIDs on postmenopausal breast cancer incidence by hormone receptor statuse: results from a prospective cohort study. Breast cancer Res Treat. 2011; 126(1):149-155.
8. Staker BL. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. PNAS.2002; 99 (24): 15387–15392.
9. Pommier, Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chem Biol. 2010; 17(5): 421–433.
10. Naomi B, Haas& et al. Phase I/Pharmacokinetic Study of Topotecan by 24-Hour Continuous Infusion Weekly. Cancer Res. 1994; 54(5):1220-1226.
11. Ying L, Hofseth LJ. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. Cancer Res. 2007; 67(4):1407-1410.
12. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. Free Radic Biol Med. 2003; 34(8):955-968.
13. Xia Y, Krukoff TL. Estrogen induces nitric oxide production via activation of constitutive nitric oxide synthases in human neuroblastoma cells Endocrinology. 2004; 145(10):4550 4557.
14. Li C-Q, Wogan GN. Nitric oxide as modulator of apoptosis. Cancer Lett. 2005; 226(1):1-15.
15. Azuma H, Obayashi S, Hamasaki H, Koyama T, et al. Role of endothelium in the human uterine arteries during normal menstrual cycle. Br J Pharmacol. 1995; 114(4):902-908.
16. Matthias Lechner, Philipp Lirk, Josef Rieder. "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin". Semin. Cancer Biol. 2005; (15): 277–289.
17. Weiming Xu, Li zhi liu M, Loizidou M, Ahmed IG. Charles. The role of nitric oxide in cancer. Cell Res. 2005; 12(5-6):311-320.
18. Korde Choudhari SH, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, et al. Nitric oxide and cancer: a review, J. Surg. Oncol. 2013; 11:118.
19. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med 2000; 6(12):1399-1402.